

**ETUDES VIROLOGIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES  
SUR L'ENCEPHALITE A TIQUES EN SUISSE**

**T H E S E**

présentée à la Faculté des Sciences de l'Université  
de Neuchâtel pour obtenir le grade de docteur ès Sciences

par

**HUGUES MATILE**

**ADAG Administration & Druck AG**

# IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Etudes virologiques et épidémiologiques sur  
l'encéphalite à tiques en Suisse

de Monsieur Hugues Matile

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL  
FACULTÉ DES SCIENCES

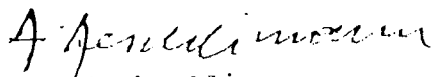
La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,  
sur le rapport des membres du jury,

Messieurs R. Wyler (Zurich), A. Aeschlimann,  
M. Brossard et Ch. Kunz (Vienne)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 19 février 1982

Le doyen:

  
A. Aeschlimann

## TABLE DES MATIERES

<u>I. INTRODUCTION</u>	Page
1. Définition et classification	1
2. Répartition	2
3. Le vecteur	2
4. Les hôtes	4
4.1. Résistance naturelle	5
4.2. Grande sensibilité périphérique mais faible sensibilité neurale	5
4.3. Grande sensibilité périphérique et neurale	6
4.4. Virémie prolongée chez les mammifères; infection par voie alimentaire	6
5. L'encéphalite à tiques chez l'homme	7
6. L'encéphalite à tiques en Suisse	9
7. Buts du présent travail	9
<u>II. MATERIEL ET METHODES</u>	11
1. Récolte du matériel	11
1.1. Capture des tiques	11
1.2. Capture des micromammifères	11
1.3. Récolte des sérums	11
2. Tests sérologiques	12
2.1. Séroneutralisation pour titrage des anticorps dans un sérum	12
2.2. Inhibition de l'hémagglutination	13
2.3. ELISA pour la détermination des IgG et IgM dans un sérum	14
2.3.1. Production et purification de l'antigène	14
2.3.2. Test	15
3. Tests virologiques	17
3.1. Essais d'isolation de virus	17
3.1.1. Essais d'isolation sur souris	17
3.1.2. Essais d'isolation sur culture de cellules	17

	Page
3.2. Détermination des souches de virus	18
3.2.1. Séroneutralisation virale	18
3.2.2. Hémagglutination et inhibition de l'hémagglutination	18
3.2.3. Réaction du pouvoir infectieux	18
3.2.4. Sensibilité à l'éther et au chloroforme	18
3.2.5. Ultrafiltration	19
4. ELISA pour la détection et la détermination de l'antigène viral	19
4.1. Production d'antisérum CEE dans le lapin	19
4.2. Isolation des immunoglobulines par précipitation au sulfate d'ammonium	20
4.3. Chromatographie d'affinité	20
4.4. Fabrication d'un conjugué - HRPO anti-CEE	21
4.5. Test	22
5. ELFA pour la détection et la détermination de l'antigène viral	23
5.1. Test	23
 III. <u>RESULTATS</u>	 24
1. L'ELISA pour la détection des anticorps dans un sérum	24
1.1. Production de l'antigène	25
1.2. Détection des IgG et des IgM	27
2. Détection et détermination de l'antigène viral CEE par le test ELISA	28
2.1. Détermination de la sensibilité et de la spécificité de l'ELISA; comparaison avec l'ELFA	30
3. Investigations sérologiques	35
3.1. Chez l'homme	35
3.2. Chez le mouton	40
3.3. Chez le chien	41
4. Investigations virologiques	43
5. Souches de virus non identifiées (I.276, T.229, T.243)	49

	Page
6. Etude épidémiologique détaillée dans la région de Thoune	51
7. Etude épidémiologique de l'encéphalite à tiques dans le canton de Zurich	54
7.1. Foyer naturel de la région de Glattfelden	54
7.1.1. Situation et caractérisation du foyer	54
7.1.2. Tiques sur hôtes	59
7.1.3. Tiques libres	60
7.1.4. Etudes virologiques	62
7.2. Répartition saisonnière des cas cliniques humains dans le canton de Zurich	62
7.3. Répartition géographique	63
IV. <u>DISCUSSION ET CONCLUSIONS</u>	66
1. Introduction de nouvelles méthodes	66
2. Recherches épidémiologiques	67
3. Le virus de l'encéphalite à tiques dans la nature	75
3.1. Cycle du virus de l'encéphalite à tiques dans la nature	75
3.2. Y a-t-il une variation dans la virulence des souches d'encéphalite à tiques ?	77
3.3. Fonctionnement d'un foyer: Cycles endophile et exophile	80
<u>REMERCIEMENTS</u>	82
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	84

## I. INTRODUCTION

### 1. Définition et classification

Le virus de l'encéphalite à tiques, un Flavivirus de la famille des Togaviridae, appartient au groupe des Arbovirus (Arthropod-borne animal viruses). Les Arbovirus sont définis par l'O.M.S. comme "Virus maintenu dans la nature principalement par sa transmission biologique entre un hôte vertébré susceptible et un arthropode hématophage. Ils se multiplient et produisent une virémie dans le vertébré, se multiplient dans les tissus de l'arthropode et sont transmis à de nouveaux vertébrés par la morsure de l'arthropode après une période d'incubation éclipse" (114).

La plus grande partie des 408 Arbovirus catalogués (9) se situent dans les familles des Togaviridae (84 virus), des Bunyaviridae (113 virus), des Rhabdoviridae (29 virus), des Reoviridae (39 virus) et d'autres familles encore, le solde n'étant pas encore classifié (64).

Les Togaviridae comprennent aussi, outre des représentants des Arbovirus, d'autres virus qui ne sont pas transmis par des arthropodes. Les Arbo-Togaviridae se trouvent dans les genres Alphavirus (groupe antigénique A) et Flavivirus (groupe antigénique B). La plus grande partie des représentants de ces deux groupes sont confirmés comme étant "arthropod-borne". D'autres non-Arbo-Togaviridae sont les Rubivirus (Rubella virus, seul représentant de ce genre) et les Pestivirus.

Les Flavivirus possèdent un filament d'acide ribonucléique à un seul brin d'un poids moléculaire (PM) de  $4 \times 10^6$ , compris dans une capsidie d'un diamètre de 20 à 30 nm, de symétrie cubique. Cette capsidie est entourée d'un peplos (enveloppe) riche en lipo-protéines, dans lequel s'incorpore l'hémagglutinine. Le diamètre externe du virion est de 45 nm (64) à 70 nm (97) selon les auteurs. Trois polypeptides  $V_1$ ,  $V_2$  et  $V_3$  ont pu être isolés du virus. Les protéines  $V_1$  et  $V_3$  sont associées à l'enveloppe, tandis que la protéine  $V_2$

serait associée à la capside (33, 34). Ils sont responsables de l'antigénicité du virus.

Sérologiquement, les Flavivirus montrent une grande parenté entre eux, mais pas avec les autres Toqavirus (13, 14, 16).

## 2. Répartition

Il existe deux formes principales d'encéphalites à tiques à travers l'Europe et l'Asie, soit: la forme occidentale, l'encéphalite d'Europe centrale (CEE), et la forme orientale, la "russian spring-summer encephalitis" (RSSE). Si le vecteur principal du virus CEE est la tique Ixodes ricinus, celui du virus RSSE est I. persulcatus. La répartition de ces deux viroses correspond à celle des deux Ixodes (27). Dans l'ouest de l'URSS, les deux vecteurs coexistent et, de ce fait, les virus RSSE et CEE ont pu être isolés à partir de tiques capturées dans le même biotope (14). Les exigences écologiques particulières des vecteurs expliquent la répartition discontinue des viroses d'encéphalite à tiques, laquelle est liée à des foyers naturels bien définis.

Des foyers de CEE ont été localisés dans presque tous les pays d'Europe: Russie européenne (101), Hongrie (70), Yougoslavie (59), Tchécoslovaquie (10), Pologne (78), Bulgarie (9), Autriche (68), Suède (119), Finlande (11), Norvège (106, 107), Danemark, île de Bornholm (11), France (28), Italie (108), Suisse (117).

Un autre Flavivirus, le virus Louping Ill (LI), dont le vecteur est aussi I. ricinus, a été localisé dans les îles Britanniques (100). Ce virus, qui est antigéniquement presque identique au virus CEE (16), provoque des troubles du système nerveux central (SNC), surtout chez les moutons, les cas d'infection chez l'homme restant rares (115).

## 3. Le vecteur

La relation entre l'infection virale chez l'homme et la morsure d'une tique ne fut établie que durant la quatrième

décennie du 20ème siècle (58). L'éthiologie et l'épidémiologie de l'encéphalite à tiques ont été reconnues par ZILBER (121). Aujourd'hui, on admet que la tique I. ricinus est le vecteur principal du virus CEE (58, 64). Cependant, la transmission possible de ce virus par d'autres espèces de tiques a été prouvée par des essais de transmission expérimentale. D'autre part, plusieurs isolations de souches à partir de tiques capturées dans la nature ont été réalisées.

RIEDL et al. (92) isolèrent le virus CEE à partir d'adultes d'Haemaphysalis concinna libres. KOZUCH et NOSEK (45) réussirent ensuite à prouver la transmission transstadiale chez cette tique. GRESIKOVA et al. (25) isolèrent des souches de virus CEE à partir de H. inermis libres et purent également démontrer par la suite la transmission transstadiale. Selon ces auteurs, cette espèce pourrait fonctionner comme vecteur principal de la CEE dans les régions xérothermiques, c'est-à-dire plutôt dans le sud de l'Europe. Pour H. springera et H. turturis, NOSEK et al. (73) démontrèrent la transmission transstadiale et PAVLOV et al. (76) isolèrent le virus à partir de H. punctata récoltés sur des moutons. STREISSLE (103) a réussi la transmission transstadiale chez I. hexagonus et KOZUCH et NOSEK (44) chez Dermacentor marginatus et D. reticulatus.

