

GASTROENTÉRITE TRANSMISSIBLE

RÉSUMÉ

La gastroentérite transmissible (GET) est une maladie entérique des porcs provoquée par le virus de la GET (VGET), appartenant à la famille des Coronaviridae. Depuis 1984, un variant respiratoire distinct (le coronavirus respiratoire porcin ou CVRP) a émergé dans beaucoup de régions du monde. Ce virus est probablement un mutant de délétion du VGET. Le CVRP ne semble pas être un agent pathogène primaire important, mais il participe au complexe des maladies respiratoires du porc et a considérablement compliqué le diagnostic de la GET, en particulier le diagnostic sérologique.

Le diagnostic de laboratoire est réalisé en démontrant la présence du virus, des antigènes viraux ou de l'acide nucléique viral dans des prélèvements issus de cas suspectés, ou par détection des anticorps spécifiques.

Identification de l'agent pathogène : *le virus peut être identifié par isolement en culture de cellules, microscopie électronique, différentes épreuves immunologiques, et plus récemment par détection spécifique de l'ARN viral. Les épreuves rapides les plus généralement utilisées sont probablement les épreuves immunologiques, en particulier la méthode immuno-enzymatique (ELISA) sur fèces et les épreuves d'immunofluorescence sur des coupes d'intestin. Une autre maladie entérique, la diarrhée épidémique porcine, est provoquée par un coronavirus sérologiquement différent du VGET, mais qui montre une morphologie identique au microscope électronique. L'immunomicroscopie électronique permet de différencier ces virus.*

Épreuves sérologiques : *les méthodes les plus largement répandues sont la séroneutralisation et les tests ELISA. Seuls ces derniers permettent la différenciation avec le CVRP, car les anticorps dirigés contre le VGET et le CVRP montrent une réaction croisée totale en neutralisation.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : *il n'y a aucun produit biologique commercial disponible sur le marché international. Cependant, plusieurs pays pratiquent la vaccination, et aux États-Unis d'Amérique, des autorisations de mise sur le marché ont été accordées pour des vaccins mono- et multivalents.*

A. INTRODUCTION

La gastroentérite transmissible (GET) est une maladie entérique des porcs provoquée par le virus de la GET (VGET), un membre de la famille des *Coronaviridae*. Depuis 1984, un variant respiratoire distinct (le coronavirus respiratoire porcin ou CVRP) a émergé dans beaucoup de régions du monde et est maintenant détecté dans la plupart des pays où des études ont été menées, exception faite de l'Océanie. Les foyers de GET sont devenus plus sporadiques. La maladie est toujours signalée de façon occasionnelle en Europe, en Amérique du nord et en Asie (31). Le VGET se multiplie au niveau des entérocytes et les détruits, érodant l'intestin grêle, produisant une atrophie des villosités et une entérite. La diarrhée et le vomissement sont présents chez les porcs de tous les âges ; la mortalité est la plus élevée chez les nouveau-nés. Les sites de multiplication extra-intestinaux incluent le tractus respiratoire supérieur et les tissus mammaires (20), mais le virus est plus facilement isolé de l'intestin et des fèces. En revanche, le CVRP est plus facilement isolé du tractus respiratoire supérieur, de la trachée, des amygdales ou des poumons ; la multiplication entérique du virus est faible, voire absente (10, 32, 39), bien que le CVRP puisse être détecté par une réaction de transcription inverse suivie d'une amplification en chaîne par polymérase nichée (RT-PCR) dans les écouillons nasaux et les fèces de porcs infectés (9). Le CVRP est probablement un mutant de délétion de VGET (41), comme cela est confirmé par des données récentes comparant les séquences du génome complet de 30 kb du VGET et du CVRP (66).

La GET est une maladie contagieuse qui peut produire une épizootie explosive. Les méthodes de diagnostic rapide de confirmation sont très importantes. La maladie peut également prendre la forme d'un problème enzootique, de diarrhée post-sevrage circulant à bas bruit, ce qui est plus difficile à diagnostiquer. De même, une infection par le VGET qui survient dans un troupeau immunisé vis-à-vis du CVRP provoque des cas sporadiques plus bénins ce qui, dans ces cas, complique encore plus le diagnostic de la GET (22).

L'existence de réservoirs du VGET chez les animaux sauvages ou domestiques a été soupçonnée. Des carnivores domestiques ou sauvages (renards, chiens, voire visons) et les chats présentent des anticorps anti-VGET, ce qui suggère qu'ils pourraient être des porteurs asymptomatiques potentiels du virus et joueraient le rôle de réservoirs entre les épizooties saisonnières (hiver). Cependant l'infection des porcs n'a été confirmée que par des chiens infectés en série par le VGET et excréant le virus (46). Sur la base des similitudes génétiques et antigéniques, il a été proposé de considérer le VGET, le CVRP et les coronavirus félines et canins comme des descendants d'un coronavirus ancestral ayant muté dans son spectre d'hôtes. Des oiseaux sauvages (*Sturnus vulgaris*) et des mouches (*Musca domestica*) qui excrètent le VGET pendant respectivement 32 h et 72 h ont été proposés comme vecteurs mécaniques (46).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Le virus peut être identifié par isolement en culture de cellules (12), immunofluorescence, inhibition de l'hémagglutination, technique immuno-enzymatique (ELISA), radioimmunoessais (RIA), hybridation avec des sondes d'ADN, microscopie électronique, et, plus récemment, par détection spécifique de l'ARN viral (14, 21, 37, 46, 55, 64). Les techniques moléculaires développées ces dernières années, telles que la technique de transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) et la RT-PCR nichée, ont augmenté la sensibilité et la spécificité de la détection et de la différenciation du VGET avec le CVRP, directement à partir d'échantillons de terrain (9, 21, 22, 37). Une méthode de diagnostic alternative, qui a été recommandée pour des laboratoires ne possédant pas l'équipement pour les essais spécialisés, est l'infection par voie orale de porcelets sensibles et n'ayant pas d'anticorps anti-VGET ou anti-CVRP avec du contenu intestinal suspect. Cependant, des essais en laboratoire sont encore exigés pour confirmer la sensibilité des porcs avant l'inoculation et pour prouver que la maladie induite chez ces animaux est due à la GET. Les épreuves rapides les plus fréquemment utilisées sont probablement les immunodiagnostic, en particulier les tests ELISA sur les fèces (4, 25, 62) l'immunofluorescence (IF) sur des coupes d'intestin au cryostat (40), et l'immunohistochimie (IHC) sur des coupes formolées et fixées dans la paraffine (53) La détection du virus par inhibition de l'hémagglutination a également été décrite (1). Une autre maladie entérique, la diarrhée épidémique porcine (DEP), est provoquée par un coronavirus sérologiquement distinct qui, néanmoins, a un aspect identique en microscopie électronique. Par immuno-microscopie électronique, il est possible de différencier les deux infections (44, 61) comme cela se fait avec les épreuves de détection du virus de DEP (23).

a) Isolement de virus en culture de cellules

Indépendamment de l'inoculation des porcelets (12), l'isolement du virus en culture de cellules est la méthode de diagnostic de certitude. Cependant, pour une utilisation courante, elle est lente et laborieuse. Le VGET ne se multiplie pas très bien en culture de cellules, rendant cette technique impraticable comme procédure de diagnostic de routine. En outre, l'isolement du VGET à partir de porcs issus de troupeaux séropositifs vis-à-vis du CVRP pose problème et exige de placer des porcs séronégatifs vis-à-vis du VGET et du CVRP au sein des troupeaux suspects pour servir d'animaux sentinelles, à partir desquels les échantillons sont prélevés en vue de l'isolement ou la détection du VGET (9, 22). Le CVRP peut être isolé par culture tissulaire en utilisant des cellules et des techniques similaires à celles qui sont utilisées pour l'isolement du VGET, toutefois les échantillons suivants sont dans ce cas les plus optimaux : cellules ou fluides des muqueuses nasales, tissus de la trachée, des amygdales ou des poumons ou encore homogénats (9, 39).

