

ENCÉPHALOMYÉLITE À TESCHOVIRUS

(anciennement encéphalomyélite à entérovirus ou maladie de Teschen/Talfan)

RÉSUMÉ

L'encéphalomyélite à Teschovirus, anciennement dénommée maladie de Teschen/Talfan (ou encéphalomyélite à entérovirus) a été d'abord décrite comme une encéphalomyélite du porc particulièrement virulente à issue souvent fatale. L'agent étiologique est un Teschovirus porcin de sérotype 1 (PTV-1 pour Porcine Teschovirus-1) du genre Teschovirus de la famille des Picornaviridae. Des formes moins sévères de la maladie ont été décrites tout d'abord au Royaume-Uni, où elle est connue sous le nom de « maladie de Talfan » ou sur le continent européen sous celui de « Poliomyelitis suum » ou parésie enzootique bénigne. En plus des souches virales de type PTV-1, des formes plus atténuées de la maladie sont associées à d'autres sérotypes de PTV, comme les PTV-2, -3, -4, -5, -6, -9 et 10.

La maladie a été décrite pour la première fois à Teschen en Tchécoslovaquie en 1929. Dans les années 1940 et 1950, elle a été à l'origine de pertes sévères en Europe, et s'est étendue aux autres continents. La forme clinique est devenue rare à l'heure actuelle et n'a pas été signalée en Europe de l'Ouest depuis 1980. Cependant, des enquêtes sérologiques indiquent que des variants de virus peu ou pas pathogènes circulent toujours parmi les populations porcines.

Identification de l'agent pathogène : *le virus présente une affinité pour le système nerveux central, par conséquent des broyats de cerveau ou de moelle épinière sont utilisés comme inoculum pour l'isolement viral. Le virus se cultive sur tapis cellulaire en monocouche d'origine porcine, notamment à partir de tissu rénal. L'effet cytopathogène (ECP) du PEV est caractérisé par la présence de cellules arrondies et réfringentes. L'identification du PEV et des différents sérotypes est basée sur l'utilisation de sérums spécifiques ou d'anticorps monoclonaux préparés contre les différentes souches de référence de PTV. Les tests de neutralisation virale ou de détection par immunofluorescence indirecte sont les plus indiquées. Une réaction d'amplification en chaîne par polymérase ciblant une partie du génome viral existe mais, à ce jour, aucun test spécifique n'a été formellement accepté pour le diagnostic.*

Épreuves sérologiques : *en raison de la prévalence sérologique vis-à-vis du PTV-1 qui peut dépasser 60 % dans des populations de porcs sains en Europe centrale et de la présence de signes cliniques similaires dus à d'autres virus, incluant d'autres sérotypes de PTV, une simple recherche d'anticorps positive ne permet pas de conclure que les signes neurobiologiques observés sont vraiment dus à une infection par le PTV-1. Pour considérer le virus PTV-1 comme l'agent infectieux responsable de la maladie clinique, il faut avoir une augmentation de l'ordre de 4 fois du titre en anticorps, associée aux signes typiques. La séroneutralisation virale (SN) en microplaques ou la méthode immuno-enzymatique (ELISA) sont les épreuves de détection d'anticorps recommandées pour la réalisation d'enquêtes sérologiques spécifiques du PTV-1 au sein de populations porcines.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *quand la maladie clinique était fréquente, des vaccins étaient utilisés. Maintenant que les cas de maladie sont rares, il n'existe plus de vaccins disponibles.*

A. INTRODUCTION

L'encéphalomyélite à *Teschovirus* (anciennement maladie de Teschen/Talfan puis, ensuite, encéphalomyélite à entérovirus) présente une forme aiguë chez le porc caractérisée par des désordres du système nerveux central (SNC). Teschen est le nom de la ville de la République Tchèque où la maladie a été décrite pour la première fois en 1929 (4, 5). Dans les années 1950, la maladie a diffusé à travers l'Europe et a causé d'énormes pertes à l'élevage porcin. Des formes moins sévères, d'expression enzootique bénigne, ont été reconnues tout d'abord au Royaume-Uni sous le nom de maladie de Talfan et au Danemark, sous celui de « *Poliomyelitis suum* ». L'encéphalomyélite à *Teschovirus* n'a pas été signalée en Europe occidentale depuis 1980 (en Autriche) et elle est considérée comme rare à l'heure actuelle. Au cours des douze dernières années (depuis 1996) la maladie n'a été rapportée à l'OIE que par les pays suivants : Belarus (1996, 1999 et 2005), Japon (2002), Lettonie (1997 et 2000–2002), Madagascar (1996–2000, 2002 and 2004–2005), Moldavie (2002–2004), Roumanie (2002), Russie (2004), Ouganda (2001) et Ukraine (1996–2005). Dans la plupart des cas, il n'est pas possible de savoir si le diagnostic a été porté sur la base des seuls signes cliniques ou s'il y a eu confirmation par le laboratoire, excepté au Japon en 2002 (17).