Au laboratoire, chez ces 2 espèces, ces auteurs n'ont trouvé qu'un taux de virus assez bas lors de la transmission transstadiale, comparé à celui obtenu chez les Haemaphysalis et Ixodes. De ce fait, leur importance épidémiologique serait secondaire dans la circulation du virus CEE. PAVLOV et al. (76) ont cependant effectué des isolations à partir de D. marginatus capturés dans la nature.

Les Argasides semblent ne jouer aucun rôle comme vecteurs de la CEE. En effet, les essais de transmission du virus à des poussins, par des nymphes ou des adultes d'Ornithodoros moubata préalablement infectés de virus CEE, sont tous restés négatifs (STREISSLE) (104). Seule l'injection directe du microorganisme dans l'hémocèle des tiques donna des résultats

positifs. Selon STREISSLE, l'épithélium intestinal serait une barrière insurmontable pour le virus ingéré par voie naturelle.

D'autres arthropodes, vecteurs potentiels, ont été étudiés: moustiques des genres Culex (C. pipiens pipiens, C. molestus) (75, 98); Anopheles (A. maculipennis, A. messeae) (75, 98); Aedes (A. vexans) (98); puces des genres Xenopsylla (X. cheopsis), Nosopsyllus (N. fasciatus), Ctenophthalmus (C. assimilis) (99) ainsi que la mite Parasitus coleoptratus (74). En général, ces arthropodes ne restent porteurs de virus que pendant une période courte, soit de 1 à 7 jours. D'autre part, la transmission biologique du virus à un hôte n'a jamais été réussie expérimentalement.

Il faut donc admettre que le vecteur principal du virus CEE est I. ricinus chez qui ces transmissions transstadiale et transovarienne ont été démontrées. Les taux de virémie, après la nymphose, varient entre  $10^1$  et  $10^5$  LD<sub>50</sub>/ml (LD<sub>50</sub> = dose létale 50%) (47). Les adultes présentent en général de plus fortes virémies que les nymphes. Le virus peut persister dans la tique 200 à 300 jours au maximum, par conséquent aussi durant la diapause hivernale, après la mue (période pré-nutritionnelle). Si la période pré-nutritionnelle dépasse 1 an, le virus n'est alors plus détectable (48). La transmission transovarienne ne s'effectue qu'à un taux de l'ordre de 3% (89). CHUMAKOV (12), avec la tique I. persulcatus il est vrai, obtient de meilleurs résultats: l'espèce est restée virémique pendant trois générations!

#### 4. Les hôtes

Un grand nombre de vertébrés servent d'hôtes naturels au virus de l'encéphalite à tiques.

Néanmoins, selon les espèces, on observe différentes gradations dans la sensibilité de l'hôte au virus (6), soit:

1. résistance naturelle du type d'hôte;
2. grande sensibilité périphérique mais faible sensibilité

neurale;

3. grande sensibilité périphérique et neurale.

4.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle d'une espèce s'exprime par l'absence de toute multiplication du virus après injection intracérébrale ou périphérique. Les oiseaux semblent réunir souvent ces conditions. Ainsi, REHACEK *et al.* (90), de même qu'ERNEX et LICHARD (18), n'ont pu isoler le virus après l'infection expérimentale de Buteo buteo, Falco tinnunculus et Passer domesticus. Par contre, GRESIKOVA *et al.* (26) réussirent à isoler une souche de virus CEE à partir du sang de Tringa ochropus capturé dans la nature.

Chez d'autres vertébrés, RADDA *et al.* (79) démontrèrent la résistance naturelle de Capreolus capreolus. Ces auteurs admirent d'ailleurs que la résistance naturelle, ou la sensibilité, ne seraient pas seulement liées à l'espèce mais dépendraient aussi de la "disposition individuelle de l'animal".

4.2. Grande sensibilité périphérique  
mais faible sensibilité neurale

Ce type de relation virus-hôte se rencontre principalement chez les hôtes vertébrés naturels. Elle s'exprime par une viremie du sang circulant de l'animal sans toutefois atteindre le système nerveux central d'une manière grave. L'animal infecté ne montre donc pas de symptômes de maladie.

Toute une série de micromammifères ont été étudiés, tels que Clethrionomys glareolus (7, 19, 30, 49, 60, 93, 120), Microtus arvalis (49, 93), Apodemus flavicolis (7, 19, 30, 49, 82, 93, 120), Apodemus sylvaticus (30), Mus musculus (30, 85), Micromys minutus (69) et Talpa europea (7, 46, 50). Bien que, dans certains cas, il puisse y avoir multiplication du virus dans le cerveau, ces micromammifères ne présentent que très rarement des symptômes de maladie (93). Dans la nature, les individus sensibles seront éliminés au fur et à

mesure. Il s'établira un équilibre entre le virus et son hôte par une sélection naturelle réciproque.

Les carnivores Vulpes vulpes et Mustela nivalis présentent aussi ce type de sensibilité périphérique, développant des virémies durant 2 à 5 jours à des titres suffisamment hauts pour permettre l'infection de tiques (80).

En ce qui concerne les reptiles, GRESIKOVA et al. (24) démontrèrent expérimentalement des virémies chez Lacerta viridis durant 2 à 10 jours après injection sous-cutanée du virus. SIXL et al. (96) ont trouvé, lors d'une étude sérologique effectuée dans le terrain, des anticorps contre le virus CEE chez Anguis fragilis, Elaphe longissima et Natrix natrix.

#### 4.3. Grande sensibilité périphérique et neurale

Pour l'étude pathologique et immunologique de la plupart des Arbovirus, ce sont les "swiss white mice" et autres souches de souris blanches, à grande sensibilité neurale, qui sont régulièrement utilisées (32). Ces souris développent des encéphalites graves lors de l'injection de l'agent pathogène, que ce soit par voie intracérébrale ou sous-cutanée. Cette sensibilité est utilisée pour les essais d'isolation de souches d'Arbovirus. On choisit alors des souriceaux nouveau-nés. De façon moins prononcée, on observe aussi une certaine sensibilité neurale chez l'homme (cas cliniques d'encéphalite à tiques) et chez quelques autres vertébrés tels que V. vulpes (80) et Ovis aries (76).

#### 4.4. Virémie prolongée chez les mammifères; infection par voie alimentaire

Virémie prolongée chez les mammifères: Chez le hérisson (Erinaceus roumanicus) et le loir (Glis glis), KOZUCH et al. (51) réussirent à maintenir la virémie durant leur hibernation après infection expérimentale. Ces auteurs ont observé la présence du virus dans le sang du loir, y compris

pendant la période d'hibernation, durant 38 jours (max. 85 jours pour le hérisson). La principale phase de multiplication avait lieu immédiatement après le réveil des animaux. Toutefois, pour que la persistance du virus dans les hôtes vertébrés soit réalisée dans la nature, il importait que l'infection ait eu lieu peu avant leur hibernation. Dès le réveil, les hôtes devaient être alors infestés par les tiques pour que celles-ci aient une chance d'être infectées, fermant ainsi le cycle tique-hôte-tique.

Infection par voie alimentaire: VAN TONGEREN (105) a démontré que le virus CEE passe dans le lait de la chèvre infectée. Ce lait virémique peut provoquer une infection alimentaire chez l'homme et même donner lieu à de petites épidémies (101). Le mécanisme de l'excrétion du virus dans le lait a été surtout étudié chez la souris blanche (40). Ainsi, le virus se multiplie non seulement dans le système nerveux central, mais aussi dans la rate et les glandes mammaires. De jeunes souriceaux contractèrent la maladie en tétant des mères infectées. Lors de contaminations alimentaires, le virus atteint le cerveau par le nerf olfactif (40, 74).

Relevons finalement que la plupart des "infections de laboratoire" avec le virus CEE sont dues à des aérosols (ALBRECHT) (6). Il s'agit donc d'infections par voie olfactive. Ces aérosols peuvent être produits par l'ouverture prématurée d'homogénéisateurs ou lors de centrifugations de suspensions de virus avec des tubes mal équilibrés.

##### 5. L'encéphalite à tiques chez l'homme

L'infection de l'homme par le virus CEE se caractérise par une évolution de la maladie en deux phases (6, 52, 91, 102):

1) Après une période d'incubation de 3 à 14 jours débute une première phase à symptômes non spécifiques, voire même asymptomatique. Dans la plupart des cas, cette phase, qui dure environ 4 jours, est abortive. Elle correspond à la phase

virémique de la maladie (42) et est souvent considérée cliniquement comme "affection grippale".

2) Une semaine plus tard débute une deuxième phase, ceci uniquement dans 8 à 10% des cas, causée par l'invasion du système nerveux central par le virus et se caractérisant par une méningite, une méningoencéphalite ou une méningoencéphalomyélite pouvant durer de 2 à 14 jours. En général, les patients se remettent complètement de cette infection. Cependant, on connaît des cas d'encéphalite à tiques avec paralyse, localisée le plus souvent aux extrémités supérieures, ainsi que d'exceptionnels cas où la maladie présente une issue fatale (91).