L'isolement viral pour le VGET est habituellement effectué ante-mortem à partir des fèces ou *post mortem* à partir de l'intestin grêle. Des anses de l'intestin grêle, ligaturées à chaque extrémité pour maintenir le contenu ou des empreintes de la muqueuse intestinale sont les prélèvements de choix. Le virus est sensible à la chaleur, tous les échantillons devraient donc être frais ou maintenus au froid.

L'échantillon est homogénéisé dans du milieu de culture cellulaire ou dans une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS), pH 7,2 ; contenant des antibiotiques, par exemple de la pénicilline (1 000 U/ml), de la dihydrostéptomycine (1 000 µg/ml), et de la mycostatine (20 U/ml), pour obtenir une suspension à 10 %. Cette suspension peut rester 30 min à température ambiante hors de la lumière directe du soleil. La suspension est alors soniquée et clarifiée par centrifugation à vitesse réduite. Le surnageant

peut être mélangé à un volume égal de sérum bovin, inactivé par la chaleur, afin de réduire l'effet cytotoxique du matériel. Cette suspension est alors employée pour inoculer les cultures de cellules sensibles, telles que les monocouches de cellules de première ou seconde explantation de reins de porc de 3 à 4 jours. D'autres cultures cellulaires porcines (telles que thyroïde ou testicule) de faible nombre de passages et quelques lignées de cellules (17, 27) peuvent également être employées pour l'isolement primaire du virus. Après incubation à 37 °C pendant 1 h, les couches de cellules sont recouvertes avec du milieu, tel que le « Earle's yeast lactalbumine » (EYL), solution salée équilibrée, contenant du bicarbonate de sodium et des antibiotiques, par exemple de la pénicilline (100 U/ml), de la dihydrostreptomycine (100 µg/ml), de la mycostatine (20 U/ml), et 1 % de sérum foetal de veau. L'incorporation de trypsine dans le milieu de culture peut augmenter la production virale primaire (5, 17). Des cultures témoins non-inoculées sont réalisées parallèlement et toutes les cultures sont incubées à 37 °C.

On peut observer l'effet cytopathogène viral (ECP) après 3 à 7 jours, caractérisé par des cellules s'arrondissant, s'agrandissant, formant des syncytia et se détachant du support. La formation de plages est parfois plus fiable et plus facile à reconnaître. Un recouvrement approprié est obtenu par l'utilisation d'agar noble à 1,6 % dans du milieu minimum essentiel concentré 2x avec 1 % NaCO₃, des antibiotiques (voir ci-dessus), 0,7 % de rouge neutre et 1 % de DEAE (diéthylaminoéthyl) (100 µg/ml). Le type sauvage du VGET ne se développe pas aisément en culture de cellules, ainsi plusieurs passages peuvent-ils être nécessaires avant que des changements distinctifs ne deviennent évidents. Des isolats cytopathogènes doivent être confirmés comme étant du VGET par immunomarquage ou par séroneutralisation *in vitro* en utilisant des antisérums spécifiques du VGET appropriés (5). Si les anticorps monoclonaux (AcM) appropriés sont disponibles, ils peuvent être employés pour distinguer le VGET du CVRP par immunomarquage (15, 54). La différenciation entre le VGET et le CVRP peut également se faire par l'utilisation de sondes d'ADN spécifiques du VGET (2) ou par RT-PCR discriminatoire ou RT-PCR nichée (9, 21, 22, 37).

b) Recherche des antigènes viraux par immunofluorescence

L'immunofluorescence est un moyen rapide, sensible et spécifique pour identifier les antigènes viraux de la GET dans des coupes d'intestin au cryostat. Il est nécessaire que le porc soit mort récemment, et idéalement âgé de moins de 4 semaines (de préférence moins de 1 semaine) et qu'il soit au début de l'expression des signes cliniques (c'est-à-dire, dans un délai de 24 à 28 h post-infection). Dans les 30 min suivant la mort, des coupes de 2 cm de long provenant de 4 régions différentes de la partie postérieure de l'intestin grêle devraient être prélevées. Des coupes de 5 à 10 mm de long sont congelées dans la carboglace. L'orientation correcte du matériel est importante pour s'assurer que le découpage par le cryostat corresponde à de véritables sections transversales. Les coupes font 6 µm d'épaisseur, sont montées sur des lamelles, séchées à l'air et fixées à l'acétone. Une technique alternative plus rapide consiste à prélever et à découper longitudinalement une petite fraction de la partie distale du petit intestin, de la laver soigneusement avec du PBS, et de préparer des empreintes de la muqueuse intestinale sur des lames lavées à l'alcool puis de les faire sécher à l'air et de les fixer à l'acétone (5). Les lames sont ensuite traitées et colorées comme décrit ci-après. Des coupes ou des empreintes témoins positives et négatives sont stockées à -20 °C et analysées en parallèle aux échantillons. Après lavage avec le tampon Tris, pH 8,7, ou le PBS, les coupes sont marquées avec une solution diluée d'anticorps conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) spécifiques du VGET, et placées dans un incubateur humide à 37 °C pendant 30 min. Les anticorps non liés sont éliminés par lavage avec du tampon Tris. Il est possible de faire une contre-coloration des coupes avec une dilution 10⁻⁵ de bleu d'Evans dans le tampon Tris et de les monter dans du glycérol.

Les coupes ou empreintes marquées devraient être examinées aussitôt que possible par microscopie sous lumière ultraviolette. La qualité du marquage est évaluée en se référant aux témoins. Une interprétation précise dépend de la conservation de l'architecture des villosités, dont les cellules épithéliales sont examinées pour la fluorescence intra-cytoplasmique.