L'agent causal de l'encéphalomyélite à teschovirus est le teschovirus porcin de sérotype 1 (PTV-1 pour *Porcine Teschovirus*-1) qui appartient à l'espèce *Teschovirus* porcin, du genre *Teschovirus*, de la famille des *Picornaviridae* (2, 5). Auparavant, les PTV étaient classés parmi les *Enterovirus* et les 11 sérotypes des entérovirus porcins, PEV-1 à PEV-11, étaient regroupés en 3 groupes – I, II et III – sur la base de l'effet cytopathogène (ECP) observé, de leur culture sur des types cellulaires différents, et des réactions sérologiques (7). Le groupe I est composé des sérotypes PEV-1 à PEV-7 et PEV-11 à PEV-13. Sur la base des séquences nucléotidiques et des analyses phylogénétiques, les virus du groupe I des PEV sont maintenant classés parmi les *Teschovirus*. Les PEV-1 à PEV-7 ont été renommés PTV-1 à PTV-7 et les PEV-11 à 13 ont été renommés PTV-8 à PTV-10 ; un sérotype supplémentaire, PTV-11, a été décrit récemment (8, 14). Le groupe II contient le PEV-8 (espèce *Porcine enterovirus A*) et le groupe III, les sérotypes PEV-9 et -10 (espèce *Porcine enterovirus B*). Ces deux derniers groupes appartiennent au genre *Enterovirus* (14, 18) bien qu'il ait été suggéré de reclasser le PEV-8 dans un nouveau genre de picornavirus (8).

Les PTV-2, -3, -4, -5, -6, -9 et -10 ont été isolés de porcs présentant des formes atténuées de la maladie (16). Les infections dues aux PTV sont souvent asymptomatiques. Les sérotypes peuvent être différenciés en utilisant un test de séroneutralisation virale (SN) (2, 7), un test de fixation du complément (6) ou par immunofluorescence indirecte (IFI) (1, 13).

Les infections à PTV se développent uniquement chez les suidés ; les autres espèces animales ne sont pas connues comme étant sensibles.

Le diagnostic différentiel doit être fait avec la maladie d'Aujeszky (pseudo-rage) et la peste porcine classique (forme aiguë). En outre, l'encéphalite japonaise, l'infection à *Streptococcus suis* et les encéphalomyélites à virus hémagglutinants peuvent à l'occasion entraîner des symptômes similaires. Des étiologies non infectieuses, notamment des intoxications, peuvent aussi être prises en considération.

Les PTV peuvent être identifiés par la sérologie et des sérums spécifiques de référence ont été préparés par hyperimmunisation de cobayes, lapins, ou de porcelets indemnes d'immunité maternelle (privés de colostrum) avec des souches de référence des sérotypes de PTV-1 à 11.

Le porc s'infecte par voie oronasale. La période d'incubation est d'environ 14 jours. Les principaux signes de l'état prodromique sont de l'hyperthermie jusqu'à 41,5 °C, de la lassitude, de l'anorexie et des problèmes locomoteurs. Cette étape est suivie par une hypersensibilité, des tremblements, des spasmes des membres, une paralysie flaque, de l'opisthotonos et du nystagmus. Des convulsions peuvent être observées chez les jeunes cochons. En phase clinique terminale, il est observé de la paralysie démarrant de la zone lombaire et évoluant progressivement vers la partie antérieure du sujet. La paralysie du centre de thermorégulation provoque une hypothermie. Quand les muscles respiratoires sont paralysés, l'animal meurt de suffocation.

