

ARTHRITE-ENCÉPHALITE CAPRINE ET MAEDI-VISNA

RÉSUMÉ

Le Maedi-visna (MV) du mouton et l'arthrite/encéphalite caprine (CAE) sont des infections virales persistantes dues à des lentivirus souvent regroupés sous le nom de lentivirus des petits ruminants (SRLV = small ruminant lentiviruses). Le Maedi-visna est aussi connu sous le nom de pneumonie progressive ovine. Des analyses phylogénétiques du virus du MV (MVV) et du virus de la CAE (CAEV) ont démontré qu'il s'agit de lentivirus étroitement apparentés. La première transmission du virus MV aux agneaux ou du CAEV aux chevreaux se fait par le colostrum ou le lait pendant l'allaitement. Une éventuelle transmission horizontale en l'absence de lactation n'est pas démontrée ; cependant les fèces et le liquide pulmonaire sont connus pour contenir du virus infectieux. Des lentivirus ovins ont été identifiés dans la plupart des pays éleveurs de moutons dans le monde, toutefois il faut noter l'exception remarquable de l'Australie et de la Nouvelle Zélande. C'est dans les pays industrialisés que le CAEV est le plus répandu, sa distribution semble avoir coïncidé avec les mouvements internationaux des races européennes de chèvres laitières. Les signes cliniques et subcliniques du MV et de la CAE sont caractérisés par l'installation progressive de lésions inflammatoires à cellules mononucléées dans les poumons, les articulations, la mamelle et le système nerveux central. Une mammite indurative est commune dans les deux espèces, son importance économique est souvent sous-estimée. Une respiration difficile associée à un amaigrissement extrême causé par la pneumonie progressive est le tableau prédominant observé chez les moutons cliniquement atteints, alors que chez les chèvres la maladie observée est surtout une polyarthrite. Cependant, La plupart des moutons et des chèvres infectés par les lentivirus sont en grande partie asymptomatiques, mais demeurent des porteurs permanents de virus, capables de transmettre l'infection par le colostrum, le lait ou leurs sécrétions respiratoires. Pour confirmer un diagnostic de MV ou de la CAE, l'approche la plus pratique et la plus fiable est une association de la sérologie et de l'évaluation clinique. Bien que la sérologie représente la méthode la plus efficace de diagnostic des animaux infectés chroniques sans signes cliniques, il faut bien comprendre que les épreuves sérologiques peuvent donner des résultats erronés. La fréquence des erreurs dépend de plusieurs facteurs et notamment de : 1) le type d'épreuve, 2) l'homologie entre les souches virales utilisées dans l'épreuve et les souches présentes dans la population à tester et 3) l'antigène viral utilisé dans l'épreuve.

Identification de l'agent pathogène : *l'isolement du virus peut être tenté à partir de cas cliniques ou subcliniques vivants, par coculture du sang périphérique ou de leucocytes du lait avec des cultures de cellules ovines ou caprines appropriées, comme les cellules de plexus choroïdes (MVV), ou de membrane synoviale (CAEV). L'isolement du virus est très spécifique mais sa sensibilité est variable. Il est plus facilement obtenu après l'autopsie par la mise en culture d'explants de tissus infectés, par ex. poumon, plexus choroïde, membrane synoviale ou mamelle. Egalement, des macrophages alvéolaires obtenus post-mortem à partir des poumons peuvent être mis en coculture avec des cellules sensibles. On obtient des effets cytopathiques caractéristiques, avec l'apparition de cellules réfringentes étoilées et de syncytiums. La présence de MVV ou de CAEV peut être confirmée par les techniques d'immunomarquage et la microscopie électronique.*

Méthodes de reconnaissance des acides nucléiques : *plusieurs techniques de réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), soit classiques (nombreuses), soit quantitatives, (peu nombreuses) ont été décrites et sont maintenant utilisées en routine dans de nombreux laboratoires pour la détection rapide, l'identification et le titrage des souches de lentivirus des petits*

ruminants. Le clonage et/ou le séquençage des produits issus de la PCR sont les méthodes les plus évidentes pour confirmer la spécificité de ces produits.

Épreuves sérologiques : *la plupart des moutons et des chèvres infectés sont porteurs d'anticorps spécifiques détectables qui peuvent être recherchés par un certain nombre d'épreuves sérologiques différentes. Deux méthodes sont le plus souvent utilisées, l'immunodiffusion en gélose et la méthode immuno-enzymatique (ELISA). Le western blot (immuno-empreinte) et le test de radio-immunoprécipitation sont également utilisés, mais seulement dans des laboratoires très spécialisés. Un test ELISA détectant les anticorps du lait peut être utilisé pour les troupeaux caprins laitiers. La période de temps requise entre l'infection et la séroconversion peut être relativement longue et difficile à prévoir, elle se mesure en mois plutôt qu'en semaines. Cependant, après la séroconversion, la réponse anticorps est le plus souvent persistante, et les moutons et les chèvres séropositifs doivent être considérés comme des porteurs de virus.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *il n'y a pas de réactifs biologiques disponibles.*

A. INTRODUCTION

Le Maedi-visna du mouton (MV), et l'arthrite/encéphalite caprine (CAE) sont des infections virales persistantes causées par des lentivirus étroitement apparentés (34). Le Maedi-visna est aussi connu sous le nom de pneumonie progressive ovine. Les moutons peuvent être infectés expérimentalement avec le virus de la CAE et les chèvres avec le virus du MV (4). En outre, les analyses phylogénétiques comparant les séquences nucléotidiques du virus du MV (MVV) et du virus de la CAE (CAEV pour *caprine arthritis-encephalitis virus*) indiquent clairement l'existence et l'importance épidémiologique de transmissions croisées inter-espèces entre moutons et chèvres, sans qu'il ait été démontré clairement si un virus a émergé à partir de l'autre (17, 23, 28, 37, 40, 41, 45, 47). Le MV et la CAE sont caractérisés par la persistance, tout au long de la vie de l'hôte, de l'agent causal dans les monocytes et les macrophages, et par une période de temps très variable entre l'infection et l'induction d'une réponse anticorps antivirale sérologiquement détectable. Une grande partie des moutons et des chèvres infectés ne présentent pas de signes cliniques de maladie, mais restent infectés en permanence et peuvent transmettre le virus (2, 5, 7).