Une méthode utilisant la réaction peroxydase-antiperoxydase pour la démonstration du VGET a été développée récemment pour la détection du VGET et du CVRP à la fois dans des tissus congelés, fixés au formol et les tissus paraffinés (19, 53). Cette technique appliquée aux tissus formolés présente deux avantages : elle peut être réalisée, préalablement ou rétrospectivement, sur les mêmes tissus formolés que ceux utilisés pour l'histologie, et les tissus ou les lames fixés sont facilement transportables car ils sont stables et ne contiennent pas de virus vivant (53).

c) Détection des antigènes viraux dans les matières fécales par ELISA

Un système en sandwich peut être employé, par exemple avec une capture des antigènes par des AcMs et des Anticorps polyclonaux détecteurs liés à l'enzyme (25, 48). Cet essai est basé sur la capture de l'antigène viral dans l'échantillon fécal par 3 AcMs, 2 spécifiques de la protéine de S (sites A et D) et 1 de la nucléoprotéine N (25, 48). Un puit contenant des Ac purifiés, provenant de liquide d'ascite de souris

inoculées avec des cellules de myélome SP2/0, qui ne reconnaissent pas le VGET, est employé comme témoin négatif, pour valider la spécificité de l'essai. Les AcMs sont déposés dans une plaque 96 puits, dans une solution tampon de bicarbonate, pH 9,6, et incubés la nuit à 37 °C. Tous les échantillons sont testés en double, un sur le «coating» positif (AcM du VGET) et l'autre sur le «coating» négatif. Les échantillons fécaux sont dilués dans le milieu de culture de cellules (1/10), vortexés et centrifugés à vitesse réduite (2 000 g) pendant 15 min. Le surnageant est décanté dans des tubes stériles et testé ou conservé congelé. Les plaques sont lavées 2 fois avec le tampon de lavage (PBS contenant 0,05 % Tween 20) avant d'ajouter les échantillons fécaux préparés. Les plaques sont incubées la nuit à 37 °C. Après 4 lavages, un sérum polyclonal biotinylé anti-VGET est ajouté dans le tampon PBS contenant 0,05 % de Tween 20. Les plaques sont incubées 1 h à 37 °C. Ensuite, elles sont lavées 4 fois avant d'ajouter un conjugué marqué à la peroxydase streptavidine et incubées 1 h à 37 °C. Les plaques sont lavées 6 fois avant d'ajouter le substrat de l'enzyme, l'ABTS (acide 2,2'-azino-di-[3-ethyl-benzthiazoline]-6-sulfonique) avec 0,03 % d'H₂O₂ dans la solution tampon de citrate 0,1 M, pH 4,2. La réaction est arrêtée après 30 min à température ambiante par l'addition du sulfate dodécylrique de sodium 5 % et l'absorbance est déterminée dans un lecteur d'ELISA à 405 nm. Des échantillons fécaux négatifs et positifs du VGET sont inclus dans chaque plaque.

d) Méthodes de détection de l'acide nucléique viral

L'hybridation *in situ* (HIS) et les méthodes de RT-PCR ont été décrites pour la détection directe du VGET dans les échantillons cliniques, avec différenciation du CVRP (21, 37, 55). Une seconde PCR, nichée, peut augmenter de manière significative la sensibilité de la méthode (9, 21, 22, 36). La différenciation entre les virus de GET peut être réalisée en analysant des produits de PCR avec des enzymes de restriction (64) ou par séquençage (9, 22, 28, 38, 66). Une RT-PCR duplex pour la détection combinée de VGET et de virus de la diarrhée épidémique porcine a été décrite (23).

2. Épreuves sérologiques

La sérologie a valeur de diagnostic si une augmentation du titre en anticorps peut être démontrée. En outre, un résultat séropositif simple peut avoir valeur de diagnostic s'il est issu d'une population précédemment connue pour être séronégative. Une épreuve sérologique avant importation et le fait de n'accepter que des animaux séronégatifs dans une exploitation sont des conditions qui réduisent l'apparition d'animaux porteurs parmi les porcs.

Après l'infection avec le VGET ou le CVRP, des anticorps viraux peuvent être détectés dans le sérum 6 ou 7 jours post-infection, et de tels anticorps persistent au moins pendant plusieurs mois. Bien que les anticorps dirigés contre le CVRP et le VGET montrent la neutralisation complète de l'un ou l'autre virus, il y a des différences dans les spécificités de certains anticorps non neutralisants (7, 14, 15, 46, 54). En effet, le CVRP ne possède pas certains épitopes du VGET. La séroneutralisation n'est pas une méthode pratique pour différencier le CVRP du VGET. Des AcMs spécifiques à ces régions peuvent être incorporés dans des ELISA de compétition pour détecter les anticorps présents dans le sérum qui sont entièrement spécifiques du VGET. Tandis que de tels essais sont fiables du fait qu'ils ne produisent pas de résultats faux-positifs avec des antisérums de CVRP, des faux-négatifs peuvent se produire en raison d'une sensibilité réduite comparée aux essais de séroneutralisation, et en raison de la variation parmi les souches de VGET, telle qu'un AcM spécifique du VGET peut ne pas identifier toutes les souches (6, 54). Le problème du peu de sensibilité peut être réduit en employant les essais sur base d'un groupe ou d'un troupeau. Ces ELISA basés sur les AcMs sont la méthode de choix pour différencier CVRP du VGET lors de la qualification des animaux à l'exportation.

En outre, l'utilisation de tels essais pour le diagnostic différentiel en moins de 3 semaines après exposition au CVRP conduit à des résultats non fiables et non reproductibles (50). Des résultats plus précis ont été obtenus en examinant les échantillons de sérums couplés (phase aiguë et convalescence) et en employant la protéine recombinante S du VGET comme antigène fixé au support, au lieu des cellules testiculaires de porcs infectées par le VGET (50).

a) Épreuves pour les virus de la gastroentérite transmissible porcine / coronavirus respiratoire porcine

Ces épreuves détectent les anticorps dirigés contre le VGET et le CVRP. Elles incluent des tests de séroneutralisation, des ELISA indirects (16, 18, 26, 29, 42) et ELISA de compétition basé sur l'utilisation d'AcM spécifique de groupe VGET/CVRP (35).

Des tests de séroneutralisation peuvent être réalisés avec une variété de types cellulaires et de souches virales. Les lignées cellulaires généralement utilisées incluent les cellules de testicules de porcs (27) ou des cellules rénales porcines de première explantation ou continues. De tels tests ont été très largement utilisés pendant de nombreuses années et sont généralement considérés comme référence pour évaluer de nouvelles méthodes. Une épreuve de neutralisation par réduction de plages, utilisant des cellules de testicule de porc dans des plaques à 6 puits et la souche Purdue du VGET atténué, est couramment utilisée (5). Une modification de la méthode de Witte (63), décrite ci-dessous, emploie des plaques de culture

cellulaire pour microtitrage à fond plat, une lignée de cellules A72 dérivées d'une tumeur rectale de chien, et une souche virale de terrain adaptée pour se multiplier sur ces cellules : 100 DICT₅₀ (Dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire) de virus sont incubées avec les sérums inactivés à la chaleur. La neutralisation est indiquée par l'absence d'ECP après incubation avec les cellules A72 dans le milieu de Leibovitz 15 (Sigma, Royaume-Uni) avec antibiotiques, 10 % de sérum foetal de veau de et 1 % de L-glutamine. Le volume total de réactifs dans chaque puits devrait être de 150 µl.