Le diagnostic de laboratoire est basé sur la présence de signes cliniques typiques associés à des lésions histologiques du cerveau et de la moelle épinière, ainsi que sur l'identification du virus à partir du SNC des porcs affectés et la détection d'anticorps spécifiques dans le sang des animaux convalescents.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Examen histologique et immunohistochimie

Pour un diagnostic histologique, des échantillons de cerveau, cervelet, diencéphale, bulbe rachidien et de la moelle épinière cervicale ou lombaire sont prélevés. Les échantillons sont fixés au formol et les coupes réalisées sont colorées selon les méthodes histologiques conventionnelles. Le virus se multiplie dans le SNC en provoquant une polio-encéphalomyélite non suppurative avec une infiltration périvasculaire de lymphocytes, en particulier au niveau de la moelle épinière (4). Des modifications pathologiques sont observées dans la matière grise du diencéphale, du cervelet, du bulbe rachidien et des cornes ventrales de la moelle épinière (notamment, de façon constante, les ganglions des racines des nerfs dorsaux et trijumeaux [ganglioneurites]), et dans une moindre mesure des hémisphères cérébraux. Chez les très jeunes animaux, les lésions peuvent toucher aussi les cornes dorsales de la moelle épinière. La dégénérescence des neurones (épaississement, chromatolyse, nécrose, neurophagie et dégénérescence axonale) et leur remplacement par microgliose (astrobytose, astrogliose) sont observés pendant la phase terminale de la maladie.

La détection des antigènes des teschovirus par immunohistochimie sur coupe de prélèvements de SNC fixés est très délicate et n'est pas toujours possible. Si des anticorps spécifiques ou des anticorps monoclonaux sont disponibles, ainsi que les techniques de détection appropriées, une corrélation entre les modifications pathologiques observées et la localisation de l'agent est possible sur des coupes paraffinées de prélèvements de SNC fixés.

2. Identification de l'agent pathogène

a) Isolement viral

Les progrès dans le diagnostic de l'encéphalomyélite à teschovirus et dans la production de vaccins ont été rendus possible par la multiplication du virus sur culture cellulaire (9, 11).

Des échantillons de cerveau et de moelle épinière sont récoltés à partir de porcs abattus au stade précoce de la maladie. Si les échantillons ne sont pas traités immédiatement, ils sont conservés dans une solution tamponnée faite à parts égales de solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) de pH 7,4 et de glycérol. Des morceaux de tissu sont broyés pour préparer une suspension à 10 % (poids/vol) dans du PBS. La suspension est centrifugée à 800 *g* pendant 10 min. et le liquide surnageant est utilisé pour l'inoculation des cultures cellulaires. Des cellules de première explantation de rein de porc en monocouche ou des lignées cellulaires établies d'origine porcine sont utilisables pour l'isolement viral des PTV.

- **Protocole**

- i) Un tapis cellulaire quasi confluent (monocouche) est utilisé en tube ou en flacons de culture cellulaire. Le milieu de culture est éliminé et les tubes ou flacons sont inoculés avec 0,1 ml du broyat tissulaire suspect.
- ii) Les tubes ou les microplaques inoculés sont incubés pendant 1 h à 37 °C sous agitation douce (tubes roulants ou balancelle).
- iii) L'inoculum est éliminé, et les tubes ou flacons de culture cellulaire sont rincés avec du PBS avant de les remplir avec 1 à 20 ml (selon le type de flacon de culture cellulaire utilisé) de milieu de survie sans sérum de veau.
- iv) Les tubes ou microplaques sont examinés au microscope chaque jour. Si l'échantillon contient du PTV, un ECP caractéristique est visible après 3 à 4 jours. L'ECP est caractérisé par de petits foyers de cellules rondes et réfringentes. Après plusieurs passages, le virus se multiplie mieux et génère des ECP complets dès 24 h. L'identification du PTV peut être confirmée par utilisation de sérum spécifique ou d'anticorps monoclonaux. La SN ou l'IFI sont les tests les mieux adaptés à cette fin. Quand, par identification sérologique, l'isolat a été confirmé être du PTV, l'inoculation à des porcelets est le seul moyen certain d'en vérifier la pathogénicité.

b) Le test de séroneutralisation virale pour l'identification du teschovirus porcin

Le virus récolté à partir de culture cellulaire est dilué dans le milieu de survie selon un pas de dilution de dix de 10^{-1} à 10^{-6} . Pour sérotyper le teschovirus, 12 rangées de chaque dilution sont préparées ; 50 µl de sérum spécifique de référence anti-PTV-1 à 11 dilué au 1/10 sont ajoutés aux rangées 1 à 11 et 50 µl de sérum négatif sont ajoutés dans la dernière rangée. Ces mélanges sont incubés pendant une nuit à 4 °C ou 1 h à 37 °C, puis inoculés sur un tapis cellulaire confluent dans des tubes de culture ou dans des puits de microplaques. Les cultures cellulaires inoculées sont incubées à 37 °C. La présence d'un ECP est recherchée après 72 h et chaque jour suivant jusqu'au 10^e jour, selon le jour où l'ECP apparaît.