Diagnostic : Durant la première phase de la maladie, le diagnostic peut être assuré par l'isolation du virus à partir du sang du patient (27). A un stade plus avancé, des anticorps spécifiques sont formés, mettant fin à la virémie. Le virus ne pourra alors être détecté que dans des cas létaux, dans le système nerveux central. Le diagnostic de laboratoire repose donc essentiellement sur des techniques sérologiques, les anticorps spécifiques étant présents dans le sang circulant du malade dès le début de la deuxième phase de la maladie.

La fixation du complément (FC) et l'inhibition de l'hé-magglutination (IHA) sont les tests les plus couramment utilisés. Toutefois, la tendance actuelle est de remplacer ces tests par l'ELISA (enzyme linked immuno-sorbent assay), permettant l'identification rapide des IgG et IgM spécifiques (36, 37). Les anticorps élaborés dès le début de l'infection sont les IgM, mais ceux-ci ne persistent que quelques semaines. Les IgG de même spécificité, qui les remplacent, sont décelables beaucoup plus longtemps. Il nous faut donc exclure les cas séro-positifs reposant sur une ancienne infection. Dans le cas d'une encéphalite où le patient présente des IgG mais pas d'IgM contre le virus CEE, il ne s'agit probablement pas d'une encéphalite à tiques.

## 6. L'encéphalite à tiques en Suisse

Du fait de la large répartition d'I. ricinus en Suisse (1), il eût été étonnant de ne pas rencontrer de foyers d'encéphalite à tiques dans ce pays (3).

En effet, KRECH et al. (53) et SPIESS et al. (102) rapportèrent en 1969 quelques cas cliniques. En 1972, WANDELER et al. (112) réalisèrent pour la première fois en Suisse l'isolation d'une souche de virus CEE à partir de la cervelle d'un chien provenant de Hallau (SH). En 1973, les mêmes auteurs décelèrent des anticorps contre ce virus dans le sérum de carnivores sauvages (91 cas positifs sur 560 animaux examinés) (111), malheureusement sans donner de précisions sur leur provenance. La même année, WYLER et al. (117), ainsi que RADDA et al. (86), localisèrent les premiers foyers naturels dans les cantons de Schaffhouse et de Zurich par l'isolation du virus à partir de tiques capturées dans la nature. En 1977, lors de recherches séroépidémiologiques effectuées à partir de sérums humains récoltés dans toute la Suisse, MUNZIGER et al. (71) trouvèrent des différences dans les taux d'infection variant de 0,2 à 1,3% selon les régions.

Pour les années 1970 à 1978, le nombre des cas annuels répertoriés d'encéphalites à tiques cliniques en Suisse a varié de 7 à 74 (52). La plupart de ces cas se sont manifestés vers la fin de l'été et en automne.

## 7. Buts du présent travail

### 1. Cadastre des foyers naturels d'encéphalite à tiques en Suisse

Le but principal de notre travail consistait à rechercher et localiser les foyers naturels d'encéphalite à tiques en Suisse. Pour ce faire, nous avons utilisé les méthodes suivantes:

- Recherche d'anticorps spécifiques dans les séras humains et d'animaux domestiques et sauvages,

provenant de la Suisse entière;

- Essais d'isolation du virus CEE à partir de tiques capturées dans la nature, principalement dans les régions où la population se serait révélée séro-positive.

## 2. Etude de foyers naturels d'encéphalite à tiques

Afin de comparer l'activité saisonnière d'I. ricinus avec l'apparition des cas d'encéphalite à tiques, nous avons tenté d'approfondir le rôle épidémiologique joué par cette espèce dans la circulation du virus, au cours de l'année, dans 2 biotopes au moins (nord du canton de Zurich et région de Thoune).

## 3. Introduction et mise au point de méthodes de laboratoire

Afin d'améliorer les techniques pour la détection d'infections récentes par la détermination des IgM, nous avons introduit et perfectionné le test ELISA pour la détection des anticorps contre le virus CEE.

Dans une deuxième phase, nous avons tenté de mettre au point une méthode permettant de détecter directement l'antigène viral dans la tique, dans des organes de vertébrés et dans des cultures de tissus infectés.

## II. MATERIEL ET METHODES

### 1. Récolte du matériel

#### 1.1. Capture des tiques

Dans la nature, les tiques ont été récoltées au drapeau (1) et introduites dans des tubes contenant un rectangle de papier légèrement humidifié. Transportées au laboratoire, elles ont été congelées dans une solution saline selon Hank PH 7,4, contenant 0,05% de BSA (bovin serum albumin), 100 U.I./ml de pénicilline, 100 µg/ml de kanamycine, (HALb), à -20°C. Les tiques en provenance du Tessin ont été prélevées en grande partie sur les hôtes et ont été conservées comme décrit plus haut.

#### 1.2. Capture des micromammifères

100 à 150 pièges durant 3 nuits par lieu de piégeage ont été employés dans les régions de Thoun (BE) et de Glattfelden (ZH). Aux micromammifères capturés dans la région de Thoun on a prélevé et congelé dans du HALb, la cervelle, la rate, le foie et les glandes salivaires, les organes d'un même individu étant groupés dans un tube, en vue d'essais d'isolation du virus.

#### 1.3. Récolte des sérums

Sérums humains: Les sérums humains nous sont parvenus principalement des deux sources suivantes: 1) laboratoires cliniques de différents hôpitaux, et 2) des employés forestiers des cantons de TG, SH, ZH, AG, SO, BE, FR et VD.

Sérums de chiens: Les sérums de chiens provenaient de sujets en traitement dans des cliniques vétérinaires de Zurich, Münchenstein (BL) et Berne.

Sérums de moutons: Les sérums de moutons ont été collectés dans la vallée du Haut-Rhin (SG, GR et Liechtenstein).

Sérums de micromammifères: Le sang des micromammifères a été obtenu par ponction intracardiaque.

Les aliquotes de sérums ont été conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 2. Tests sérologiques

### 2.1. Séroneutralisation pour titrage des anticorps dans un sérum

Principe: Dans ce test, le pouvoir infectieux du virus est neutralisé par les anticorps spécifiques présents dans un sérum. Ils se fixent sur les antigènes de la périphérie du virion. Le virus ainsi neutralisé ne pourra plus pénétrer dans la cellule sensible.

Le test de la séroneutralisation (SNT) est effectué avec une lignée continue de cellules rénales de porc, les cellules MPK (minipig kidney cells, American Type Culture Collection CCL 166 MPK) dans des plaques de microtitration (Micro Test II, Tissue culture plates with Lid, Falcon Products, Becton Dickinson and Co., Oxnard CA. 93030 U.S.A.). Pour la culture de ces cellules MPK, nous utilisons comme milieu nutritif du Eagle's MEM, Earle's base (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, BRD) avec double concentration d'acides aminés et de vitamines, et des antibiotiques (100  $\mu\text{g/ml}$  kanamycine, 100 U.I./ml penicilline). Pour la mise en culture de ces cellules, nous avons ajouté 20% de sérum de veau foetal (FCS) (Fetal calf serum, North American Biological, Miami, Florida 33169), pour les dilutions virales et sériques 3% de FCS.

La SNT pour titrage des anticorps dans un sérum s'effectue en mélangeant 1 volume de 200 TCID<sub>50</sub> (tissue culture infectious dosis 50%) du virus de référence I.40 (une souche de virus CEE isolée à partir de tiques récoltées dans la région de Schaffhouse (94)) avec 1 volume d'une dilution du sérum que l'on laisse ainsi en contact pendant 1,5 heure à  $37^{\circ}\text{C}$ . Cette dilution virus-sérum est ensuite inoculée à la culture de cellules à raison de 0,2 ml de la dilution/cupule (4 cupules/

dilution sérique). Après 6 jours d'incubation à 37°C, la lecture de l'effet cytopathogène (ECP) est effectuée. Le titre du sérum donné par le point de neutralisation 50% est calculé selon la méthode de REED et MUENCH (108).

Dans certains cas, nous avons effectué la SNT sur des souriceaux nouveau-nés, le principe du test restant le même. Les dilutions virales et sériques sont faites dans du Halb. Le mélange virus-sérum est inoculé intracérébralement par aliquotes de 0,01 ml/souriceau (4 - 5 souriceaux par dilution de sérum). Les souris sont ensuite contrôlées périodiquement pendant 3 semaines et le point de neutralisation 50% calculé selon la méthode de REED et MUENCH.

## 2.2. Inhibition de l'hémagglutination

Principe: Le test de l'inhibition de l'hémagglutination (IHA) est basé sur la propriété qu'ont certains virus, dont le virus CEE, d'agglutiner des érythrocytes. Cette agglutination peut être inhibée par des anticorps spécifiques dirigés contre le virus (ou antigène) utilisé dans le test.

Pour la production de l'hémagglutinine, nous utilisons le virus de référence I.40. La méthode décrite par CLARKE et CASALS (15) et par FRISCH-NIGGEMEYER (22) est employée pour la précipitation de l'antigène au sulfate de protamine à partir de la cervelle de souriceaux nouveau-nés infectés. La détermination des anticorps inhibant l'hémagglutination dans les sérums est effectuée selon la méthode de LENNETTE et SCHMIDT (57) dans le système de microtitration sur plaques (Greiner PS-Microtiterplatten, 96K, V-Form, Greiner Labor-technik, D-7440 Nürtingen) avec des érythrocytes d'oies.

Huit à seize unités hémagglutinantes de l'antigène sont utilisées dans le test à un pH final de 6,4. Pour l'évaluation des résultats, seuls des titres d'au moins 1:10 sont pris en considération.