- **Séroneutralisation : protocole**

- i) Les sérums sont inactivés pendant 30 minutes au bain-marie à 56 °C ;
- ii) Des dilutions de 2 en 2 des sérums à tester sont faites dans du milieu de culture de cellules, en commençant par le sérum non dilué (cela donne une étape de dilution de séroneutralisation de 1/2 une fois mélangé à un volume égal de suspension virale). Les dilutions sont préparées dans une plaque à fond plat de microtitrage de 96 puits en utilisant, de façon optimale, 3 puits par dilution et 25 µl par puits. Des sérums témoins positifs et négatifs sont également inclus dans l'épreuve. Aucun sérum de référence n'est disponible, mais il conviendrait de préparer des sérums internes positifs de référence possédant un titre situé dans une gamme appropriée ;
- iii) 25 µl du stock de VGET sont ajoutés dans chaque puits, à une dilution effectuée dans le milieu de culture et calculée pour fournir 100 DICT₅₀ par puits. Le virus devrait être ajouté à 2/3 des puits contenant le sérum, pour chaque dilution. Le troisième puits sert de témoin, contenant uniquement le sérum, et devrait recevoir 25 µl de milieu de culture au lieu du virus ;
- iv) Le virus restant est titré par 4 étapes de dilution en 10 fois en utilisant 25 µl par puits et au moins 4 puits par dilution ; 25 µl du milieu de culture sont ajoutés à chacun des puits pour compenser l'absence du sérum d'essai ;
- v) Les plaques sont agitées brièvement et incubées 1 h à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO₂ ;
- vi) 100 µl, par exemple, de suspension de cellules A72 à 2 x 10⁵ cellules/ml sont ajoutés à chaque puits ;
- vii) Les plaques sont incubées pendant 3 à 7 jours à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO₂ ; l'épreuve peut être réalisée avec succès même si les plaques sont incubées sans CO₂ ;
- viii) Les plaques sont lues au microscope pour l'ECP. L'épreuve est validée en vérifiant le titre du virus (qui devrait avoir une valeur de 100 DICT₅₀ avec des valeurs tolérées entre 50 et 200 DICT₅₀) et les sérums témoins. Le sérum positif de référence devrait avoir une valeur divergeant au maximum de 0,3 log₁₀ de la valeur moyenne prédéterminée. Des lectures de chaque dilution de sérum testé devraient être faites en référence au puits ne contenant que du sérum témoin pour distinguer l'ECP viral d'un effet cytotoxique induit par le sérum ou par une contamination ;
- ix) Les résultats pour le sérum testé sont déterminés par la méthode de Spearman-Kärber comme la dilution de sérum qui a neutralisé le virus dans 50 % des puits ;
- x) Un sérum négatif ne devrait donner aucune neutralisation à la plus faible dilution testée (c'est-à-dire le sérum non dilué, équivalent à une dilution de 1/2 à l'étape de neutralisation).

b) Épreuves spécifiques au VGET pour différencier les porcs infectés par le VGET de ceux infectés par le CVRP

Les épreuves spécifiques du VGET sont des ELISA bloquant ou de compétition, qui emploient un AcM qui reconnaît le VGET mais pas le CVRP (6, 8, 50, 54, 60), et sont les épreuves de choix pour les animaux à l'exportation. Les sérums testés, provenant de porcs infectés antérieurement par une souche de VGET reconnue par cet AcM, contiendront des anticorps de la même spécificité, qui peuvent entrer en compétition avec lui, pour lier les antigènes du VGET fixés aux plaques ELISA. Les porcs infectés par le CVRP qui ne possède pas l'épitope unique du VGET ne produiront pas d'anticorps contre cet épitope ; les anticorps anti-CVRP n'entreront donc pas en compétition avec l'AcM spécifique anti-VGET ou ne bloqueront pas ses sites de liaison (6, 8, 50, 54, 60). Les antigènes de l'ELISA peuvent être préparés à partir de lysats de cellules rénales qui ont été, soit inoculées avec des souches virales du VGET adaptées à la culture de cellules, soit non infectées. Alternativement, des cellules de testicules de porcs infectées par le VGET ou non infectées, fixées à l'acétone à 80 %, sont employées comme source d'antigène. Les antigènes peuvent être également préparés à partir de la protéine recombinante S (rec-S) prélevée sous forme soluble dans une lignée de cellules d'insectes (Sf9) infectées par un baculovirus recombinant exprimant la protéine S du VGET, qui contient les 4 sites antigéniques majeurs (50, 54). Des antigènes positifs et négatifs sont fixés de manière à alterner les rangées sur la plaque de microtitrage, en utilisant une solution de tampon bicarbonate à pH 9,6. Les dilutions des sérums à tester, y compris des témoins positifs anti-VGET et négatifs anti-VGET et anti-CVRP, ainsi que des témoins positifs anti-CVRP (négatifs pour ce test mais positifs en neutralisation) sont ajoutées aux puits appropriés et incubées durant la nuit avant l'addition de l'AcM dilué dans tous les puits. Les AcMs attachés sont détectés par un anticorps anti-souris conjugué à la peroxydase, qui induit une coloration en présence d'un substrat approprié. Les changements de couleur sont mesurés en utilisant un

spectrophotomètre et, pour chaque échantillon testé, le résultat net est la différence d'absorbance entre les puits positifs et négatifs en antigène, exprimés comme un pourcentage du résultat obtenu avec le sérum témoin négatif. La valeur du bruit de fond pour l'épreuve doit être déterminée par une épreuve préalable sur des populations négatives et positives connues. Il existe plusieurs kits de diagnostic spécifiques du VGET disponibles dans le commerce.

Les épreuves basées sur l'hémagglutination décrites jusqu'à aujourd'hui (24, 30, 51) ont été validées avant l'apparition du CVRP. Cependant, elles sont spécifiques du VGET car le VGET est hémagglutinant, contrairement au CVRP (47).

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

La vaccination contre la GET est utilisée dans plusieurs pays.

Des lignes directrices pour la fabrication des vaccins à usage vétérinaire sont données dans le Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices données ci-dessous et dans le Chapitre 1.1.8. sont volontairement de nature générale et peuvent être complétées par des exigences nationales et régionales.

Les données sur le travail expérimental et sur les essais sur le terrain des vaccins contre le VGET ayant reçu une autorisation de mise sur le marché aux États-Unis d'Amérique (USA) ont été analysées, notamment les limitations probables quant à leur efficacité sur le terrain et les concepts relatifs à l'élaboration optimale d'un vaccin contre le VGET (43, 45, 46). Il existe plusieurs fabricants aux USA ayant une autorisation pour produire des vaccins contre le VGET qui comprennent des vaccins à virus vivants atténués et des vaccins à virus inactivés. Les vaccins à virus vivants atténués sont utilisés par voie orale chez les truies gestantes (afin d'induire une immunité passive). Ils ont également été autorisés pour une utilisation, également par voie orale, chez les cochons allaités ou sevrés (afin d'induire une immunité active). Les vaccins à virus inactivés sont autorisés pour une administration par voie parentérale : en intramusculaire chez les truies gestantes et en intrapéritonéale chez les cochons allaités ou sevrés. En règle générale, lors d'évaluations dans des conditions expérimentales contrôlées ou sur le terrain dans des élevages vaccinés contre le VGET et le CVRP, ces vaccins ont induit une protection passive marginale contre les épreuves au VGET chez les porcelets allaités. Bien qu'ils aient échoué à protéger efficacement contre une épizootie de GET, les données laissent penser que ces vaccins peuvent fournir une certaine efficacité lors d'enzootie de GET en stimulant une réponse anamnésique des anticorps présents dans le sérum et le lait (45, 46).