L'identification d'un sérotype de PTV est confirmée si le titre viral observé en présence de cet antisérum est au moins 10^3 fois plus faible que le celui obtenu en présence de sérum négatif.

c) L'épreuve d'immunofluorescence indirecte pour la confirmation de la présence d'antigène de teschovirus porcin sur cellules

L'épreuve d'immunofluorescence indirecte (IFI) est basée sur la reconnaissance des antigènes présents dans des cellules infectées par des anticorps spécifiques d'un sérum positif (13). Grâce à l'utilisation d'antiglobulines conjuguées à de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), la réaction est visualisée en microscopie à UV ou utilisant une source lumineuse bleue. Les antigènes sont détectables dans les cellules dès 12 h après l'infection par le PTV, c'est-à-dire avant le début de l'ECP. Les sérums polyclonaux montrent souvent des réactions croisées entre les différents types de PTV, qui peuvent conduire à des erreurs d'interprétation.

- **Protocole**

- i) Le matériel suspect est inoculé sur une lamelle recouverte d'un tapis de cellules rénales porcines. Il est recommandé d'introduire et de traiter des témoins positif et négatif en parallèle des échantillons à tester.
- ii) Après une incubation de 12 à 16 h, les lamelles sont lavées 2 fois au PBS, séchées à l'air puis fixées avec de l'acétone froid pendant 5 à 15 min.
- iii) Les lamelles sont placées dans une boîte humide et recouvertes avec du sérum de porc ou de lapin anti-PTV préalablement dilué au 1/10 dans du PBS ou avec un anticorps monoclonal spécifique à sa dilution de travail.
- iv) La boîte humide est fermée et mise à incuber à 37 °C pendant 60 min.
- v) Les lamelles sont ensuite retirées et lavées 3 fois avec du PBS, puis recouvertes avec un sérum de chèvre anti-lapin ou anti-porc conjugué FITC, à une dilution déterminée au préalable, puis incubées à 37 °C pendant 30 min.
- vi) Les lames sont ensuite lavées 3 fois avec du PBS, séchées à l'air et montées dans du tampon Tris 0,1 M - glycérol, pH 8,6.

Après ce traitement, les lamelles sont observées au microscope. Les lamelles témoins sont examinées en premier pour valider la spécificité de la fluorescence observée. La fluorescence est de couleur vert pomme et apparaît dans le cytoplasme et à la périphérie du noyau. À la place de lamelles, on peut aussi utiliser des inserts pour chambre de culture cellulaire multipuits, ou des microplaques.

d) La technique de la transcription inverse couplée à une amplification en chaîne par polymérase

La transcription inverse couplée à une amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) permet la détection et la différenciation de régions spécifiques du génome des teschovirus porcins (12, 19). La RT-PCR nichée utilisant des sondes spécifiques est utilisée pour différencier les virus entre les PTV et les PEV (19). La PCR est plus rapide et moins laborieuse que l'isolement viral sur culture cellulaire et l'identification du virus par sérotypage. Toutefois la PCR est actuellement encore réservée à des laboratoires spécialisés.

3. Épreuves sérologiques

Comme la séroprévalence du PTV-1 peut dépasser 60 % dans des populations porcines saines de certains pays d'Europe centrale, et que les mêmes symptômes peuvent être dus à d'autres virus dont certains autres sérotypes de PTV, un résultat positif à une simple analyse sérologique pour le PTV-1 ne confirme pas que les signes nerveux observés sont réellement dus au PTV-1. La possibilité d'une infection à PTV-1 peut être prise en considération pour expliquer une expression clinique de la maladie seulement si en plus des signes typiques, on observe une augmentation de 4 fois le titre en anticorps spécifiques. L'existence de réactions croisées avec d'autres teschovirus orphelins est une des raisons pour laquelle l'analyse des sérums deux par deux est nécessaire pour confirmer la signification des titres en anticorps.

Les porcs qui ont guéri de la maladie ou ceux qui ne l'ont pas exprimée produisent des anticorps spécifiques. Des méthodes sérologiques sont disponibles pour leur détection, dont la SN en microplaque utilisant des cultures cellulaires de rein de porc qui est la plus utile (10). Une épreuve immuno-enzymatique (ELISA) a aussi été développée qui est plus sensible et plus rapide (3).