Le Maedi-visna est un nom islandais décrivant deux des syndromes cliniques reconnus chez les moutons infectés par le MVV. « Maedi » signifie « dyspnée et difficultés respiratoires » et décrit la maladie associée à une pneumonie progressive intersticielle, et « visna » signifie « dépérissement » ou « état d'apathie progressive », signes associés à une méningoencéphalite paralysante. Alors que la maladie pulmonaire progressive est le principal symptôme observé dans l'infection à MVV, une polyarthrite chronique, avec synovite et bursite, est la principale manifestation clinique de l'infection à CAEV. Une encéphalite peut être observée principalement chez des chevreaux âgés de 2 à 6 mois infectés par le CAEV, mais un diagnostic différentiel soigneux doit être porté afin d'éliminer d'autres infections ou syndromes des chevreaux. Une mammite indurative apparaît dans les deux syndromes. Les poumons des moutons atteints de MV ne s'affaiblissent pas quand on les retire du thorax, et souvent gardent l'empreinte des côtes. Les poumons et les nœuds lymphatiques ont un poids augmenté (jusqu'à 2-3 fois le poids normal). Les lésions ont une distribution uniforme à travers les poumons, qui sont uniformément décolorés ou de couleur marbrée gris-marron et de texture ferme. Les mamelles atteintes par le MV présentent des indurations diffuses, les nœuds lymphatiques associés pouvant être hypertrophiés.

En cas de suspicion de maladie clinique de MV ou de la CAE, on peut arriver à une confirmation du diagnostic en associant l'étude clinique, la sérologie et, si nécessaire, l'examen histologique des tissus appropriés collectés à l'autopsie. Les tissus qu'il importe d'examiner sont les poumons en cas de pneumonie progressive intersticielle, le cerveau et la moelle épinière pour la méningoencéphalite, la mamelle pour la mammite indurative, les articulations affectées et les synoviales en cas d'arthrite, et les reins en cas de vasculite (6, 9, 10, 26, 30, 31). La nature de la réaction inflammatoire est la même dans les différentes localisations, consistant en une réaction intersticielle à cellules mononucléées, avec quelquefois d'importants agrégats de cellules lymphoïdes et formation de follicules.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

L'isolement et la caractérisation du MVV ou du CAEV ne sont pas normalement tentés dans le cadre d'un diagnostic de routine. Étant donnée la nature persistante de ces infections, l'établissement d'un statut positif en

anticorps suffit à identifier les animaux porteurs de virus. Cependant, en raison de la séroconversion tardive après l'infection, on peut trouver des sérologies négatives chez des animaux récemment infectés.

Il y a deux approches pour l'isolement des virus MVV et CAEV : la première est mise en œuvre à partir de l'animal vivant, la deuxième est utilisée sur des tissus prélevés à l'autopsie.

a) Isolement à partir de l'animal vivant

- **Virus Maedi-visna**

L'ADN proviral du MVV est transporté dans les monocytes circulants et les macrophages tissulaires. C'est pourquoi l'isolement du virus sur l'animal vivant nécessite de réaliser des préparations de leucocytes, avec les précautions d'asepsie, obtenues à partir du sang périphérique ou du lait pendant la lactation, et leur culture avec des cellules indicatrices. Les cellules de plexus choroïde de mouton (SCP) sont fréquemment utilisées dans ce but. Ces cellules permissives au MVV peuvent être préparées comme cultures d'explants primaires provenant de fœtus ou d'agneaux nouveau-nés indemnes de virus, leur nombre peut être multiplié après 3 à 4 passages avant stockage en azote liquide. Les cellules de SCP récupérées sont alors utilisables en coculture pour au maximum 10 ou 15 passages. Au-delà, même si elles continuent à bien cultiver, leur sensibilité au MVV peut être réduite.

Les leucocytes peuvent être préparés à partir du sang circulant sous forme de « buffy coat » en centrifugeant 15 min à 1 000 *g* les échantillons de sang qui sont recueillis sur héparine, ou sur acide éthylène diamino-tétra-acétique (EDTA) ou sur citrate. Les cellules sont aspirées, remises en suspension dans la solution équilibrée de Hanks (HBSS), puis purifiées par une centrifugation de 40 min à 400 *g* sur coussin approprié (par ex. Ficoll Paque [Pharmacia]). Les cellules récupérées à l'interface subissent un ou deux cycles de lavage-centrifugation basse (« spin-washing ») durant 10 min à 100 *g*, et le culot final est resuspendu dans le milieu à une concentration d'environ 10⁶ cellules/ml ; les cellules sont généralement cultivées durant 10 à 12 jours en sacs de Téflon, elles sont ensuite déposées sur un tapis monocellulaire lavé de cellules SCP légèrement subconfluentes dans un flacon de 25 cm² de surface.

De même, les leucocytes peuvent être obtenus en culot par centrifugation à partir du lait, remis en suspension après centrifugation-lavage et finalement ajoutés à un tapis de culture de SCP.