La raison principale proposée pour expliquer certains des échecs de vaccination contre le VGET est l'incapacité de stimuler des niveaux élevés en IgA sécrétées (SIgA) dans le lait, analogues aux anticorps SIgA trouvés dans le lait des truies naturellement infectées par le VGET (45, 46). En outre, ces vaccins ne protègent pas efficacement la truie sans anticorps contre la GET, et les conséquences souvent observées en cas de GET chez la truie sont : l'anorexie, l'agalaxie et l'échec de protection passive de leurs porcelets. Ainsi les vaccins à virus vivants atténués peuvent-ils ne pas se multiplier jusqu'au niveau exigé pour produire une immunité protectrice dans l'intestin, ou, il des risques de réversion de la virulence existent, s'ils sont donnés à des animaux séronégatifs en période néonatale. Les vaccins à virus inactivés administrés par voie parentérale n'induisent pas la production d'anticorps de type SIgA ; la réponse immunitaire à médiation cellulaire est souvent faible et la durée de l'immunité peut être de courte durée. Bien qu'on ait proposé l'utilisation du CVRP comme candidat vaccinal pour la GET, les études expérimentales concernant leur efficacité contre le VGET ont montré un manque d'efficacité totale (34) ou une protection croisée partielle (3, 11, 59). Cependant, la distribution étendue des infections par le CVRP dans la population de porcs en Europe semble avoir nettement réduit l'incidence de la GET épizootique en Europe (39). De plus, les nouvelles stratégies d'utilisation de l'ADN recombinant pour le développement des vaccins contre le VGET incluent l'utilisation possible d'un vaccin sous-unitaire contenant la protéine S (dépendant du développement de systèmes d'injection au niveau de la muqueuse et des adjuvants) (33, 49, 52) ou l'utilisation des vecteurs viraux recombinants ou de vecteurs bactériens exprimant des gènes de VGET importants pour l'induction de l'immunité (13, 43, 46, 56, 57, 65).

Il existe un certain nombre de conditions générales (par exemple la production dans un laboratoire autorisé, le respect des bonnes pratiques, des normes, etc.) s'appliquant à tous les produits biologiques comprenant les vaccins. Un ensemble de règlements existe (appelé « standard requirements », ou SRs) décrivant les tests à effectuer sur le vaccin et les matériaux d'origine. L'information détaillée sur les SRs pour des vaccins aux USA est contenue dans le « Code of federal regulations » (CFR), titre 9, volume 1, partie 113 (abrégée ci-dessous en tant que 9 CFR, 113) (58). Les règles générales de la monographie de la Pharmacopée Européenne et de l'EMA (*European Medicines Agency*) sont applicables aux vaccins contre la GET. Toutefois, aucun vaccin contre la GET n'est utilisé à l'heure actuelle dans l'Union Européenne.

1. Gestion de la semence virale

a) Caractéristiques de la semence virale

La semence virale doit être testée pour sa pureté et son identité. La pureté inclut l'absence de bactéries et de champignons (9 CFR 113:27), de mycoplasmes (9 CFR 113:28), et d'autres virus (9 CFR 113:55) (58). La démonstration de l'identité virale est habituellement réalisée par séroneutralisation ou immunofluorescence. Pour les vaccins produits par génie génétique ou issus de souches naturelles avec des gènes délétés ou inactivés, il faut fournir la preuve de cette identité (géotypique et/ou phénotypique).

b) Méthode de culture

La culture doit être effectuée sur les cellules prouvées non contaminées (certifiées), et le nombre de passages de cellules est limité (habituellement à 5). On n'exige pas que l'espèce d'origine des cellules soit celle de l'espèce cible du virus.

c) Validation du vaccin

La validation vaccinale prend deux formes. Le lot de semence primaire est considéré comme immunogène si un vaccin fait au passage le plus élevé, et selon les directives de production, s'avère protecteur. Le niveau antigénique le plus bas (titre en virus vaccinal vivant atténué ou masse d'antigène inactivé) qui s'avère protecteur devient le niveau seuil pour toutes les futures productions (lots) du produit. Dans le cas de produits vivants, les facteurs intervenants dans les variations éventuelles du titre et des courbes de décroissance au cours du temps devraient être ajoutés. Ces vaccins devraient être testés pour la pureté, l'innocuité, et l'efficacité par le fabricant. La protection doit être démontrée contre la maladie naturelle par épreuve virulente. L'inoculation utilise le virus virulent sauvage à une dose qui provoque la maladie chez au moins 95 % des animaux témoins sensibles à la maladie. Trois productions doivent être faites successivement et examinées par le fabricant et par l'autorité compétente, pour l'activité protectrice, la stérilité et l'innocuité avant l'autorisation de mise sur le marché.

2. Méthode de fabrication

Ces informations font partie de la propriété des fabricants et ne sont donc pas disponibles.

3. Contrôles en cours de fabrication

Il est en grande partie du ressort de la propriété industrielle. Quelques contrôles de procédure se réfèrent directement à la production (par exemple, la concentration en O₂ dans les fermenteurs). Une autre catégorie, cependant, inclut des tests semblables au test de l'activité du produit fini. Pour tous les vaccins, plus le test d'activité sur le lot final ou le récipient est simple, plus il est probable qu'il puisse être employé comme test de suivi/mélange : par exemple, le titre du virus mesuré sur les lots peut être employé pour prévoir le titre final du mélange de plusieurs lots. Les composants d'origine animale doivent être stérilisés ou être exempts de contamination.