Pour la mise en œuvre du diagnostic sérologique, il est indispensable de disposer des souches de référence des différents sérotypes de PTV cultivées sur cellules et de sérum hyperimmun monospécifique de ces types de PTV.

- **Souches de référence de teschovirus porcins**

Caractéristiques : basée sur une longue expérience, la souche « Zabreh », isolée en Tchécoslovaquie au moment du pic d'incidence de la maladie, a été sélectionnée comme souche de référence pour générer une forme sévère d'encéphalomyélite à teschovirus. Le pouvoir pathogène de la souche est maintenu par passage intracérébral sur des porcelets privés de colostrum. Le virus génère des signes typiques d'encéphalomyélite à teschovirus après une période d'incubation de 5 à 7 jours. Pour le diagnostic sérologique, les souches de sérotypes de PTV à utiliser sont pour le type 1 : Talfan, pour le type 2 : T80, pour le type 3 : O2b, pour le type 4 : PS36, pour le type 5 : F26, pour le type 6 : PS37, pour le type 7 : F43, pour le type 8 : V13, pour le type 9 : Ger-2899/84, pour le type 10 : Ger-460/88, pour le type 11 : Dresden.

Stock viral : les souches de référence sont multipliées sur culture de cellules de première explantation de rein de porc ou sur lignée cellulaire établie, par exemple des PK-15. Une suspension à 10 % dans du PBS, pH 7,4, est préparée à partir du cerveau ou de la moelle épinière de porcelets infectés expérimentalement avec du PTV. Certains types sont isolés à partir des fèces. La suspension est centrifugée et le surnageant est utilisé pour inoculer les cultures. Le protocole de multiplication du PTV sur culture cellulaire est décrit ci-après :

Le milieu de culture est éliminé et après rinçage au PBS, les cellules sont inoculées avec la suspension virale à 37 °C. Le volume de l'inoculum est environ 10 % du volume usuel de milieu de culture. Après 1 h d'incubation à 37 °C, l'inoculum est éliminé, le flacon de culture est rincé avec le PBS et le tapis cellulaire est recouvert du volume approprié de milieu sans sérum mais supplémenté en antibiotiques. L'ECP se développe dans les 48 h, et le tapis cellulaire se désintègre plus ou moins complètement pendant les 48 à 72 h suivantes. Après 3 à 5 passages consécutifs en culture cellulaire, le développement de l'ECP s'accélère et la concentration en virions augmente. Le titrage viral est réalisé dans des tubes de culture ou en microplaques. Une souche adaptée en culture cellulaire peut atteindre un titre de 10^6 – 10^7 DICT₅₀/ml (Dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire).

Le surnageant récolté est vérifié pour sa spécificité en utilisant des sérums hyperimmuns spécifiques connus. Un traitement avec 5 % de chloroforme ou un essai de culture sur cellules humaines, bovines ou d'embryons de poulet sont utilisés pour exclure une contamination par d'autres virus. Le PTV est résistant au chloroforme et se multiplie uniquement sur des cellules d'origine porcine. Une révélation par immunofluorescence est utile pour détecter de possibles contaminants qui sont résistants au chloroforme et qui se multiplient aussi sur cellules d'origine porcine (ex : le parvovirus), ou qui sont non-cytopathogènes. Le stock viral est distribué en petites fractions aliquotes qui sont conservées à une température inférieure à –60 °C. Le virus congelé conserve ses propriétés pendant plusieurs années. Pour une utilisation en neutralisation virale, une dose de virus constante de 100 DICT₅₀ est recommandée.

- **Sérum hyperimmun spécifique**

Un sérum hyperimmun spécifique est obtenu par immunisation répétée de cobayes, lapins ou porcelets privés de colostrum avec du PTV. Même si les animaux proviennent d'élevages exempts d'organismes pathogènes spécifiques, ils sont tout de même testés avant immunisation pour vérifier l'absence d'anticorps anti-PTV. Des souches de référence sont utilisées de préférence. Les lapins sont immunisés par administration intraveineuse de la suspension virale seule, ou par voies sous-cutanée ou intrapéritonéale en utilisant une suspension virale avec 10 % d'adjuvant huileux. De bons résultats peuvent être obtenus par administration de 3 doses de 2 ml de suspension virale + 0,2 ml d'adjuvant huileux à intervalle de 2 semaines. Les lapins sont saignés 10 jours après la dernière immunisation. Les porcelets sont immunisés de la même manière. Les sérums sont clarifiés par centrifugation et conservés en petites fractions aliquotes à –20 °C. Les sérums sont titrés par neutralisation virale en présence d'une dose constante de virus. Seuls les sérums dont le titre est supérieur au 1/256 peuvent être utilisés pour l'identification du virus.