Ces cultures sont maintenues à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO₂, en changeant de milieu et en faisant un nouveau passage quand c'est nécessaire. Elles sont examinées pour la recherche d'effet cytopathique (ECP) caractérisé par l'apparition de cellules réfringentes en étoile avec prolongements dendritiques, accompagnée de la formation de syncytiums. Les cultures doivent être maintenues et observées durant plusieurs semaines avant de pouvoir être éliminées (non infectées). Quand un ECP est suspecté, des cultures sur lamelle doivent être préparées. Ces cultures sont fixées, et la mise en évidence d'antigène viral se fait par immunomarquage, le plus souvent par les techniques d'immunofluorescence indirecte ou d'immunoperoxydase indirecte. D'autre part, les cellules de tapis cellulaire suspect sont récupérées par centrifugation, et des préparations sont faites en vue d'identifier, par la microscopie électronique à transmission, des particules caractéristiques des lentivirus. Une activité reverse transcriptase dans le surnageant de culture est une indication de la présence de rétrovirus.

- **Virus de l'arthrite/encéphalite caprine**

Les mêmes principes que l'on applique à l'isolement du MVV s'appliquent également à l'isolement du CAEV. À l'origine, le virus de la CAE a été isolé par explantation de la membrane synoviale provenant d'une chèvre arthritique (6). Pour les chèvres vivantes infectées par le CAEV, le sang circulant, le lait, et le liquide articulaire (si on peut le prélever) représentent les sources les plus intéressantes pour préparer des leucocytes. Les cellules permissives de membrane synoviale de chèvre (GSM) sont un bon indicateur. Si on soupçonne un ECP, il est nécessaire de mettre en œuvre des tests de détection de l'antigène viral, comme indiqué ci-dessus.

b) Isolement à partir de tissus après autopsie

- **Virus de l'arthrite/encéphalite caprine et du Maedi-visna**

Les échantillons de tissus suspects, collectés aussi fraîchement que possible (poumons, membranes synoviales, mamelle, etc.), sont recueillis aseptiquement dans du milieu HBSS ou un milieu de culture cellulaire et découpés finement dans une boîte de Petri au moyen de lames de scalpel. Les fragments individuels sont transférés à la pipette Pasteur dans des flacons de 25 cm², environ 20 à 30 fragments par flacon, et une goutte de milieu nutritif est placée soigneusement sur chaque fragment. Les flacons sont alors incubés à 37 °C en atmosphère humide à 5 % de CO₂, et laissés au repos pendant quelques jours pour permettre aux explants individuels d'adhérer au plastique. On ajoutera très soigneusement du milieu frais,

après quoi des amas de cellules vont progressivement se développer à partir des fragments. Quand cette prolifération est suffisante, les cultures sont dispersées par trypsination, pour permettre le développement de tapis cellulaires. Ceux-ci peuvent être examinés pour l'ECP, et toute suspicion de multiplication virale doit être confirmée de la même façon que pour les cocultures.

Des cultures de macrophages adhérents sont faciles à établir à partir du liquide résultant du rinçage des poumons (liquide de lavage broncho-alvéolaire obtenu *post mortem*). La production de virus peut être testée dans ce liquide en une à deux semaines par la sérologie, la microscopie électronique, ou la recherche de la reverse transcriptase. Des isollements de virus peuvent être pratiqués par coculture de macrophages sur des cellules SCP ou GSM comme il a été décrit ci-dessus pour les leucocytes.

c) Méthodes de reconnaissance des acides nucléiques

La plupart des laboratoires de diagnostic des maladies à virus sont très probablement équipés pour les méthodes basiques de culture cellulaire décrites ci-dessus. De nombreux laboratoires maintenant peuvent aussi mettre en œuvre les méthodes de reconnaissance des acides nucléiques pour la détection, l'identification et la quantification de l'ADN proviral du MV et de la CAE, en utilisant les méthodes classiques de réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) suivie de Southern blot et de l'hybridation *in situ*, ou le clonage et le séquençage des produits de la PCR (3, 19, 22). Des techniques de PCR classique pour la détection de l'ADN proviral du MV et de la CAE dans les cellules et les tissus ont été décrites et sont utilisées en routine dans de nombreux laboratoires ; elles sont en général utilisées comme complément à la sérologie, pour déterminer le statut infectieux d'animaux ne pouvant pas être franchement diagnostiqués par les techniques sérologiques (13, 24). Des techniques de PCR en temps réel ou quantitatives commencent à être utilisées dans quelques laboratoires et ces tests, en plus de déterminer le statut infectieux, permettent aussi de mesurer la quantité de provirus du MV ou de la CAE présent chez l'animal (3, 19). Des techniques de biologie moléculaire supplémentaires, telles que la PCR suivie du clonage et du séquençage, apportent aussi des renseignements sur la région ou le pays d'origine des souches de MV ou de la CAE, ce qui peut influencer le choix de l'épreuve sérologique et de l'antigène de MV ou de la CAE à mettre en œuvre. Des analyses phylogénétiques de l'ADN proviral du MVV et du CAEV à partir de souches de SRLV du monde entier laissent à penser que, dans certaines régions, le MV a pu naturellement infecter des chèvres et que la CAE a pu infecter naturellement des moutons (40, 41). Il est possible qu'à l'avenir des tests de diagnostic moléculaire associés à des analyses phylogénétiques puissent retracer la transmission des infections.

La spécificité de la PCR est une question importante lors de son utilisation. En raison de la possibilité d'amplification de séquences non spécifiques à partir de l'ADN génomique de l'hôte (faux positifs), le produit amplifié doit être vérifié par hybridation, profils de digestion par des endonucléases de restriction ou par séquençage. La spécificité des épreuves basées sur la PCR est apportée par le séquençage du produit amplifié et est recommandé par l'OIE. La sensibilité est améliorée en travaillant avec des épreuves de PCR nichée, mais la spécificité de ces épreuves doit être vérifiée par des méthodes d'hybridation, de profils de digestion par endonucléases de restriction ou par séquençage.