4. Contrôles des lots

Des lots doivent être mélangés selon les caractéristiques finales et les spécifications de mise en flacons (par exemple, plusieurs lots de fermentation peuvent être mis en commun, ou un lot de fermentation peut être divisé et mis en commun avec d'autres, etc.). Dans certains pays, les contrôles du produit en vrac (bulk) et en cours de processus définissent le produit et sont le sujet d'une réglementation et d'un examen approfondis. Aux USA, l'accent est mis sur le produit final. Les techniques de contrôle de lot doivent être détaillées dans les directives de production et doivent être significatives, traçables, et le fabricant doit éliminer tout produit qui ne respecte pas les caractéristiques exigées. Si un lot doit être exporté vers un autre pays pour mélange ou mise en flacon, alors il est soumis à l'ensemble du test comme si c'était le produit final.

a) Stérilité

Tous les produits doivent être examinés pour leur stérilité. Le fabricant peut également exécuter des tests de stérilité sur des lots pour une surveillance en routine. Les tests sont semblables à ceux décrits dans la section C.1.a.

b) Innocuité

Des tests d'innocuité sont effectués avant d'accorder l'autorisation sur le produit fini (sections C.5.a et C.5.b).

c) Activité

L'activité doit seulement être testée si le test d'activité fait avant la mise en flacon (pour confirmer les calculs de mélanges) était un test simple (par exemple un ELISA).

d) Durée de l'immunité

La durée de l'immunité est mesurée lors des tests (efficacité) effectués avant l'autorisation de mise sur le marché, et non lors de la phase de contrôle du lot. Concernant les programmes de revaccination, des épreuves virulentes (efficacité) effectuées à des intervalles de temps spécifiés après la vaccination sont exigés pour tous les nouveaux vaccins.

e) Stabilité

La stabilité est établie avant que l'autorisation de mettre le lot sur le marché ne soit accordée. Le vieillissement accéléré à 37 °C est employé pour estimer la durée de vie du vaccin, de sorte que les produits puissent ne pas être maintenus à la température de stockage (4 °C) pour la période donnée en temps réel. Ceci sera confirmé plus tard par des données en temps réel. Le fabricant n'est pas tenu de faire les tests de stabilité. Les fabricants doivent donner la quantité de matériel antigénique qui se trouve dans leur produit durant toute la durée de conservation. Des échantillons de produit sont choisis (vaccin à virus vivant habituellement) et examinés dans les 30 jours de l'expiration pour voir si, par exemple, le titre est au niveau indiqué dans le cahier des charges du fabricant. La stabilité est également affectée par l'humidité. L'humidité résiduelle dans un produit déshydraté peut réduire le temps de conservation. Ceci doit donc être examiné dans le produit fini ou durant la procédure de fabrication.

f) Agents de conservation

Il existe des restrictions quant aux quantités maximums d'antibiotique qui peuvent être contenues dans un produit. Des restrictions à certains composants de vaccins sont liées à leur innocuité et au délai d'attente qui doit être assez long pour que le composant disparaisse avant que l'animal soit abattu. Les agents de conservation utilisés sont des molécules déposées et protégées.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Tous les risques dus au vaccin doivent être clairement énoncés sur la notice. Ceci s'applique habituellement aux avertissements en cas de gestation pour les virus vivants provoquant des avortements, et les risques de choc anaphylactiques, mais peut également avertir l'utilisateur quant à la douleur ou au gonflement éventuel au site d'injection, ou à la fièvre et à l'inappétence passagère dans certains cas. Il n'existe pas de précaution spéciale qui s'applique aux vaccins contre la GET actuellement autorisés.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Habituellement ce test sera réalisé sur une souris et/ou un cobaye ou un porc (9 CFR 113:33, et réf. 63). Des tests de stérilité sont également effectués sur le produit final.

b) Activité

Il n'y a aucun test d'activité avant mise sur le marché. Quel que soit le test employé, il doit être corrélé avec la protection chez l'animal hôte (tests d'efficacité). L'activité des vaccins à virus vivants contre le VGET peut être évaluée par titrage *in vitro* de la dose infectieuse virale en culture de cellules (43). Ce titre doit être corrélé avec le titre viral minimum exigé pour produire une immunité protectrice contre une épreuve virulente expérimentale, et également contre une infection naturelle sur le terrain. L'activité des vaccins à virus inactivé est évaluée par des tests de vaccination suivis d'une épreuve virulente en utilisant différentes doses de vaccin. Des titres en anticorps neutralisants induits par inoculation des animaux de laboratoire avec le vaccin peuvent être acceptés si une corrélation a été établie avec le développement de l'immunité protectrice.

Des antigènes viraux spécifiques associés à l'induction d'anticorps neutralisants et à la protection contre l'épreuve virulente peuvent être mesurés pour les vaccins à virus inactivé en utilisant pour l'ELISA des AcMs spécifiques, tel que des anticorps neutralisants spécifiques de la protéine S du VGET (43).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ASAGI M., OGAWA T., MINETOMA T., SATO K. & INABA Y. (1986). Detection of transmissible gastroenteritis virus in feces from pigs by reversed passive haemagglutination. *Am. J. Vet. Res.*, **47**, 2161–2164.
2. BAE I., JACKWOOD D.J., BENFIELD D.A., SAIF L.J., WESLEY R.D. & HILL H. (1991). Differentiation of transmissible gastroenteritis virus from porcine respiratory coronavirus and other antigenically related coronaviruses by using cDNA probes specific for the 5' region of the S glycoprotein gene. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 215–218.
3. BERNARD S., BOTTREAU E., AYNAUD, J.M., HAVE P. & SZYMANSKY J. (1989). Natural infection with the porcine respiratory coronavirus induces protective lactogenic immunity against transmissible gastroenteritis virus. *Vet. Microbiol.*, **21**, 1–8.
4. BERNARD S., LANTIER I., LAUDE H. & AYNAUD J.M. (1986). Detection of transmissible gastroenteritis coronavirus antigens by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay technique. *Am. J. Vet. Res.*, **47**, 2441–2444.
5. BOHL E.H. (1979). Diagnosis of diarrhea in pigs due to transmissible gastroenteritis or rotavirus. *In: Viral Enteritis in Humans and Animals*, Bricout F. & Scherrer R., eds. INSERM, Paris, France, **90**, 341–343.
6. BROWN I.H. & PATON D.J. (1991). Serological studies of transmissible gastroenteritis in Great Britain, using a competitive ELISA. *Vet. Rec.*, **128**, 500–503.
7. CALLEBAUT P., CORREA I., Pensaert M., JIMENEZ G. & ENJUANES L. (1988). Antigenic differentiation between transmissible gastroenteritis virus of swine and a related porcine respiratory coronavirus. *J. Gen. Virol.*, **69**, 1725–1730.
8. CALLEBAUT P., Pensaert M.B. & HOOYBERGHS J. (1989). A competitive inhibition ELISA for the differentiation of serum antibodies from pigs infected with transmissible gastroenteritis virus (TGEV) or with the TGEV-related porcine respiratory coronavirus. *Vet. Microbiol.*, **20**, 9–19.
9. COSTANTINI V., LEWIS P., ALSOP J., TEMPLETON C. & SAIF L.J. (2004). Respiratory and enteric shedding of porcine respiratory coronavirus (PRCV) in sentinel weaned pigs and sequence of the partial S gene of the PRCV isolates. *Arch. Virol.*, **149**, 957–974.
10. COX E., HOOYBERGHS J. & Pensaert M.B. (1990). Sites of replication of a porcine respiratory coronavirus related to transmissible gastroenteritis virus. *Res. Vet. Sci.*, **48**, 165–169.
11. COX E., Pensaert M.B. & CALLEBAUT P. (1993). Intestinal protection against challenge with transmissible gastroenteritis virus of pigs after infection with the porcine respiratory coronavirus. *Vaccine*, **11**, 267–272.
12. DULAC G.C., RUCKERBAUER G.M. & BOULANGER P. (1977). Transmissible gastroenteritis: demonstration of the virus from field specimens by means of cell culture and pig inoculation. *Can. J. Comp. Med.*, **41**, 357–363.
13. ENJUANES L., SOLA I., ALMAZAN F., ORTEGO J., IZETA A., GONZALEZ J.M., ALONSO S., SANCHEZ J.M., ESCORS D., CALVO E., RIQUELME C. & SANCHEZ C. (2001) Coronavirus derived expression systems. *J. Biotechnol.*, **88**, 183–204.
14. ENJUANES L. & VAN DER ZEIJST B.A.M (1995). Molecular basis of transmissible gastroenteritis virus epidemiology. *In: The Coronaviridae*, Siddell, Stuart G., ed. Plenum Press, New York, USA, 337–376.
15. GARWES D.J., STEWART F., CARTWRIGHT S.F. & BROWN I. (1988). Differentiation of porcine respiratory coronavirus from transmissible gastroenteritis virus. *Vet. Rec.*, **122**, 86–87.
16. HOHDATSU T., EIGUCHI Y., IDE S., BABA H. & YAMAGISHI H. (1987). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of transmissible gastroenteritis virus antibodies. *Vet. Microbiol.*, **13**, 93–97.
17. HONDA E., TAKAHASHI H., OKAZAKI K., MINETOMA T. & KUMAGAI T. (1990). The multiplication of transmissible gastroenteritis viruses in several cell lines originated from porcine kidney and effects of trypsin on the growth of the viruses. *Jpn J. Vet. Sci.*, **52**, 217–224.
18. HUANG C.-C., JONG M.H. & LAI S.Y. (1988). Preparation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit and its application in diagnosis of transmissible gastroenteritis. *Taiwan J. Vet. Med. Anim. Husbandry*, **51**, 57–63.