a) Le test de séroneutralisation virale en microplaques

Le test est réalisé sur des microplaques de culture cellulaire à fond plat, en utilisant des cellules de première explantation de rein de porc d'un passage peu élevé, ou des lignées cellulaires d'origine porcine. Le stock viral est multiplié sur tapis cellulaire. Le virus récupéré à partir de cultures cellulaires est clarifié par centrifugation et conservé en fractions aliquotes à –20 °C. Le milieu de culture, comme du milieu complet de Eagle ou LYH (solution saline tamponnée de Hanks avec une solution d'extrait de levure, de lactalbumine et d'antibiotiques), est utilisé comme diluant. Le virus récolté des cultures cellulaires est clarifié par centrifugation et conservé en parties aliquotes à –70 °C, ou sous forme d'un mélange 50/50 avec du glycérol qui peut être conservé à –20 °C.

- **Protocole**

- i) Inactiver le sérum par la chaleur pendant 30 min à 56 °C.

- ii) Les sérums à tester sont dilués dans du milieu de culture cellulaire selon un pas de dilution de raison deux du 1/2 au 1/64, à raison de 4 puits par dilution et de 50 µl de volume par puits.
- iii) Les témoins incluent des sérums témoins positif et négatif, des contrôles cellulaires et de milieu.
- iv) Ajouter à chaque puits 50 µl de la dose à l'emploi, préalablement diluée dans du milieu de culture pour obtenir 100 DICT₅₀.
- v) Incuber pendant 1 h à 37 °C avec les plaques recouvertes. Le virus résiduel est incubé de la même manière.
- vi) Réaliser un titrage de la dose d'emploi selon un pas de dilution de raison dix en utilisant 50 µl par puits et 4 puits par dilution.
- vii) Ajouter 50 µl de suspension cellulaire de rein de porc à 5×10^5 cellules par ml.
- viii) Après agitation, les plaques sont recouvertes et mise à incuber à 37 °C sous une atmosphère à 5 % de CO₂ pendant 2 à 3 jours ou plus, jusqu'à un maximum de 8 jours.
- ix) Les plaques sont examinées au microscope pour rechercher l'ECP. Le test est validé par vérification du titrage de la dose à l'emploi et du titre du sérum témoin positif. Le titre du virus est de 100 DICT₅₀ avec une variation tolérable entre 30 et 300. Le titre du sérum témoin positif peut varier de 0,3 log₁₀ unités autour du titre moyen prédéterminé. Le sérum témoin négatif ne doit pas neutraliser le virus à sa plus faible dilution, ex : au 1/2.
- x) Le titre neutralisant est déterminé selon la méthode de Spearman-Kärber, comme étant la dilution du sérum qui neutralise le virus dans 50 % des puits.
- xi) Les titres en neutralisation virale sont considérés comme positifs si le sérum neutralise le virus à la dilution initiale supérieure au 1/8.

b) Épreuve immuno-enzymatique

La technique ELISA est une méthode alternative de détection des anticorps contre le PTV (3). Le test est réalisé en microplaques en utilisant du PTV cultivé sur cellules comme antigène. La technique peut être mise en œuvre en appliquant les étapes suivantes.