2. Épreuves sérologiques

Les infections à lentivirus ovins et caprins étant persistantes, la détection d'anticorps est un outil sérologique précieux pour l'identification des porteurs de virus. La relation antigénique étroite entre les virus MVV et CAEV, ne permet pas la détection d'anticorps hétérologues dans certaines épreuves sérologiques (25).

Les méthodes les plus couramment utilisées pour le diagnostic sérologique des infections par les SRLV sont l'immunodiffusion en gélose (IDG) et la méthode immuno-enzymatique (ELISA). L'IDG, décrite en 1973, a été la première à être développée (44), et l'ELISA a été décrit pour la première fois en 1982 (20). L'IDG est spécifique, reproductible et simple à réaliser, mais une certaine expérience est requise pour une bonne lecture des résultats. L'ELISA est économique et donne des résultats quantitatifs ; il est automatisable dans ses différentes étapes, ce qui le rend utile pour le dépistage sur un grand nombre de sérums. La sensibilité et la spécificité de l'IDG et de l'ELISA dépendent des souches virales utilisées dans le test, de la préparation de l'antigène viral et des réactifs de référence utilisés dans les essais comparatifs. Le Western blot et les épreuves de radio-immunoprécipitation sont les épreuves de référence pour évaluer la sensibilité et la spécificité de l'IDG et de l'ELISA.

a) Immunodiffusion en gélose (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

On trouve chez les virus du MV et de la CAE deux antigènes viraux d'importance majeure en sérologie de routine, une glycoprotéine d'enveloppe virale communément dénommée SU ou gp135, et une protéine de capside, dénommée CA ou p28. Ces deux antigènes sont conservés dans une préparation antigénique consistant en un surnageant de culture cellulaire infectée qui a été concentré environ 50 fois par dialyse

contre du polyéthylène glycol. La souche sauvage WLC-1 de MV est utilisée pour l'IDG aux États-Unis d'Amérique (8)¹. Au Canada, il s'agit d'une souche MV canadienne prélevée sur le terrain (43).

Il est important de reconnaître que la sensibilité de l'IDG pour la détection des anticorps anti-CAEV dépend à la fois de la souche et de l'antigène viral utilisés (1, 25). Il a été démontré qu'un test IDG utilisant la gp135 de CAEV apportait une bien meilleure sensibilité que l'IDG réalisée avec la p28 de CAEV (1). De plus, il a été montré, en prenant comme référence la radio-immunoprécipitation, que la sensibilité de la réaction d'IDG pour la recherche d'anticorps anti-CAEV était, en utilisant l'antigène viral CAEV, de 35 % supérieure à la sensibilité obtenue avec l'antigène du virus MV (25). L'explication la plus probable pour cette différence de sensibilité entre les antigènes des virus CAE et MV dans la détection d'anticorps anti-CAEV est la suivante : l'épreuve de radio-immunoprécipitation ne requiert que la liaison d'un seul épitope par anticorps pour donner un résultat positif, alors que la précipitation en gel d'agarose nécessite de multiples interactions épitope-anticorps. Bien que les virus du MV et de la CAE présentent une homologie de 73 % à 74,4 % dans la séquence des nucléotides du gène de l'enveloppe (17), ce degré d'identité peut ne pas suffire pour entraîner la production d'anticorps en quantité suffisante vis-à-vis des épitopes communs du MVV et du CAEV, ce qui se traduit par des lignes de précipitation anticorps/antigène indétectables lorsque l'antigène viral MV est utilisé. Quand on utilise l'antigène approprié, l'IDG est un test performant. Comparée à l'immunoprécipitation, l'IDG, en détection d'anticorps anti-CAEV, en utilisant l'antigène CAEV, a montré une sensibilité de 92 % et une spécificité de 100 % (25). En outre, avec l'antigène MVV, l'IDG pour la détection des anticorps anti-MVV a une spécificité de 99,3 % et une sensibilité de 99,4 % (16).

Chez les moutons infectés persistants par le MVV et chez les chèvres infectées par le CAEV, la réponse prédominante en anticorps précipitant est dirigée contre l'antigène gp135 (18, 26). Une réponse anti-p28 est habituellement présente mais, chez les moutons adultes infectés persistants, son titre est plus faible que pour la réponse anti-gp135 en immunoprécipitation. Dans quelques cas de chèvres infectées par le CAEV, on a pu mettre en évidence la production d'une réponse anti-gp135 en absence de réponse anti-p28 et vice-versa, au niveau individuel (11, 36). C'est pourquoi il est indispensable pour valider un test d'utiliser des sérums de référence qui produisent à la fois les lignes de précipitation anti-gp135 et anti-p28.

Le milieu gélosé est composé d'agarose à 0,7–1 % en tampon 0,05 M Tris pH 7,2, avec 8 % de NaCl. Le test est commodément réalisé en boîtes de Petri en plastique, ou en plateaux de matière plastique de 10 cm². La disposition et la taille des puits vont déterminer le nombre de sérums qui seront testés sur la plaque. Différentes dispositions de puits peuvent être adoptées, mais il est usuel d'utiliser un arrangement hexagonal avec un puits central : par exemple, une disposition alternant en périphérie des grands puits (diamètre 5 mm) et des petits puits (diamètre 3 mm), éloignés de 2 mm et distants de 2 mm d'un puits central d'antigène (de 3 mm de diamètre). En périphérie, les grands puits contiennent les sérums à tester, et les petits puits contiennent les sérums de référence. Un sérum témoin positif faible doit être inclus dans chaque test. Les boîtes sont incubées toute la nuit en chambre humide entre 20 et 25 °C, ensuite on examine les lignes de précipitation. Pour accroître les lignes de précipitation, l'incubation peut être prolongée entre 2 et 8 °C pendant 24 h.