### 2.3. ELISA pour la détermination des IgG et IgM dans un sérum

Principe: Dans le test ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), l'antigène est adsorbé sur une surface en plastique (= "coating"). Une dilution du sérum à tester est ensuite ajoutée. En présence d'anticorps spécifiques, ceux-ci vont s'attacher à l'antigène immobilisé sur le plastique. Des anti-"species"-globulines marquées avec une enzyme sont ajoutées et vont se fixer aux anticorps immobilisés. Chaque étape est suivie d'une procédure de lavage pour éliminer les réactifs qui sont restés en solution. Pour finir, le substrat est ajouté. La dégradation du substrat par l'enzyme provoque un changement de couleur. L'intensité de cette couleur sera en relation directe avec la quantité d'anticorps spécifiques immobilisés sur le plastique. L'ELISA nous donne donc des résultats qualitatifs et quantitatifs tout en n'utilisant qu'une seule dilution de sérum (109).

#### 2.3.1. Production et purification de l'antigène (31, 32, 36)

Pour le test ELISA, l'antigène est produit sur des explants primaires de fibroblastes de poulet. A des embryons de poulets âgés de 11 jours, on coupe les extrémités et la tête et on éloigne les entrailles ainsi que le coeur. Le reste est trypsiné pendant 30 min. à température ambiante (Difco trypsin 1 : 250; 0,125% dans du PBS, tampon phosphate salin, avec 100 U.I./ml pénicilline, 100 µg/ml streptomycine) sous agitation continue. Cette suspension de cellules est ensuite filtrée à travers de la gaze stérile et centrifugée 10 min. à 200 g. Le surnageant jeté, la masse cellulaire est resuspendue dans le milieu nutritif (Eagle's MEM - 30 mM N-2 hydroxyéthylpipérazine - N'-2 éthanesulfonacide (HEPES) - 100 U.I./ml pénicilline - 100 µg/ml streptomycine) enrichi de 5% de FCS. Les cellules sont comptées au Coulter Counter et réparties dans des roller bottles (Corning, 490 cm<sup>2</sup> / Tissue Culture Roller Flask) à raison de 150 x 10<sup>6</sup> cellules par roller bottle.

Lorsqu'une nappe unicellulaire confluyente s'est formée, ceci après 48 heures d'incubation à 36°C, les cellules sont infectées avec le virus CEE (souche I.40). La dose infectante est de 5 à 10 TCID<sub>50</sub> par cellule. Après 1,5 heure d'incubation, on ajoute 30 ml/roller-bottle de milieu contenant 5% de FCS et on incube les cellules 24 heures à 36°C. Ce milieu est ensuite remplacé par un milieu sans FCS d'un pH de 8,0. Après une nouvelle période d'incubation de 20 heures, le surnageant est récolté (première récolte du virus). En répétant cette dernière étape, nous avons pu effectuer une deuxième récolte du virus. Les débris cellulaires de cette suspension virale sont éliminés par centrifugation à 10'000 g pendant 30 min. (centrifugeuse Sorvall, GSA-angle rotor, 6 x 220 ml). Le virus est inactivé par adjonction de 0,02% de formaldéhyde au surnageant suivi de 24 heures d'incubation à 37°C. Il est ensuite sédimenté à 25'000 g, 20 heures dans le Sorvall GSA angle rotor. Le sédiment est resuspendu dans 1 ml de tampon TEA (triaethanolamine 0,05M - NaCl 0,1M - pH 8,0). Cette suspension virale est ensuite purifiée sur un gradient linéaire de saccharose de 5 - 20% (w/v), 110 min. à 25'000 tours à 4°C (Beckmann Ultracentrifuge, SW 40 rotor). Après la centrifugation, le virus se trouve environ à mi-hauteur du tube sous forme d'une bande nette et opaque. Cette bande est aspirée à l'aide d'une pompe péristaltique en introduisant un microcappillaire dans le tube jusqu'à la hauteur du virus, puis elle est diluée dans du tampon TEA à au moins 10 fois le volume initial et sédimentée à 20'000 tours durant 120 min. à 4°C (SW 40 rotor). Le sédiment est ensuite resuspendu dans 1 ml de tampon TEA et congelé à - 70°C.

### 2.3.2. Test

L'ELISA est effectué selon VOLLER et al. (109), dans les plaques de microtitration à fond plat (Dynatech Microelisa Plates M129 A, Dynatech Produkte AG, CH-8302 Kloten). Les taux de l'antigène, des sérums et du conjugué ont été déterminés lors de tests préalables de façon que le sérum positif de référence nous donne une absorption (abs) de 1 et le sérum de

contrôle négatif, une absorption plus petite que 0,05.

L'antigène est dilué à 0,8 µg de protéine/ml dans un tampon carbonate-bicarbonate 0,05 M - pH 9,6 (coating buffer). 60 µl de cette solution sont pipetés dans chaque cupule d'une plaque de microtitration, qui est ensuite incubée durant la nuit à 4°C dans une chambre humide. La plaque est lavée trois fois de suite dans du PBS enrichi de 0,05% de Tween 20 (PBS Tween) avec le Multiwash (Skatron Multiwash, Flow Laboratories AG, Baar/ZG).

Les sérums à tester ainsi que les sérums de contrôle, positifs et négatifs, sont ajoutés à une dilution de 1:40 dans du tampon Tris (NaCl 0,15 M -  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  1mM - Tris-HCl 0,05 M - BSA 0,1% - Tween 20 0,05% - pH 7,4) à raison de 50 µl par cupule (2 cupules par sérum) et incubé pendant 1,5 heure à 37°C dans une chambre humide. La plaque est ensuite lavée trois fois comme décrit plus haut.

Le conjugué (Goat anti Human IgG (Fc)-HRPO (horseradish-peroxidase) ou (Goat anti Human IgM (Fc)-HRPO, Nordic Immunological Laboratories, Biogenzia Lemania SA, CH-1004 Lausanne) est dilué à 1:1000 pour la détermination des IgG et à 1:500 pour les IgM dans le tampon Tris. Il est ajouté dans la plaque à raison de 50 µl par cupule et incubé pendant 3 heures dans une chambre humide à température ambiante. La plaque est ensuite lavée trois fois. On procède alors à un deuxième cycle de lavage avec de l'eau désionisée.

Comme substrat, nous utilisons de l'OPD (Orthophénylène-diamine, Fluka AG, Buchs/SG) à 0,4 mg/ml dans un tampon phosphate-citrate 0,1 M - pH 5,0 et 0,4 µl/ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 30%, à raison de 200 µl de substrat par cupule. Après 30 min., le développement de la couleur est stoppé avec 50 µl de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2,5 M par cupule et la densité optique mesurée à 495 nm avec un ELISA-Reader (Titertek Multiskan, Flow Laboratories AG, CH-6340 Baar/ZG).

### 3. Tests virologiques

#### 3.1. Essais d'isolation de virus

##### 3.1.1. Essais d'isolation sur souris

Les tiques, classées selon l'espèce, le stade évolutif (larve, nymphe, adulte) et le sexe, sont broyées, dans un mortier refroidi à 4°C, par pool de 5 - 20 adultes, 10 - 50 nymphes ou larves, dans 1 ml de HALb. Le broyat est sédimenté à 8'000 g pendant 3 min. et le surnageant inoculé intracérébralement (ic) à des souriceaux nouveau-nés, soit 0,01 ml par souriceau à raison d'une demi-portée (4 à 5 souriceaux) par pool de tiques. Pour les essais d'isolation à partir d'organes de mammifères, une suspension de 10% dans du HALb de ces organes est inoculée comme décrit plus haut. Les souris sont contrôlées périodiquement pendant 20 jours. Chez les souris présentant des symptômes de paralysie, la cervelle est prélevée pour effectuer des passages successifs par inoculation ic à de nouvelles portées de souris sous forme d'une suspension de cervelle de 1% dans du HALb.

##### 3.1.2. Essais d'isolation sur culture de cellules

Parallèlement aux expériences effectuées sur souris, une partie des pools de tiques a été inoculée à des cultures de cellules. Nous utilisons des cellules MPK dans des plaques Costar (Costar Tissue Culture Cluster 24, 205 Broadway, Cambridge, Mass. U.S.A.) ou dans des tubes Corning (Corning 16 x 125 mm/Tissue Culture Tube with Screw Cap, Polystyrene, Corning, New York 14830). Les cellules de deux cupules (plaque Costar) ou de deux tubes Corning sont inoculées avec 0,1 ml des pools de tiques préparés comme décrit plus haut. Après absorption de cette suspension pendant 1,5 heure à 37°C, nous ajoutons 0,8 ml par cupule ou 1 ml par tube de milieu nutritif (voir 2.1.) enrichi de 3% de FCS. La présence ou l'absence d'un ECP chez ces cellules est contrôlée après 5 à 6 jours d'incubation à 35°C.

A partir des tubes Corning, des passages successifs ont été effectués. Après avoir été lavées 2 fois avec du PBS, les cultures de cellules sont trypsinées (solution trypsine enrichie de 0,68 mM EDTA), resuspendues dans du milieu nutritif frais et rediluées à 1:2 dans le même tube. Si, après 5 à 6 jours d'incubation à 35°C, il n'y a pas d'apparition d'ECP, un deuxième passage est effectué de la même manière.

### 3.2. Détermination des souches de virus

Les souches de virus sont déterminées lors du troisième ou quatrième passage sur souriceaux.

#### 3.2.1. Séroneutralisation virale

Dans cette réaction, nous avons testé 100 TCID<sub>50</sub> de chaque souche de virus contre différents sérums CEE de référence, la méthode étant la même que celle décrite pour la détermination d'anticorps neutralisants (voir 2.1.).