- **Préparation de l'antigène**

- i) Le stock de virus est préparé en culture cellulaire soit sur cellules de première explantation de rein ou de testicule de porc, soit sur lignée cellulaire établie comme, par exemple les cellules PK-15. Le milieu de croissance est retiré et après rinçage avec du tampon, les cellules sont inoculées avec la suspension virale à un faible taux de multiplicité d'infection. Après 30 min d'incubation à 37 °C, les cellules sont recouvertes d'un volume approprié de milieu sans sérum mais avec antibiotiques. L'incubation se poursuit à 37 °C avec observation quotidienne au microscope. L'ECP doit apparaître en 48 h et le tapis cellulaire doit être plus ou moins détruit au cours des 48-72 h suivantes. Une souche adaptée à la culture cellulaire peut donner des titres de 10⁶ à 10⁷ DICT₅₀ par ml.
- ii) Le virus récupéré est clarifié par centrifugation à 200 **g** pendant 15 min, puis précipité avec une solution saturée à 50 % de (NH₄)₂SO₄ pendant 120 min à 4 °C.
- iii) Après centrifugation à 2 000 **g**, le précipité récupéré est resuspendu dans du tampon TEN (Tris-hydroxyméthyl-méthylamine [0,01 M], éthylène diamine tétra-acétate [1 mM] et NaCl [0,15 M]), pH 7,4, au 1/100 du volume initial.
- iv) La suspension virale concentrée est extraite par agitation avec du fréon 3/1 pendant 10 min à 4 °C.
- v) Après une autre centrifugation, le surnageant est divisé en deux phases séparées. La phase aqueuse supérieure contenant l'antigène viral est dessalée par passage sur colonne en Sephadex G 25 de 2,5 × 40 cm.
- vi) La solution virale est finalement concentrée par ultracentrifugation à 160 000 **g** pendant 3 h.
- vii) Le culot est repris dans du tampon TEN, pH 7,4, sous un volume d'environ le millième du volume initial du virus.
- viii) Les protéines insolubles sont séparées par centrifugation douce et le surnageant est utilisé comme antigène positif en ELISA.

- **Protocole**

- les plaques sont sensibilisées en ajoutant 100 µl à chaque puits de l'antigène prédilué dans du PBS, pH 7,2. L'adsorption de l'antigène à la surface de la plaque se fait sur une nuit à 4 °C. Des rangées parallèles de la plaque sont sensibilisées avec de l'antigène négatif.
- La plaque est lavée 5 fois avec du PBS pour éliminer l'excès d'antigène.
- Les sérums à tester sont dilués au 1/20 dans du PBST (solution physiologique tamponnée au phosphate contenant 0,05 % de Tween 20). Chaque sérum dilué est déposé en 4 exemplaires à raison de 50 µl par puits : deux avec de l'antigène positif et deux pour l'antigène négatif (l'antigène négatif est préparé comme décrit ci dessus à l'exception que le tapis cellulaire n'est pas inoculé avec du virus et que les cellules sont éclatées par congélation). La plaque est incubée pendant 1 h à 37 °C.
- Les plaques sont lavées 5 fois avec du PBST.
- 50 µl d'une dilution préalablement déterminée de sérum de lapin anti-immunoglobulines de porcs conjugué à la peroxydase de raifort, sont ajoutés dans chaque puits. Les plaques sont à nouveau incubées pendant 1 h à température ambiante.
- Les plaques sont lavées 5 fois au PBS.
- 100 µl de la solution du substrat (0,1 % orthophenyl-endiamine et 0,03 % de peroxyde d'hydrogène dans du PBS, pH 6,0) sont ajoutés à chaque puits.
- Après l'ajout de substrat, les échantillons positifs changent de couleur et deviennent marron foncé. Quand la réaction colorée est suffisamment développée dans les puits contenant les sérums témoin positif, la réaction est arrêtée en ajoutant 50 µl d'acide sulfurique 2 M à chaque puits. L'absorbance dans les puits est mesurée à la longueur d'ondes de 492 nm, en utilisant de préférence un spectrophotomètre à multicanaux avec un système d'impression. Les sérums témoin positif et négatif et le témoin cellules non infectées sont traités de la même manière que les échantillons à tester.
- Le calcul de l'absorbance d'un sérum prend en compte la valeur moyenne des 2 puits avec antigène positif à laquelle est soustraite la valeur moyenne des 2 puits avec antigène négatif. Pour qu'un sérum soit considéré comme positif, la valeur calculée de l'absorbance doit excéder au moins de 2 fois la moyenne obtenue pour le sérum témoin négatif.