Il est important de noter que l'interprétation de l'IDG nécessite un personnel expérimenté. L'interprétation des résultats dépend des antigènes utilisés. Des exemples de réactions d'IDG réalisées avec différentes préparations antigéniques, ainsi qu'un guide pour l'interprétation des résultats peuvent être trouvés dans la ref. 2.

b) Méthode immuno-enzymatique (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

À l'heure actuelle, il existe plus d'une trentaine de tests ELISA différents pour la détection des anticorps anti-MVV ou anti-CAEV dans le sérum des moutons et des chèvres (13). La plupart du temps, il s'agit d'ELISA indirects (i-ELISA) mais 3 ELISA de compétition (c-ELISA) utilisant des anticorps monoclonaux ont été décrits (14-16, 21). Pour une moitié des i-ELISA, l'antigène est constitué de virus total, tandis que pour l'autre moitié, il s'agit de protéines recombinantes et/ou d'antigènes peptidiques synthétiques. Quelques uns de ces i-ELISA se sont révélés hautement spécifiques et sensibles quand ils ont été comparés à des épreuves de référence, western blot ou radio-immunoprécipitation (27, 38, 39). De même, comparé à la radio-immunoprécipitation, un c-ELISA a montré aux États-Unis, une grande sensibilité et une grande spécificité tant avec les sérums de moutons que les sérums de chèvres, ce qui laisse à penser que ce c-ELISA seul pourrait être employé aux États-Unis pour la surveillance à la fois du MV et de la CAE (15, 16). Bien que les tests ELISA aient été employés pendant de nombreuses années dans plusieurs pays européens (33) dans des programmes de contrôle et d'éradication du MV chez les moutons (29) et de la CAE chez les chèvres, l'IDG reste le test le plus fréquemment utilisé.

1 Ce virus est distribué par le Dr Howard Lemkuhl, National Animal Disease Center, United States Department of Agriculture, P.O. Box 70, Ames, Iowa, USA.

Les antigènes sont préparés à partir de virus complets par centrifugation différentielle du surnageant de cultures cellulaires infectées et par traitement avec des détergents des virus purifiés ; les microplaques sont alors sensibilisées avec ces antigènes (12, 42, 46). Les préparations à partir de virus complet doivent contenir les deux protéines gp135 et p28. Les antigènes recombinants ou les peptides synthétiques sont en général produits à partir des gènes *gag* ou *enveloppe* (ou de segments de ces gènes) et peuvent être utilisés en association (27, 35, 38, 39). Ainsi, les produits obtenus à partir des gènes *gag* et *enveloppe* fusionnés avec la protéine de fusion glutathion S-transférase produite dans *Escherichia coli* constituent-ils une source régulière d'antigène pour les besoins de la distribution internationale et de la normalisation.

La technique ELISA est aussi applicable au colostrum ou au lait, et quelques études ont évalué son application sur des paires de prélèvements de sérum et de lait. Étant donné que les sources de la transmission du CAEV sont le colostrum et le lait, la recherche dans des échantillons de lait d'anticorps anti-CAEV ou anti-MVV pourrait ne pas fournir à temps l'information nécessaire à la prévention de la transmission du virus, particulièrement aux jeunes issus de la gestation en cours au moment du test (24).

L'ELISA est réalisé à température ambiante (~25 °C) et est facile à conduire dans les laboratoires équipés du matériel nécessaire (lecteur de microplaques) et possédant les réactifs requis. Ce test convient bien pour le dépistage à grande échelle (« screening »), particulièrement en diagnostic vétérinaire, et c'est une technique quantitative fiable pour la mise en évidence d'anticorps contre les SRLV chez les moutons et chez les chèvres. L'ELISA nécessite un antigène bien purifié. Un inconvénient de plusieurs tests ELISA est qu'ils n'ont pas été validés par comparaison avec une épreuve de référence telle que l'analyse par western blot ou la radio-immunoprécipitation. L'OIE recommande pour la validation de ces tests 1000 échantillons connus comme étant négatifs, 300 échantillons connus comme étant positifs et l'utilisation d'une épreuve de référence pour la comparaison telle que celles mentionnées au-dessus. A l'heure actuelle un seul test ELISA est en conformité avec ces normes de validation (46).

Pour l'i-ELISA, les puits de la microplaque sont sensibilisés avec l'antigène. Les sérums dilués sont ajoutés dans les puits et réagissent avec les antigènes liés au support solide. Le matériel qui ne s'est pas lié est éliminé par lavage après une période d'incubation définie. Le conjugué (par ex. sérum ou immunoglobuline (Ig) anti-Ig de ruminant, marqué à la peroxydase) réagit avec les anticorps spécifiques liés à l'antigène. Le conjugué qui n'a pas réagi est éliminé par lavage après le temps d'incubation défini. Le substrat de l'enzyme est ajouté. Le taux de transformation du substrat est proportionnel à la quantité d'anticorps qui se sont liés. La réaction est stoppée au bout du temps nécessaire et l'intensité de la couleur qui s'est développée est mesurée au spectrophotomètre. Un inconvénient du i-ELISA est que les sérums doivent être dilués au 1/50 ou plus afin de réduire le nombre de faux positifs.

Des anticorps monoclonaux (AcM) spécifiques ont été utilisés dans un c-ELISA SRLV pour capturer les protéines gp135 et p28 (14-16, 21, 32) : ce c-ELISA surmonte ainsi le problème de la pureté de l'antigène, la spécificité du test ne dépendant que de l'épitope de l'anticorps monoclonal utilisé. Dans le c-ELISA, les échantillons de sérums (anticorps anti-SRLV) empêchent la liaison de l'AcM conjugué à une enzyme avec l'antigène SRLV fixé sur les puits de la microplaque. La fixation de l'AcM conjugué est détectée par addition d'un substrat de l'enzyme et la coloration produite par un chromogène est mesurée. Une forte coloration indique qu'il y a peu ou pas d'inhibition de la fixation de l'AcM et donc l'absence d'anticorps SRLV dans le sérum. Inversement, une faible coloration sera due à l'inhibition de la fixation de l'AcM marqué sur l'antigène (phase solide), et indiquera la présence dans les sérums d'anticorps anti-SRLV. Le c-ELISA nécessite donc que les anticorps présents dans le sérum se fixent sur ou à proximité de l'épitope reconnu spécifiquement par l'AcM.