#### 3.2.2. Hémagglutination et inhibition de l'hémagglutination

A partir de chaque souche, une hémagglutinine a été fabriquée et testée contre différents sérums de référence selon les méthodes décrites en 2.2..

#### 3.2.3. Réaction du pouvoir infectieux

Le dosage du pouvoir infectieux est déterminé en culture de cellules (cellules MPK) sur plaques de microtitration, la TCID<sub>50</sub> étant calculée selon la méthode de REED et MUENCH (87)

#### 3.2.4. Sensibilité à l'éther et au chloroforme

La sensibilité des souches de virus à l'éther et au chloroforme est testée en incubant une suspension virale avec 20% d'éther ou 10% de chloroforme pendant 12 heures à 4°C. La TCID<sub>50</sub> du virus traité est ensuite comparée avec celle du virus non traité.

### 3.2.5. Ultrafiltration

Le diamètre approximatif des virions est évalué par ultrafiltration (filtres millipore, Millipore SA, F-67100 Molsheim, France).

## 4. ELISA pour la détection et la détermination de l'antigène viral

Principe: Le principe de ce test est similaire à l'ELISA pour la détection d'anticorps dans un sérum (voir 2.3.). Nous avons immobilisé des CEE - anticorps sur le plastique, qui fixeront les particules virales de la suspension à tester. On ajoute ensuite un sérum positif spécifique. Les anticorps réagiront ensuite avec les virions. Ces anticorps, qui dénoncent la présence du virus, pourront être détectés par la réaction enzymatique après adjonction du conjugué. Il s'agit donc ici d'un "double antibody sandwich ELISA" modifié (109), car l'antigène recherché se trouve entre les anticorps immobilisés sur le plastique et les anticorps utilisés pour la détection de cet antigène. Ces deux anticorps doivent provenir de différentes espèces, étant donné que le conjugué doit se fixer sur les anticorps ayant réagi avec l'antigène et non sur les anticorps immobilisés sur le plastique.

### 4.1. Production d'antisérum CEE dans le lapin

Un antisérum CEE est préparé, par injection intramusculaire répétée au lapin, d'une suspension de virus (souche I.40) inactivée, concentrée et purifiée par ultracentrifugation (voir 2.3.1.). Les injections sont préparées en émulsant 0,1 mg de protéines virales diluées dans 0,5 ml de PBS avec 0,5 ml d'adjuvant complet (Bacto Adjuvant Complete, H 37 Ra, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.). Dès que les lapins présentent un taux d'anticorps d'un titre d'au moins 1:1280, l'antisérum est prélevé par exsanguination par les carotides.

#### 4.2. Isolation des immunoglobulines par précipitation au sulfate d'ammonium

La précipitation des immunoglobulines (29) est effectuée en ajoutant goutte à goutte à 2 volumes de sérum 1 volume de sulfate d'ammonium saturé à pH 7,2 (pH ajusté avec du Tris saturé), en agitant continuellement avec un barreau aimanté. Cette suspension est laissée 3 heures à température ambiante et est ensuite centrifugée à 3'000 g pendant 30 min. Le sédiment est resuspendu dans de l'eau bidistillée. Cette précipitation est répétée deux fois. Le dernier sédiment est resuspendu dans du PBS (1/3 du volume initial de sérum) durant la nuit à 4°C et dialysé extensivement contre du PBS. La précipitation se formant durant la dialyse est éliminée par centrifugation.

#### 4.3. Chromatographie d'affinité

0,7 g de CNBr-Sépharose 4B activée (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala) est lavé avec 100 ml de HCl 1 mM sur un filtre en verre fritté (17D3). 0,2 mg de virus CEE inactivé et purifié (voir 2.3.1.) dans 3 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M - NaCl 0,5 M - pH 8,3 est immédiatement ajouté au gel lavé et agité sur un "orbital shaker" à 4°C durant la nuit. Le gel est ensuite centrifugé à 2'000 g pendant 20 min. et le sédiment resuspendu dans 5 ml d'éthanolamine 1 M - NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M - NaCl 0,5 M et agité comme décrit précédemment (l'éthanolamine bloque les groupes actifs du gel restés libres).

Le gel est ensuite lavé 3 fois avec 30 ml de tampon acétate 0,1 M - NaCl 1,0 M - pH 4,0 alternativement avec 30 ml de tampon borate 0,1 M - NaCl 1,0 M - pH 8,5 et paqueté dans une colonne (pipette pasteur bouchée avec de la laine de verre). Cette colonne est montée dans une chambre froide et lavée avec 10 à 20 gel-volumes de tampon Tris-HCl 0,1 M - NaCl 0,5 M - pH 8,0 (tampon de lavage) à raison de 60 ml par heure à l'aide d'une pompe péristaltique. 5 ml d'immunoglobulines de lapin (CEE-spécifique) dans du tampon de lavage (7 mg/ml) sont passées au travers du gel en circuit fermé pendant 12 heures à

raison de 6 ml par heure. Le gel est ensuite lavé durant une nuit avec le tampon de lavage (6 ml/heure) pour éliminer les protéines n'ayant pas réagi avec l'antigène viral couplé au gel. L'éluion des immunoglobulines est effectuée avec 4 ml de NaSCN 3N. Après avoir déconnecté la pompe péristaltique, le NaSCN est pipeté sur la colonne. Des fractions de 1 ml sont collectées au bas de la colonne et immédiatement dialysées contre du PBS. Les fractions contenant les immunoglobulines spécifiques sont déterminées au test IHA. Après avoir été lavé avec 10 à 20 gel-volumes de tampon de lavage, le gel est régénéré avec 10 gel-volumes de Tris-HCl 0,1 M - NaCl 0,5 M - pH 8,5, suivis de 10 gel-volumes de Na-acétate 0,1 M - NaCl 0,5 M - pH 4,5. La colonne est ensuite rééquilibrée dans le tampon de lavage avant d'être réemployée.

#### 4.4. Fabrication d'un conjugué - HRPO anti-CEE

La conjugaison du HRPO (horseradish peroxidase) est effectuée selon la méthode au periodate décrite par WILSON et NAKANE (116).

4 mg de HRPO (Biogenzia Lemania SA, CH-1004 Lausanne) sont dissous dans 1 ml d' $H_2O$ ; 0,2 ml de  $NaIO_4$  0,1 M sont ajoutés. Ce mélange, après avoir été agité 20 min. à température ambiante, est dialysé durant la nuit contre du tampon Na-acétate 1 mM - pH 4,4 à 4°C (oxydation du carbohydre - reste de l'HRPO). A cette enzyme activée, on ajoute 20  $\mu$ l de tampon carbonate 0,2 M pH 9,5 et, immédiatement après, 8 mg d'IgG (voir 4.2.). Le mélange est alors agité pendant deux heures à température ambiante. La base de Schiff qui s'est formée entre l'anticorps et l'enzyme est stabilisée par adjonction de 0,1 ml d'une solution de  $NaBH_4$  (4 mg/ml  $H_2O$ ). La solution est ensuite laissée 2 heures à 4°C. Le conjugué HRPO-IgG est isolé de la solution par précipitation au sulfate d'ammonium. On ajoute 1 volume de  $(NH_4)_2SO_4$  saturé à 1 volume de la solution. Après centrifugation à 2'000 g pendant 15 min., le précipité est lavé 2 fois avec du  $(NH_4)_2SO_4$  à 50%. Le conjugué est ensuite dialysé extensivement contre du PBS. Après

adjonction de 1% de BSA, le conjugué est filtré (0,22 µm Millipore) et conservé à - 20°C.

#### 4.5. Test

Les immunoglobulines anti-CEE purifiées sont diluées à 65 ng/ml dans du tampon carbonate-bicarbonate 0,05 M pH 9,6, pipetées dans une plaque de microtitration (Dynatech Micro-elisa plate M 129 A) à raison de 60 µl/cupule et incubées à 4°C durant la nuit dans une chambre humide. La plaque est ensuite lavée 3 fois de suite dans du PBS-Tween avec le Multi-wash (= 1 cycle de lavage). Le matériel à tester concentré, ou dilué dans du tampon Tris, est ajouté à raison de 50 µl/cupule (au moins 2 cupules par aliquote) et incubé durant la nuit à 4°C dans une chambre humide. La plaque est ensuite soumise à 2 cycles de lavage.

A chaque cupule sont ajoutés 50 µl d'un sérum humain CEE-positif à une dilution de 1:40 dans le tampon Tris. La plaque est incubée 1,5 heure à 37°C dans une chambre humide, puis lavée (2 cycles de lavage). Le conjugué (Rabbit-anti-Human IgG (Fc), alcaline phosphatase conjugated, Dynatech Diagnostics INC) est ajouté à une dilution de 1:100 dans du tampon Tris à raison de 50 µl/cupule. La plaque est alors incubée pendant 3 heures dans une chambre humide à température ambiante, puis lavée (2 cycles de lavage).

Le substrat (Sigma 104 Phosphatase substrate tablets - 1 mg/ml de tampon carbonate pH 9,8 - MgCl<sub>2</sub> 1 mM) est ajouté à raison de 200 µl/cupule. La réaction colorimétrique est mesurée à 405 nm avec un ELISA-Reader après 2 heures et/ou 20 heures d'incubation à 37°C dans une chambre humide.

Nous avons aussi effectué ce test avec un conjugué HRPO (Rabbit-anti-Human IgG (Fc), Peroxidase conjugated, Dynatech Produkte AG, CH-8302 Kloten). Dans ce cas, nous avons utilisé comme substrat de l'OPD comme décrit dans 2.3., le principe du test restant le même. Nous avons également effectué cet ELISA avec un conjugué HRPO anti-CEE (voir 4.4. pour la fabrication de ce conjugué). Ce conjugué détectant directement

l'antigène viral, nous simplifions donc le test. En effet, il n'est plus nécessaire d'ajouter un sérum humain CEE-positif comme décrit plus haut, la suite de la procédure restant la même.