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

- **Vaccins anti-encéphalomyélite à teschovirus**

Lors de la période d'incidence la plus élevée en Europe et à Madagascar, une immunoprophylaxie active a été menée pour contrôler l'infection (15). Depuis que les formes cliniques sévères ont disparu, la vaccination est arrêtée et le vaccin n'est plus utilisé ni produit nulle part dans le monde.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AUERBACH J., PRAGER D., NEUHAUS S., LOSS U. & WITTE K.H. (1994). Grouping of porcine enteroviruses by indirect immunofluorescence and description of new serotypes. *J. Vet. Med. [B]*, **41**, 277–282.
- BETTS A.O. (1960). Studies on enteroviruses of the pig. VI. The relationship of the T 80 strain of a swine polioencephalomyelitis virus to some other viruses as shown by neutralization tests in tissue cultures. *Res. Vet. Sci.*, **1**, 296–300.
- HUBSCHLE O.J.B., RAJOANARISON J., KOKO M., RAKOTONDRAMARY E. & RASOLFOMANANA P. (1983). ELISA for detection of Teschen virus antibodies in swine serum samples. *Dtsch Tierarztl. Wochenschr.*, **90**, 86–88.
- KLOBOUK A. (1931). Encephalomyelitis enzootica suum. *Zverolekarsky obzor*, **24**, 436–480.
- KLOBOUK A. (1933). Aetiology of the so-called Teschen disease – Encephalomyelitis enzootica suum. *Zverolekarske rozpravy*, **8**, 85–96.

6. KNOWLES N.J. & BUCKLEY L.S. (1980). Differentiation of porcine enterovirus serotypes by complement fixation. *Res. Vet. Sci.*, **29**, 113–115.
7. KNOWLES N.J., BUCKLEY L.S. & PEREIRA H.G. (1979). Classification of porcine enteroviruses by antigenic analysis and cytopathic effects in tissue culture: description of 3 new serotypes. *Arch. Virol.*, **62**, 201–208.
8. KRUMBHOLZ A., DAUBER M., HENKE A., BIRCH-HIRSCHFELD E., KNOWLES N.J., STELZNER A. & ZELL R. (2002). Sequencing of porcine enterovirus groups II and III reveals unique features of both virus groups. *J. Virol.*, **76**, 5813–5821.
9. MADR V. (1959). Propagation of the Teschen disease virus in cell cultures. *Veterinarstvi*, **IX**, 298–301.
10. MAYR A. & BIBRACK B. (1971). Demonstration of Teschen Talfan infection using a micromodification of neutralization test. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, **18**, 657–664.
11. MAYR A. & SCHWOEBEL W. (1957). Propagation of the Teschen disease virus in porcine kidney cell cultures and properties of the cultured virus. 1.2.3. part. *Zentralbl. Bakteriol. [I. Orig.]*, **168**, 329–359.
12. PALMQUIST J., MUNIR S., TAKU A., KAPUR V. & GOYAL S.M. (2002). Detection of porcine teschovirus and enterovirus type II by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **14**, 476–480.
13. ROMANENKO V.F., PRUSS O.G., BELYI YU.A. & KUPNOVSKAYA L.V. (1982). Immunofluorescent diagnosis of porcine encephalomyelitis. *Veterinariia*, **4**, 69–72.
14. STANWAY G., BROWN F., CHRISTIAN P., HOVI T., HYYPIÄ T., KING A.M.Q., KNOWLES N.J., LEMON S.M., MINOR P.D., PALLANSCH M.A., PALMENBERG A.C. & SKERN T. (2005). Family *Picornaviridae*. In: Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U. & Ball L.A., eds. Elsevier/Academic Press, London, UK, 757–778.
15. TRAUB E. (1942). Active immunization against Teschen disease using vaccines adsorbed on aluminium hydroxide. *Arch. Tierheilkd*, **77**, 52–66.
16. WITTE VON K.H., AUERBACH J., LOSS K.U., NEUHAUS S. & PRAGER D. (1994). Typisierung von 17 porzinen Enterovirusisolationen aus Polioenzephalomyelitisfällen der Jahre 1983–1991. *DTW Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, **101**, 453–492.
17. YAMADA M., KOZAKURA R., Ikegami R., NAKAMURA K., KAKU Y., YOSHII M. & HARITANI M. (2004). Enterovirus encephalomyelitis in pigs in Japan caused by porcine teschovirus. *Vet. Rec.*, **155**, 304–306.
18. ZELL R., DAUBER M., KRUMBHOLZ A., HENKE A., BIRCH-HIRSCHFELD E., STELZNER A., PRAGER D. & WURM R. (2001). Porcine teschoviruses comprise at least eleven distinct serotypes: molecular and evolutionary aspects. *J. Virol.*, **75**, 1620–1631.
19. ZELL R., KRUMBHOLZ A., HENKE A., BIRCH-HIRSCHFELD E., STELZNER A., DOHERTY M., HOEY E., DAUBER M., PRAGER D. & WURM R. (2000). Detection of porcine enteroviruses by nRT-PCR: differentiation of CPE groups I–III with specific primer sets. *J. Virol. Methods*, **88**, 205–218.

*
* *