- **Matériel et réactifs**

Plaques de microtitrage de 96 puits à fond plat, fraîchement sensibilisées avec l'antigène SRLV, ou sensibilisées à l'avance et séchées ; lecteur de microplaques (filtres à 405, 450, 490 et 620 nm) ; incubateur-chambre humide à 37 °C ; micropipettes de 1, 8 et 12 canaux avec pointes en plastique jetables ; agitateur de microplaques (optionnel) ; réfrigérateur ; congélateur.

Sérums témoins positif et négatif ; conjugué (par ex. anticorps anti-immunoglobuline de ruminant marqués à la peroxydase) ; solution de dilution concentrée 10× (ex. solution physiologique tamponnée au phosphate [PBS]/Tween) ; eau distillée ; solution de lavage 10× ; substrat ou chromogène (par ex. ABTS [2,2'-azino-bis-(acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)] ou TMB [3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine]) ; solution d'arrêt (par ex. détergent, acide sulfurique).

- **ELISA indirect : protocole**

i) Amener les échantillons de sérums et les sérums témoins à la dilution appropriée (par ex. 1/20) et distribuer 0,1 à 0,2 ml par puits (en double si ELISA biphasique). Les sérums témoins sont des sérums positifs et négatifs fournis par le fabricant, et un sérum positif de référence interne provenant du laboratoire pour comparer les titres d'un test à l'autre.

- ii) Couvrir les plaques avec un couvercle et incuber à température de la pièce ou à 37 °C pendant 30 à 90 min. Vider les puits et rincer trois fois avec la solution de lavage à température ambiante.
- iii) Ajouter la dilution appropriée de conjugué, fraîchement préparée, dans les puits (0,1 ml par puits). Couvrir chaque plaque et incuber comme dans l'étape ii. À nouveau laver 3 fois.
- iv) Ajouter dans chaque puits 0,1 ml de solution de substrat-chromogène préparée extemporanément ou prête à l'emploi (par ex. ABTS en tampon phosphate citrate, pH 5,0, et la solution à 30 % de H₂O₂ [0,1 µl/ml]).
- v) Agiter doucement la plaque ; après incubation, stopper la réaction en ajoutant à chaque puits la solution d'arrêt (par ex. 0,1 ml d'acide sulfurique dilué).
- vi) Lire l'absorbance (=DO, densité optique) de chaque puits au moyen du lecteur de microplaques à 405 nm (ABTS) ou 450–620 nm (TMB). Ces valeurs de DO sont utilisées pour calculer les résultats.
- vii) *Interprétation des résultats*

Pour les kits de diagnostic disponible dans le commerce, les interprétations et les critères de validation sont indiqués avec le kit.

Par exemple : calculer l'absorbance moyenne (Ab) du sérum, des sérums témoins positifs (Ab_{pos}) et négatif (Ab_{neg}) et pour chaque sérum calculer le pourcentage :

$$\frac{Ab - Ab_{neg}}{Ab_{pos} - Ab_{neg}} \times 100$$

Interpréter les résultats comme suit :

Pourcentage < 30 %	sérum négatif
Pourcentage 30 à 40 %	sérum douteux
Pourcentage > 40 %	sérum positif

- **ELISA de compétition : protocole**

- i) Ajouter 0,05 ml de sérum non dilué et des sérums témoins positif/négatif dans les puits correspondants de la plaque sensibilisée par l'antigène.
- ii) Incuber 1 h à température ambiante.
- iii) Vider la plaque et laver trois fois avec la solution de lavage diluée.
- iv) Ajouter dans chaque puits 0,05 ml de solution d'anticorps conjugué à la peroxydase. Mélanger bien et incubé 30 min à température de la pièce.
- v) Après une incubation de 30 min, vider la plaque et répéter l'opération de lavage comme dans l'étape iii.
- vi) Ajouter 0,05 ml de solution de substrat (ex : TMB) dans chaque puits. Mélanger doucement et couvrir la plaque avec une feuille d'aluminium (à l'abri de la lumière). Incuber 20 min à température ambiante. Ne pas vider les puits.
- vii) Ajouter 0,05 ml de solution d'arrêt dans chaque puits. Mélanger doucement. Ne pas vider les puits.
- viii) Immédiatement après ajout de la solution d'arrêt, les plaques doivent être lues sur le lecteur de plaques (à 620, 630 ou 650 nm).
- ix) *Interprétation des résultats*

Exemple de calcul : $100 - [(DO \text{ échantillon} \times 100) / (DO \text{ moyenne du témoin négatif})] = \% \text{ d'inhibition}$.

Pour les chèvres, un sérum est positif s'il cause > 33,2 % d'inhibition ; s'il cause < 33,2 % inhibition, il est négatif. Pour les moutons, un sérum est positif s'il cause > 20,9 % d'inhibition ; il est négatif s'il cause < 20,9 % d'inhibition.