#### 5. ELFA pour la détection et la détermination de l'antigène viral

Principe: L'ELFA (enzyme linked fluorescence assay) est basé sur le même principe que l'ELISA. Seule la détection de l'enzyme est différente. Si, dans l'ELISA, on utilise un système enzyme-substrat produisant un changement de couleur du substrat, la réaction utilisée pour l'ELFA nous donne un produit fluorescent, donc détectable avec un fluorimètre (118).

##### 5.1. Test

Le procédé du test est le même que celui de l'ELISA (voir 4.). Comme substrat, nous avons utilisé du MUP (4-Methylumbelliferyl phosphate, Sigma chemical company) (118): MUP 0,1 mM dans du tampon triéthanolamine 0,05 M - MgCl 0,01 M pH 9,8) à raison de 200 µl/cupule. Après incubation de la plaque pendant 2 heures à 37°C dans une chambre humide, le contenu de chaque cupule est transféré dans un tube de verre contenant 1,8 ml de tampon triéthanolamine. La réaction est ensuite mesurée à l'aide d'un fluorimètre (Perkin-Elmer Fluoreszenz Spektrophotometer 3000) avec, comme longueur d'onde d'excitation 360 nm, l'émission étant mesurée à 470 nm.

### III. RESULTATS

#### 1. L'ELISA pour la détection des anticorps dans un sérum

La seule méthode valable permettant le diagnostic d'une encéphalite à tiques est l'analyse sérologique, l'isolation du virus n'étant pas possible dans la majorité des cas (voir p. 8). L'apparition des anticorps dans le sérum correspond au début de la deuxième phase de la maladie (phase clinique), avec, en premier lieu, la production d'immunoglobulines de la classe G. Dans notre laboratoire, pour assurer le diagnostic d'une infection récente, nous avons testé par l'IHA 2 séra prélevés pendant la phase clinique à un intervalle d'environ deux semaines. Une augmentation significative d'au moins 2 taux de dilution était la preuve d'une infection récente. Malheureusement, le plus souvent, les aliquotes des séra avaient été prélevés trop tard au cours de l'infection et l'augmentation du titre des anticorps ne pouvait être démontrée.

D'autres laboratoires utilisent la fixation du complément (FC) comme technique de diagnostic. Ainsi, des titres élevés d'anticorps (1:64 ou plus) seraient dus à une infection récente car les anticorps FC disparaissent plus rapidement du sérum que les anticorps IHA ou SN. Contrairement à cette observation, HOFMANN (35) a constaté que de tels taux d'anticorps FC apparaissent souvent seulement après la troisième vaccination contre l'encéphalite à tiques.

Une autre méthode utilisée pour diagnostiquer une infection récente consiste à traiter le sérum au 2-mercaptoéthanol (2-ME) puis à réaliser un test IHA (56). Un abaissement du titre du sérum par ce traitement (lequel réduit sélectivement le titre des IgM) prouve une infection récente.

Actuellement, l'ELISA est en passe de devenir le test de choix pour le diagnostic sérologique en virologie. En effet, il permet la détection et la différenciation directe des IgG et des IgM. Il est facile, rapide et peu coûteux à

effectuer. Nous avons donc décidé d'introduire ce test, décrit pas HOFMANN (36), pour l'étude de l'encéphalite à tiques dans notre laboratoire, ce qui a nécessité certaines mises au point d'ordre technique.

### 1.1. Production de l'antigène

L'antigène utilisé dans l'ELISA doit être d'une pureté optimale. Le virus produit sur les animaux de laboratoire étant difficile à purifier, la plupart des auteurs choisissent un système en culture de cellules pour la production de l'antigène. C'est aussi la méthodologie que nous avons utilisée.

Le comportement du virus CEE (souche I.40) sur cultures primaires de fibroblastes de poulets est présenté dans la figure 1.

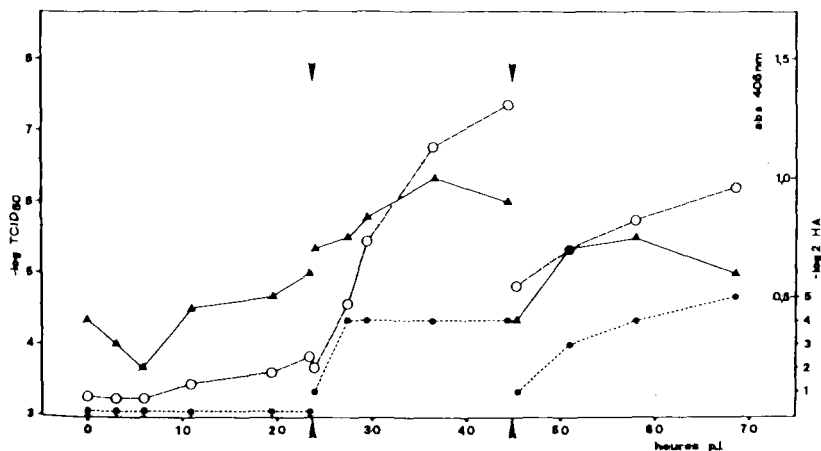


Figure 1 : Multiplication du virus CEE en culture primaire de fibroblastes de poulets.

TCID<sub>50</sub> : tissu culture infectieux dosis 50%;

HA : hémagglutinine; p.i.: post infection; ◀▶ : virus infectieux (TCID<sub>50</sub>); ●---● : hémagglutinine (unités HA); ○---○ : antigène détecté par ELISA (double antibody sandwich ELISA modifié); ▲ : changement de milieu de culture.

Le mode d'infection et la récolte virale sont décrits dans le chapitre "Matériel et Méthodes" (2.3.1.). Ainsi, nous avons mesuré la dose infectante et la quantité d'antigène du surnageant à différents intervalles de temps. Le taux d'antigène a été déterminé par l'hémagglutination et par ELISA (ELISA pour la détection de l'antigène viral).

Après une phase d'éclipse d'au moins 6 heures, la production de virus augmente jusqu'à la 36ème heure environ après l'infection. Ensuite, elle baisse continuellement. La coupure des courbes après 24 heures et 45 heures est due au changement de milieu nutritif. Après 45 heures de culture, l'abaissement du taux de virus infectant provient d'un effet cytopathique du virus. Celui-ci atteint 90 à 100% des cellules 69 heures après l'infection. D'autre part, on constate une inactivation thermique du virus. Par contre, par ELISA comme par HA, on observe le début de la production en grande quantité de l'antigène entre 20 et 24 heures après l'infection. Elle reste constante jusqu'à la fin de l'expérience. Avant le premier changement de milieu à 24 heures après l'infection, on ne détecte pas d'hémagglutinine dans le surnageant. Cela est sans doute dû à la présence de FCS dans le premier milieu, ce qui inhibe l'hémagglutination (31). D'autre part, il est connu que contrairement aux Alphavirus, les Flavivirus ont une phase de latence longue de 12 heures au minimum avant le début de la transcription (113).

Sur les deux récoltes d'antigène (récolte I à 45 heures et récolte II à 69 heures après l'infection), après inactivation, purification et concentration à 1ml par récolte, le taux de dilution requis pour l'ELISA est déterminé par un ELISA préalable effectué avec des dilutions de ces antigènes I et II (titrage de l'antigène) et le sérum positif de référence I et II dilué 1:40. La dilution d'antigène donnant une absorption de 1,0 avec le sérum de référence est la dilution utilisée pour le test. La production décrite plus haut, effectuée avec 15 "roller-bottles", nous a ainsi fourni des antigènes à des titres de 1:1200 et 1400 (II), ce qui permet la

sensibilisation d'environ 250 plaques de microtitration. Notons encore que la perte d'antigène lors de la purification sur gradient de saccharose est environ 10 fois supérieure avec le virus actif qu'avec le virus préalablement inactivé à la formaldéhyde. Cette perte pourrait être due à une agglomération du virus actif lors de la sédimentation, la fixation à la formaldéhyde empêchant celle-ci.

### 1.2. Détection des IgG et des IgM

Pour évaluer la sensibilité et la spécificité de cet ELISA, nous avons analysé la présence ou l'absence l'IgG et d'IgM spécifiques dans environ 250 séra de forestiers IHA-positifs et négatifs des cantons de Zurich et de Schaffhouse, ainsi que dans 23 séra provenant de patients ayant subi une infection récente avec le virus CEE. L'analyse de ces séra a été effectuée à une dilution unique de 1:40.

	IgG	IgM
forestiers	31 / 250 *	0 / 250
patients	22 / 23	23 / 23

Tableau 1 : Détection, par ELISA, des IgG et IgM spécifiques dans le sérum de patients ayant subi une infection récente avec le virus CEE, et dans le sérum de forestiers.

\* : nombre de sérums positifs / nombre de sérums analysés

Une nette démarcation existe entre les sérums positifs et négatifs, les positifs ayant tous une absorption (exprimée par la matrice \*) > 2. Quelques séra négatifs mis à part,

\* En choisissant l'expression de l'absorption par la matrice, l'ELISA-reader subdivise en 10 bandes d'absorption égales la gamme des valeurs mesurées entre 0 et un maximum choisi par l'opérateur. L'absorption mesurée sera classée d'après ces bandes et exprimée par des chiffres allant de 0 à 9. Donc, en choisissant par exemple une absorption max. de 1,500, les valeurs d'absorption se situant entre 0,000 et 0,150 seront exprimées par 0, celles entre 0,151 et 0,300 par 1, etc.