19. JEAN Y.H., KANG M.I., HWANG E.K., KWON Y.B., CHUNG U.I. & LEE J.B. (1987). Detection of transmissible gastroenteritis virus in tissue by peroxidase–antiperoxidase method. Research Reports Rural Development Administration (Livestock & Veterinary), Korea, **29**, 48–53.
20. KEMENY L.J., WILTSEY V.L. & RILEY J.L. (1975). Upper respiratory infection of lactating sows with transmissible gastroenteritis virus following contact exposure to infected piglets. *Cornell Vet.*, **65**, 352–362.
21. KIM L., CHANG K.O., SESTAK K., PARWANI A & SAIF L.J. (2000). Development of a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay for differential diagnosis of transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus from feces and nasal swabs of infected pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **12**, 385–388.
22. KIM L., HAYES J., LEWIS P., PARWANI A.V., CHANG K.O. & SAIF L.J. (2000). Molecular characterization and pathogenesis of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus (PRCV) field isolates co-circulating in a swine herd. *Arch. Virol.*, **145**, 1133–1147.
23. KIM S.Y., SONG D.S. & PARK B.K. (2001). Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **13**, 516–520.
24. LABADIE J.P., AYNAUD J.M., VAISAIRE J. & RENAULT L. (1977). Porcine transmissible gastroenteritis. Antibody detection by passive haemagglutination test: applications to diagnosis and epidemiology. *Rec. Med. Vet.*, **153**, 931–936.
25. LANZA I., SHOUP D.I. & SAIF L.J. (1995). Lactogenic immunity and milk antibody isotypes to transmissible gastroenteritis virus in sows exposed to porcine respiratory coronavirus during pregnancy. *Am. J. Vet. Res.*, **56**, 739–748.
26. LIU C., KOKUHO T., KUBOTA T., WATANABE S., INUMARU S., YOKOMIZO Y. & ONODERA T. (2001). A serodiagnostic ELISA using recombinant antigen of swine transmissible gastroenteritis virus nucleoprotein. *J. Vet. Med. Sci.*, **63**, 1253–1256.
27. MCCLURKIN A.W. & NORMAN J.O. (1966). Studies on transmissible gastroenteritis of swine. II. Selected characteristics of a cytopathogenic virus common to five isolates from transmissible gastroenteritis. *Can. J. Comp. Med.*, **30**, 190–198.
28. MCGOLDRICK A., LOWINGS J.P. & PATON D.J. (1999). Characterization of a recent virulent transmissible gastroenteritis virus from Britain with a deleted ORF 3a. *Arch. Virol.*, **144**, 763–770.
29. NELSON L.D. & KEHLING C.L. (1984). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of transmissible gastroenteritis virus antibody in swine sera. *Am. J. Vet. Res.*, **45**, 1645–1657.
30. NODA M., YAMASHITA H., ICOIDE F., KODOI K., ORNON T., ASAGI M. & INABA Y. (1987). Haemagglutination with transmissible gastroenteritis. *Arch. Virol.*, **96**, 109–115.
31. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE) (2001). World Animal Health in 2001, Part 2, Tables on Animal Health Status and Disease Control Methods. OIE, 12 rue de Prony, 75017 Paris, France.
32. O'TOOLE D., BROWN I.H., BRIDGES A. & CARTWRIGHT S.F. (1989). Pathogenicity of experimental infection with 'pneumotropic' porcine coronavirus. *Res. Vet. Sci.*, **47**, 23–29.
33. PARK S., SESTAK K., HODGINS D.C., SHOUP D.I., WARD L.A., JACKWOOD D.J. & SAIF L.J. (1998). Immune response of sows vaccinated with attenuated transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and recombinant TGEV spike protein vaccine and protection of their suckling piglets against virulent TGEV challenge. *Am. J. Vet. Res.*, **59**, 1002–1008.
34. PATON D.J. & BROWN I.H. (1990). Sows infected in pregnancy with porcine respiratory coronavirus show no evidence of protecting their suckling piglets against transmissible gastroenteritis. *Vet. Res. Commun.*, **14**, 329.
35. PATON D.J., BROWN I.H. & VAZ E.K. (1991). An ELISA for the detection of serum antibodies to both transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus. *Br. Vet. J.*, **147**, 370–372.
36. PATON D.J., IBATA G., MCGOLDRICK A., JONES T.O. & PRITCHARD G.C. (1998). Attempted isolation and characterisation of recent British isolates of transmissible gastroenteritis. Proceedings of the 15th IPVS Congress, Birmingham, UK, 5–9 July 1998.