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

Il n'y a pas de produits biologiques disponibles. Des anticorps monoclonaux reconnaissant des épitopes conformationnels de la glycoprotéine d'enveloppe de CAEV, gp135, ont été décrits (32).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ADAMS D.S. & GORHAM J.R. (1986). The gp135 of caprine arthritis encephalitis virus affords greater sensitivity than the p28 in immunodiffusion serology. *Res. Vet. Sci.*, **40**, 157–160.
2. ADAMS D.S., KLEVJER-ANDERSON P., CARLSON J.L., MCGUIRE T.C. & GORHAM J.R. (1983). Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am. J. Vet. Res.*, **44**, 1670–1675.
3. ALVAREZ V., ARRANZ J., DALTABUIT M., LEGINAGOIKOA I., JUSTE R.A., AMORENA B., DE ANDRES D., LUJAN L.L., BADIOLA J.J. & BARRIATUA E. (2006). PCR detection of colostrum-associated Maedi-Visna virus (MVV) infection and relationship with ELISA-antibody status in lambs. *Res. Vet. Sci.*, **80**, 226–234.
4. BANKS K.L., ADAMS D.S., MCGUIRE T.C. & CARLSON J. (1983). Experimental infection of sheep by caprine arthritis-encephalitis virus and goats by progressive pneumonia virus. *Am. J. Vet. Res.*, **44**, 2307–2311.
5. CORK L.C. (1990). Pathology and epidemiology of lentiviral infection of goats. In: *Maedi-Visna and Related Diseases*, Petursson G. & Hoff-Jørgensen R., eds. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, 119–127.
6. CRAWFORD T.B. & ADAMS D.S. (1981). Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected goat populations. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **178**, 713–719.
7. CRAWFORD T.B., ADAMS D.S., CHEEVERS W.P. & CORK L. C. (1980). Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science*, **207**, 997–999.
8. CUTLIP R.C., JACKSON T.A. & LAIRD O.A. (1977). Immunodiffusion test for ovine progressive pneumonia. *Am. J. Vet. Res.*, **38**, 1081–1084.
9. CUTLIP R.C., LEHMKUHL H.D., BROGDEN K.A. & MCCLURKIN A.W. (1986). Vasculitis associated with ovine progressive pneumonia virus infection in sheep. *Am. J. Vet. Res.*, **46**, 61–64.
10. CUTLIP R.C., LEHMKUHL H.D., WOOD R.L. & BROGDEN K.A. (1985). Arthritis associated with ovine progressive pneumonia. *Am. J. Vet. Res.*, **46**, 65–68.
11. DAWSON M. (1985). The detection of precipitating antibodies to lentivirus antigens in goat sera using two immunodiffusion assays. In: *Slow Viruses in Sheep, Goats and Cattle*, Sharp J.M. & Hoff-Jørgensen R., eds. Commission of the European Communities, EUR 8076, 233–238.
12. DAWSON M., BIRONT P. & HOUWERS D.J. (1982). Comparison of serological tests used in three state veterinary laboratories to identify maedi-visna virus infection. *Vet. Rec.*, **111**, 432–434.
13. DEANDRES D., KLEIN D., WATT N.J., BERRIATUA E., TORSTEINSDOTTIR S., BLACKLAWS B.A. & HARKISS G.D. (2005). Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Vet. Microbiol.*, **107**, 49–62.
14. FREVEREIRO M., BARROS S. & FUGULHA T. (1999). Development of a monoclonal antibody blocking-ELISA for detection of antibodies against Maedi-Visna virus. *J. Virol. Methods*, **81**, 101–108.
15. HERRMANN L.M., CHEEVERS W.P., MCGUIRE T.C., ADAMS D.S., HUTTON M.M., GAVIN W.G. & KNOWLES D.P.A. (2003a). A competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA) for detection of serum antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV): a diagnostic tool for successful eradication. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **10**, 267–271.
16. HERRMANN L.M., CHEEVERS W.P., MARSHALL K.L., MCGUIRE T.C., HUTTON M.M., LEWIS G.S., KNOWLES D.P. (2003b). Detection of serum antibodies to ovine progressive pneumonia virus in sheep by using a caprine

- p>arthrits-encephalitis virus competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay.
- Clin. Diagn. Lab. Immunol.*
- ,
- 10**
- , 862–865.
17. HERRMANN L.M., HOTZEL I., CHEEVERS W.P., ON TOP K.P., LEWIS G.S. & KNOWLES D.P. (2004). Seven new ovine progressive pneumonia virus (V) field isolates from Dubois Idaho sheep comprise part of OPPV clade II based on surface envelope glycoprotein (SU) sequences. *Virus Res.*, **102**, 215–220.
 18. HERRMANN L.M., MCGUIRE T.C., HOTZEL I., LEWIS G.S. & KNOWLES D.P. (2005). The surface envelope glycoprotein (SU) is B-lymphocyte immunodominant in sheep naturally infected with ovine progressive pneumonia virus (OPPV). *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **12**, 797–800.
 19. HERRMANN-HOESING L.M., WHITE S.N., LEWIS G.S., MOUSEL M.R. & KNOWLES D.P. (2007). Development and validation of an ovine progressive pneumonia virus quantitative PCR. *Clin. Vacc. Immunol.*, **14**, 1274–1278.
 20. HOUWERS D.J., GIELKENS A.L.J. & SCHAAKE J. (1982). An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to maedi-visna virus. *Vet. Microbiol.*, **7**, 209.
 21. HOUWERS D.J. & SCHAAKE J. (1987). An improved ELISA for the detection of antibodies to ovine and caprine lentiviruses, employing monoclonal antibodies in a one-step assay. *J. Immunol. Methods*, **98**, 151–154.
 22. JOHNSON L.K., MEYER A.L. & ZINK M.C. (1992). Detection of ovine lentivirus in seronegative sheep by *in situ* hybridization, PCR and cocultivation with susceptible cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **65**, 254–260.
 23. KARR B.M., CHEBLOUNE Y., LEUNG K. & NARAYAN O. (1996). Genetic characterization of two phenotypically distinct North American ovine lentiviruses and their possible origin from caprine-arthritis encephalitis virus. *Virology*, **225**, 1–10.
 24. KNOWLES D.P. (1997). Laboratory diagnostic tests for retrovirus infections of small ruminants. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, **13**, 1–11.
 25. KNOWLES D.P., EVERMANN J.F., SCHROPSHIRE C., VANDER SCHALIE J., BRADWAY D., GEZON H.M. & CHEEVER W.P. (1994). Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine-arthritis encephalitis virus. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 243–245.
 26. KNOWLES D., CHEEVERS W., MCGUIRE T., STEM T. & GORHAM J. (1990). Severity of arthritis is predicted by antibody response to gp135 in chronic infection with caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Virol.*, **64**, 2396–2398.
 27. KWANG J., KEEN J., CUTLIP R.C. & LITTLEDIKE E.T. (1993). Evaluation of an ELISA for detection of ovine progressive pneumonia antibodies using a recombinant transmembrane envelope protein. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **5**, 189–193.
 28. LEROUX C., CHASTANG J., GREENLAND T. & MORNEX J.F. (1997). Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Arch. Virol.*, **142**, 1125–1137.
 29. MOTH A.M.J. & RALSTON J.C. (1994). Evaluation of ELISA for detection of antibodies to CAE in milk. *Vet. Microbiol.*, **38**, 359–367.
 30. OLIVER R.E., GORHAM J.R., PARISH S.F., HADLOW W.J. & NARAYAN O. (1981). Ovine progressive pneumonia: pathologic and virologic studies on the naturally occurring disease. *Am. J. Vet. Res.*, **42**, 1554–1559.
 31. OLIVER R.E., GORHAM J.R., PERRYMAN L.E. & SPENCER G.R. (1981). Ovine progressive pneumonia: experimental intrathoracic, intracerebral and intra-articular infections. *Am. J. Vet. Res.*, **42**, 1560–1564.
 32. OZYORUK F., CHEEVERS W.P., HULLINGER G.A., MCGUIRE T.C., HUTTON M. & KNOWLES D.P. (2001). Monoclonal antibodies to conformational epitopes of the surface glycoprotein of caprine arthritis-encephalitis virus: potential application to competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in goat sera. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **8**, 44–51.
 33. PÉPIN M., VITU C., RUSSO P., MORNEX J.F. & PETERHANS E. (1998). Maedi-visna virus infection in sheep: a review. *Vet. Res.*, **29**, 341–367.