(absorption se situant entre 1,0 et 1,5), la grande majorité des séra négatifs montraient une absorption  $< 1,0$ .

Comme on peut le voir dans le tableau 1, aucun des séra positifs de forestiers ne contenait des IgM, ce qui suppose que le contact avec le virus CEE devait dater de plusieurs mois déjà, voire de plusieurs années. Les séra des patients cliniques, par contre, contenaient tous des IgM contre le virus CEE, ceci sans exception. Dans un seul cas, nous avons détecté dans le premier sérum d'un patient des IgM, mais pas d'IgG. Celles-ci étaient cependant présentes dans le deuxième sérum prélevé deux semaines plus tard. Lorsque l'on ne détecte que des IgM, il est indispensable d'analyser une deuxième aliquote de sérum prélevé 1 à 2 semaines plus tard pour détecter l'apparition des IgG. En effet, la seule présence d'IgM peut être aussi due à une réaction non spécifique provoquée par le facteur rhumatoïde. Un sérum montrant des IgG et des IgM peut aussi être dû à la combinaison du facteur rhumatoïde (IgM) et d'une ancienne infection avec le virus CEE (IgG). Toutefois, la probabilité d'une telle combinaison est minime; elle est inférieure à 0,1% (36).

## 2. Détection et détermination de l'antigène viral CEE par le test ELISA

Nous avons pour but l'introduction d'un test permettant l'identification rapide du virus CEE dans un organe, une culture cellulaire ou même directement dans la tique. Nous avons alors mis au point le test ELISA pour détecter cet antigène.

La fixation d'immunoglobulines de lapins immunisés contre le virus de l'encéphalite à tiques, sur les plaques de microtitration, n'a pas donné de résultats concluants. Il nous a donc fallu purifier ces Ig-anti-CEE par chromatographie d'affinité.

Le taux d'antigène fixé sur la sépharose a été déterminé par ELISA, en immobilisant des dilutions d'antigène avant et après la réaction. La dilution donnant une absorption à 495 nm

de 0,4 avec le sérum positif de référence était de 1:20'000 avant la réaction, et de 1:200 après la réaction. Le 99% du virus a donc été adsorbé par le gel.

L'éluion des anticorps purifiés après adsorption des anti-CEE-Ig de lapins par le gel est présenté dans la figure 2. Le pool des fractions 2 à 7 montrait un titre de 1:320 à l'IHA et un taux de protéines de 0,015 mg/ml. Etant donné que le matériel de départ avait un titre de 1:2560 à l'IHA et un taux de protéines de 7,0 mg/ml, nous avons obtenu une purification des Ig d'un facteur de 60, en tenant compte du titre des anticorps. La dilution de travail de ces anticorps a été déterminée par des tests ELISA préalables, à une concentration de protéines de 65 ng/ml, soit une dilution de 1:240 de ces anticorps purifiés.

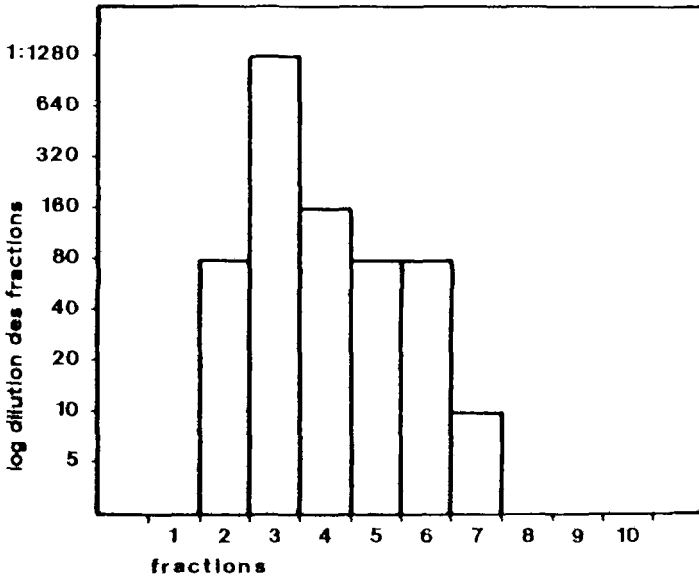


Figure 2 : Chromatographie d'affinité: éluion des CEE-Ig au NaSCN 3N. Fractions de 1 ml dialysées mesurées par l'IHA.

2.1. Détermination de la sensibilité et de la spécificité de l'ELISA; comparaison avec l'ELFA

Pour analyser la sensibilité de l'ELISA, nous avons testé une titration de notre virus de référence I.40, dont le titre comportait  $10^{7,5}$  TCID<sub>50</sub>/0,05 ml sur cellules MPK.

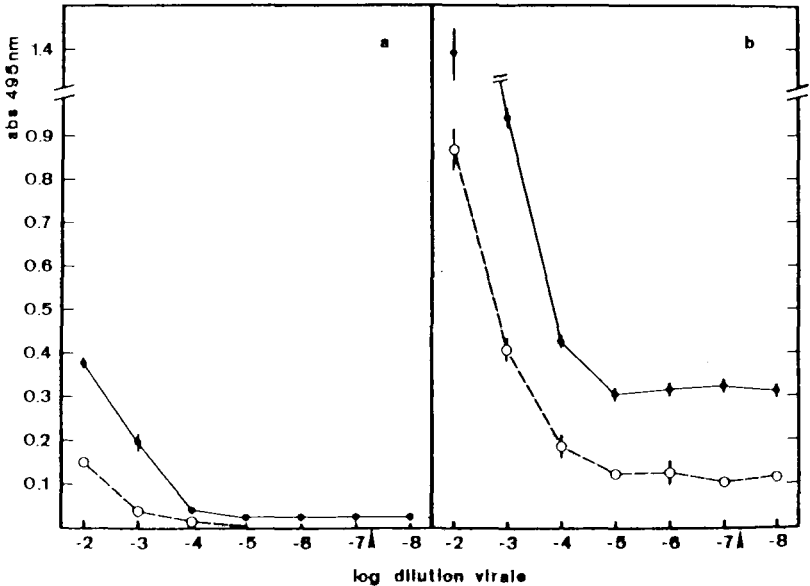


Figure 3 : Analyse d'un titrage du virus CEE (souche I.40) par ELISA sur plaques non irradiées (a) et irradiées (b).

- : double antibody sandwich ELISA modifié;
- : double antibody sandwich ELISA;
- ▲ : taux de dilution de 1 TCID<sub>50</sub>/0,05 ml.

Dans la figure 3 sont représentés les résultats de la comparaison du "double antibody sandwich ELISA" modifié, et du "double antibody sandwich ELISA". Dans le premier cas, l'antigène est détecté par le conjugué HRPO par l'intermédiaire

d'anticorps spécifiques humains; dans le second, l'antigène est alors détecté directement par les anticorps spécifiques marqués avec l'enzyme. Le test ELISA modifié est environ 10 fois plus sensible que le test ELISA détectant directement l'antigène. D'autre part, nous avons comparé des plaques de microtitration normales (figure 3a) avec des plaques irradiées aux rayons gamma (figure 3b). La sensibilité gagnée de prime abord par les plaques irradiées est reperdue par leur plus faible spécificité. Le titre final du virus détectable se situe à la dilution de  $10^{-4}$  dans les deux cas.

Nous avons aussi essayé d'augmenter la sensibilité du test en utilisant un conjugué à la phosphatase alcaline avec, d'une part, au test ELISA, un substrat colorant (p-nytrophényl-phosphate), et, d'autre part, au test ELFA, un substrat fluorescent (4-méthylumbelliferyl-phosphate). Les résultats de ces analyses, présentés dans la figure 4, nous montrent une légère amélioration du test. Après 2 heures d'incubation du substrat du test ELISA, nous obtenons des résultats légèrement inférieurs à ceux du test ELISA sous utilisation du conjugué RHPO, mais en prolongeant ce temps d'incubation, contrairement à la peroxidase, la réaction colorimétrique catalysée par la phosphatase continue et nous obtenons ainsi de meilleurs résultats, la réaction non spécifique restant minime (figure 4a).

Les résultats obtenus par ELFA (figure 4b) sont comparables à ceux obtenus par ELISA. Le test ELFA présente une plus grande sensibilité après 2 heures d'incubation du substrat, mais cette différence est égalisée au test ELISA par l'incubation du substrat pendant 20 heures à 37°C. Une augmentation du temps d'incubation du substrat pour le test ELFA n'a pas apporté d'amélioration.

Conclusion: Du fait de sa plus grande simplicité d'exécution, nous avons donc utilisé le test ELISA pour nos analyses, avec le conjugué phosphatase et un temps d'incubation de 20 heures à 37°C du substrat. La sensibilité du test

atteint 1'000 à 10'000 TCID<sub>50</sub>/0,05 ml de la suspension virale (virus de référence I.40), la flèche dans les figures 3 et 4 marquant le taux de dilution de 1 TCID<sub>50</sub>/0,05 ml.