37. PATON D., IBATA G., SANDS J. & MCGOLDRICK A. (1997). Detection of transmissible gastroenteritis virus by RT-PCR and differentiation from porcine respiratory coronavirus. *J. Virol. Methods*, **66**, 303–309.
38. PATON D. & LOWINGS P. (1997). Discrimination between transmissible gastroenteritis virus isolates. *Arch. Virol.*, **142**, 1703–1711.
39. PENSAERT M., CALLEBAUT P. & VERGOTE J. (1986). Isolation of a porcine respiratory, non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis. *Vet. Q.*, **8**, 257–261.
40. PENSAERT M.B., HALTERMAN E.O. & BERNSTEIN T. (1968). Diagnosis of transmissible gastroenteritis in pigs by means of immunofluorescence. *Can. J. Comp. Med.*, **32**, 555–561.
41. RASSCHAERT D., DUARTE M. & LAUDE H. (1990). Porcine respiratory coronavirus differs from transmissible gastroenteritis virus by a few genomic deletions. *J. Gen. Virol.*, **71**, 2599–2607.
42. RUKHADZE G.G., ALIPER T.I. & SERGEEV V.A. (1989). Isolation of peplomer glycoprotein E2 of transmissible gastroenteritis virus and application in enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 1754–1758.
43. SAIF L.J. (1993). Coronavirus immunogens. *Vet. Microbiol.*, **37**, 285–297.
44. SAIF L.J., BOHL E.H., KOHLER E.M. & HUGHES J.H. (1977). Immune electron microscopy of transmissible gastroenteritis virus and rotavirus (reovirus-like agent) of swine. *Am. J. Vet. Res.*, **38**, 13–20.
45. SAIF L.J. & JACKWOOD D.J. (1990). Enteric virus vaccines: Theoretical considerations, current status and future approaches. *In: Viral Diarrheas of Man and Animals*, Saif L.J. & Theil K.W., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 313–329.
46. SAIF L.J. & SESTAK K. (2006). Transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus. *In: Diseases of Swine*, Ninth Edition, B.E. Straw *et al.*, eds. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, 489–516.
47. SCHULTZE B., KREML C., BALLESTEROS M.L., SHAW L., SCHAUER R., ENJUANES L. & HERRLER G. (1996). Transmissible gastroenteritis coronavirus, but the related porcine respiratory coronavirus, has a sialic acid (N-glycolylneuramic acid) binding activity. *J. Virol.*, **70**, 5634–5637.
48. SESTAK K., LANZA I., PARK S.K., WEILNAU P. & SAIF L.J. (1996). Contribution of passive immunity to porcine respiratory coronavirus to protection against transmissible gastroenteritis virus challenge exposure in suckling pigs. *Am. J. Vet. Res.*, **5**, 664–671.
49. SESTAK K., MEISTER R.K., HAYES J.R., KIM L., LEWIS P.A., MYERS G. & SAIF L.J. (1999). Active immunity and T-cell populations in pigs intraperitoneally inoculated with baculovirus-expressed transmissible gastroenteritis virus structural proteins. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **70**, 203–221.
50. SESTAK K., ZHOU Z., SHOUP D.I. & SAIF L.J. (1999). Evaluation of the baculovirus-expressed S glycoprotein of transmissible gastroenteritis virus (TGEV) as antigen in a competition ELISA to differentiate porcine respiratory coronavirus from TGEV antibodies in pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **11**, 205–214.
51. SHIMIZU M. & SHIMIZU Y. (1977). Micro-indirect haemagglutination test for detection of antibody against transmissible gastroenteritis virus of pigs. *J. Clin. Microbiol.*, **6**, 91–95.
52. SHOUP D., JACKWOOD D.J. & SAIF L.J. (1997). Active and passive immune responses to transmissible gastroenteritis virus (TGEV) in swine inoculated with recombinant baculovirus-expressed TGEV spike glycoprotein vaccines. *Am. J. Vet. Res.*, **58**, 242–250.
53. SHOUP D.I., SWAYNE D.E., JACKWOOD D.J. & SAIF L.J. (1996). Immunohistochemistry of transmissible gastroenteritis virus antigens in fixed paraffin-embedded tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **8**, 161–167.
54. SIMKINS R.A., WEILNAU P.A., BIAS J. & SAIF L.J. (1992). Antigenic variation among transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus strains detected with monoclonal antibodies to the S protein of TGEV. *Am. J. Vet. Res.*, **53**, 1253–1258.
55. SIRINARUMITR T., PAUL P.S., KLUGE J.P. & HALBUR P.G. (1996). *In situ* hybridization technique for the detection of swine enteric and respiratory coronaviruses, transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus (PRCV), in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *J. Virol. Methods*, **56**, 149–160.

56. SMERDOU C., URNIZA A., CURTIS III R. & ENJUANES L. (1996). Characterization of transmissible gastroenteritis coronavirus S protein expression products in avirulent *S. typhimurium* \mit\Delta*tacya* \mit\Delta*tacr*p: persistence, stability and immune response in swine. *Vet. Microbiol.*, **48**, 87–100.
57. TORRES J.M., COVADONGA A., ORTEGA A., MITTAL S., GRAHAM F. & ENJUANES L. (1996). Tropism of human adenovirus type 5-based vectors in swine and their ability to protect against transmissible gastroenteritis coronavirus. *J. Virol.*, **70**, 3770–3780.
58. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) (1995). Code Of Federal Regulations, Title 9, Parts 1–199. US Government Printing Office, Washington D.C., USA.
59. VAN COTT J., BRIM T., LUNNEY J. & SAIF L.J. (1994). Contribution of antibody secreting cells induced in mucosal lymphoid tissues of pigs inoculated with respiratory or enteric strains of coronavirus to immunity against enteric coronavirus challenge. *J. Immunol.*, **152**, 3980–3990.
60. VAN NIEUWSTADT A.P. & BOONSTRA J. (1991). A competitive ELISA to distinguish TGEV- from PRCV-infected pigs. International Pig Veterinary Society Proceedings 1990, 265.
61. VAN NIEUWSTADT A.P., CORNELISSEN J.B. & VREESWIJK J. (1988). Solid phase immune electron microscopy for diagnosis of transmissible gastroenteritis in pigs. *Res. Vet. Sci.*, **44**, 286–294.
62. VAN NIEUWSTADT A.P., CORNELISSEN J.B. & ZETSTRA T. (1988). Comparison of two methods for detection of transmissible gastroenteritis virus in feces of pigs with experimentally induced infection. *Am. J. Vet. Res.*, **49**, 1836–1843.
63. WITTE K.H. (1971). Micro-colour test for assay of transmissible gastroenteritis virus neutralizing antibodies. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, **33**, 171–176.
64. WOODS R.D. (1997). Development of PCR-based techniques to identify porcine transmissible gastroenteritis coronavirus isolates. *Can. J. Vet. Res.*, **61**, 167–172.
65. YOUNT B., CURTIS K. & BARIC R. (2000). Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: Transmissible gastroenteritis virus model. *J. Virol.*, **74**, 10600–10611.
66. ZHANG X., HASOKSUZ M., SPIRO D., HALPIN R., WANG S., STOLLAR S., JANIES D., HADYA N., TANG Y., GHEDIN E. & SAIF L.J. (2007). Complete genomic sequences, a key residue in the spike protein and deletions in non-structural protein 3b of US strains of the virulent and attenuated coronaviruses, transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus. *Virology*, **358**, 424–435.

*

* *

NB: ADOPTÉE POUR LA PREMIÈRE FOIS EN 1989 ; MIS À JOUR LA PLUS RÉCENTES ADOPTÉE EN 2008.