34. PETERHANS E., GREENLAND T., BADIOLA J., HARKISS G., BERTONI G., AMORENA B., ELIASZEWICZ M., JUSTE R., KRASSNIG R., LAFONT J.P., LENIHAN P., PETURSSON G., PRITCHARD G., THORLEY G., VITU C., MORNEX J.F. & PÉPIN M. (2004). Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet. Res.*, **35**, 257–274.
35. POWER C., RICHARDSON S., BRISCOE M. & PASICK J. (1995). Evaluation of two recombinant Maedi-Visna virus proteins for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to ovine lentiviruses. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **2**, 631–633.
36. RIMSTAD E., EAST N., DEROCK E., HIGGINS J. & PEDERSEN N.C. (1994). Detection of antibodies to caprine arthritis/encephalitis virus using recombinant gag proteins. *Arch. Virol.*, **134**, 345–356.
37. ROLAND M., MOONEY J., VALAS S., PERRIN G. & MAMOUN R.Z. (2002). Characterization of an Irish caprine lentivirus strain-SRLV phylogeny revisited. *Virus Res.*, **85**, 29–39.
38. ROSATI S., KWANG J., TOLARI F. & KEEN J.E. (1994). A comparison of whole virus and recombinant transmembrane ELISA and immunodiffusion for detection of ovine lentivirus antibodies in Italian sheep flocks. *Vet. Res. Commun.*, **18**, 73–80.
39. SAMAN E., VAN EYNDE G., LUJAN L., EXTRAMANIA B., HARKISS G., TOLARI F., GONZALEZ L., AMORENA B., WATT N.J. & BADIOLA J.J. (1999). A new sensitive serological assay for detection of lentivirus infections in small ruminants. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **6**, 734–740.
40. SHAH C., BÖNI J., HUDER J.B., VOGT H.R., MÜLHERR J., ZANONI R., MISEREZ R., LUTZ H. & SCHÜPBACH J. (2004). Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. *Virology*, **319**, 12–26.
41. SHAW C.A., HUDER J.B., BÖNI J., SCHONMANN M., MÜLHERR J., LUTZ H. & SCHÜPBACH J. (2004). Direct evidence for natural transmission of small ruminant lentiviruses of subtype A4 from goats to sheep and vice versa. *J. Virol.*, **78**, 7518–7522.
42. SIMARD C.L. & BRISCOE M.R. (1990). An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to maedi-visna virus in sheep. A simple technique for production of antigen using sodium dodecyl sulfate treatment. *Can. J. Vet. Res.*, **54**, 446–450.
43. SIMARD C.L. & BRISCOE M.R. (1990). An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to Maedi-visna virus in sheep. Comparison to conventional agar gel immunodiffusion test. *Can. J. Vet. Res.*, **54**, 451–456.
44. TERPSTRA C. & DE BOER G.F. (1973). Precipitating antibodies against maedi-visna virus in experimentally infected sheep. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, **43**, 53–62.
45. VALAS S., BENOIT C., GUIONAUD C., PERRIN G. & MAMOUN R.Z. (1997). North American and French caprine arthritis-encephalitis viruses emerge from ovine maedi-visna viruses. *Virology*, **237**, 307–318.
46. ZANONI R.G., VOGT H.R., POHL B., BOTTCHE J., BOMMELI W. & PETERHANS E. (1994). An ELISA based on whole virus for the detection of antibodies to small-ruminant lentiviruses. *J. Vet. Med. B*, **41**, 662–669.
47. ZANONI R.G. (1998). Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. *J. Gen. Virol.*, **79**, 1951–1961.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour l'arthrite/encéphalite caprine et le Maedi-visna (se reporter à la liste dans la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour la liste la plus récente : www.oie.int).