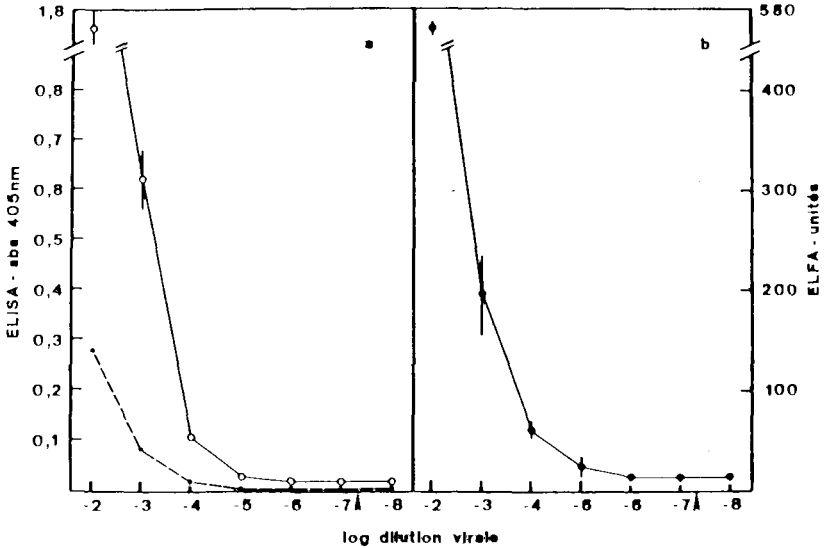


Figure 4 : Comparaison ELISA et ELFA

- a) ELISA, -----●: substrat incubé 2 heures à 37°C
- : substrat incubé 20 heures à 37°C
- b) ELFA,                    substrat incubé 2 heures à 37°C
- ▲: taux de dilution de 1 TCID<sub>50</sub>/0,05 ml.

Nous avons par la suite analysé plusieurs pools de tiques positifs et négatifs pour le virus CEE par cette méthode. Malheureusement, les réactions non spécifiques étaient trop grandes pour pouvoir différencier les pools contenant le virus CEE des pools négatifs, même en testant ces tiques à différentes dilutions. Les taux de virus dans la tique variant de 10<sup>2</sup> à 10<sup>5</sup> ID<sub>50</sub> maximum (FAIVRE, communication personnelle), la sensibilité du test ELISA se trouve donc à la limite de détection.

	- log ID <sub>50</sub> /0,03 ml i.c. *			ELISA abs 405 nm		
	pos.	pos.	nég.	pos.	pos.	nég.
G.s.	4,25	5,25	-	074±8	076±2	021±4
Ov.	3,5	2,75	-	047±20	060±6	030±9
T.d.	5,5	3,75	-	084±4	058±4	054±10
Cer.	2,5	2,75	-	102±6	063±13	026±7
S.t.	5,5	5,0	-	460±77	430±45	249±28

Tableau 2 : Détection du virus CEE dans des organes de tiques par inoculation intra-cérébrale aux souris et par le test ELISA.

pos.: tiques infectées; nég.: tiques négatives (organes de 5 tiques par analyse); G.s.: glandes salivaires; Ov.: ovaire; T.d.: tube digestif; Cer.: cerveau; S.t.: solde de la tique; ID : dose infectante 50%; i.c.: infection intra-cérébrale; abs: absorption; ±: écart type.

\*) L'infection des tiques et le titrage du virus sur souriceaux ont été effectués par Monsieur J.P. Faivre, Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel.

L'analyse d'organes de tiques infectées (tableau 2) ne donne pas non plus de résultats nets et incontestables, bien qu'il y ait une différence mesurable entre les organes positifs et négatifs. En comparant les résultats des analyses effectuées par ELISA à ceux des analyses effectuées sur souriceaux nouveau-nés, nous constatons que le test ELISA n'est pas équivalent au titrage de ces organes in vivo.

Relevons toutefois un fait intéressant: les titres de virus dans les glandes salivaires des tiques atteignaient  $10^4$  à  $10^5$  ID<sub>50</sub> et ont donné à l'ELISA une absorption de 075. Les titres titres dans les cerveaux étant de  $10^{2,5}$ , ceux-ci donnèrent à l'ELISA des résultats comparables à ceux obtenus pour les glandes salivaires. Il nous faut donc admettre que

les différents titres obtenus dans les différents organes des tiques ne sont pas dus à une variation du nombre de particules virales uniquement, mais surtout à une variation du pouvoir infectieux du virus pour les souriceaux. Nous avons déjà observé de telles variations lors du titrage d'organes de tiques effectué en parallèle sur souriceaux et en culture cellulaire, où le virus atteignait des titres de  $10^4$  ID<sub>50</sub> sur souriceaux mais n'était pas détectable en culture de cellules. Les tiques avaient été infectées avec le virus de référence I.40, lequel avait subi de nombreux passages consécutifs sur souriceaux et montrait des titres comparables en culture de cellules et sur souris. Nous reviendrons sur ces problèmes de variations du pouvoir infectieux du virus dans la discussion finale.

Une amélioration du test ELISA pourrait être obtenue en produisant des anticorps monoclonaux contre le virus CEE pour la sensibilisation des plaques de microtitration. Ces anticorps montrant généralement déjà une très grande pureté, il ne serait pas nécessaire de les purifier par chromatographie d'affinité. Il est en effet probable que les anticorps montrant une grande affinité pour le virus CEE n'ont pu être élués de la colonne. Nous n'aurions obtenu que des anticorps de faible affinité, d'où peut-être une réduction de la sensibilité et de la spécificité du test.

Conclusion : Nous constatons que le test ELISA n'est hélas pas utilisable pour le dépistage direct de la présence du virus CEE dans la tique. Il nous apporte cependant une méthode d'identification rapide du virus, ceci à partir d'organes ou de cultures de cellules infectées. Il est évident que pour contrôler la spécificité du test vis-à-vis d'autres Arbovirus, plus particulièrement d'autres Flavivirus, il nous faudrait tester toute une série d'antigènes différents que nous n'avons pas à notre disposition. Par contre, toutes les souches de virus CEE isolées sur souriceaux et en culture de cellules ont pu être identifiées par ELISA. Trois souches isolées de tiques du "Staatswald", restées non identifiées (CEE négatives) (p. 49) étaient nettement négatives à ce test.

### 3. Investigations sérologiques

#### 3.1. Chez l'homme

Les résultats des investigations sérologiques effectuées au sein du personnel forestier de différents cantons sont résumés dans le tableau 3. Les cantons de Zurich et de Schaffhouse montrent les plus grands taux d'infection avec des pourcentages de 5,41% et de 4,02% respectivement. Nous remarquons les hauts titres d'anticorps, donnés par la moyenne géométrique, des sujets du canton de Zurich.

Canton	Nombre de séra présentant des anticorps	/	Nombre de séras analysés	Pourcentage des séras positifs	Titre à l'IHA des séras positifs (moyennes géométr.)
ZH	23	/	425	5,41	1 : 123
SH	10	/	249	4,02	
	(-38 chasseurs =		211)	(4,74)	
BE	3	/	288	1,04	1 : 93
SO	2	/	162	1,23	1 : 12
AG	3	/	627	0,48	1 : 53
VD	1	/	220	0,45	1 : 20
TG	0	/	46	-	-
FR	0	/	47	-	-
Total	42	/	2064	2,03	1 : 92

Tableau 3 : Anticorps contre le virus CEE dans le sérum du personnel forestier de différents cantons.

Dans les cantons de Fribourg et de Thurgovie, nous n'avons pu détecter de cas d'encéphalite à tiques. En Thurgovie, les investigations sérologiques n'ont touché que le sud du canton, les employés du nord du canton (Diessenhofen, Steckborn) ayant été vaccinés auparavant contre le virus CEE. D'autre

part, seul un faible nombre de séra a été analysé dans ces deux cantons.

Dans les cantons d'Argovie, de Soleure et de Vaud, peu de personnes présentent des anticorps contre le virus CEE. De plus, on n'observe aucun regroupement géographique des rares cas positifs. Le détail de ces résultats est présenté aux pages 38 et 39.

Les titres d'anticorps détectés par IHA et par ELISA sont approximativement comparables (tableau 4). En effet, les séra négatifs en IHA montrent le plus souvent une valeur de 0 (forme matrice) à l'ELISA. De ces séra IHA-négatifs, seuls quelques-uns atteignaient des valeurs de 1 à 2. Ces derniers avaient été conservés pendant une assez longue période. Au contraire, les séra fraîchement prélevés, négatifs à l'IHA, montrèrent toujours des valeurs de matrice allant de 0 à 1. A une exception près, tous les séra IHA-positifs présentèrent des valeurs de 3 ou plus. Par conséquent, fixant la limite de spécificité du test ELISA à 2, nous constatons une bonne concordance des résultats des 2 tests.

Un sérum négatif à l'ELISA mais positif à l'IHA provenait d'une personne de la région de Zofingen (AG). Nous l'avons aussi examiné par le test de la séroneutralisation qui, pour les Flavivirus, est plus spécifique que le test IHA (16). En employant  $10 \text{ TCID}_{50}$  de notre virus de référence I.40, l'index de neutralisation (IN) de ce sérum était  $< 1:5$ . Le contrôle positif montrait un IN de  $1:640$ . Ainsi, nous pouvons admettre que la réaction positive décelée à l'IHA est non spécifique, ou, alors, qu'il s'agit d'une réaction croisée avec un autre Flavivirus. Par contre, le sérum prélevé dans la région de Lostorf (SO) s'est avéré positif à l'ELISA, mais négatif à l'IHA et à la SNT avec des titres respectivement de  $< 1:10$  et de  $< 1:5$ . Nous avons considéré que ce cas était positif en nous basant sur l'expérience de HOFMANN et al. (36). En effet, ces auteurs ont démontré que chez 2/3 des personnes vaccinées contre l'encéphalite à tiques, les anticorps spécifiques étaient, quelques années plus tard, toujours

canton	région	sérums positifs	titre (IHA)	ELISA <sup>+</sup> unités
SH	Altdorf	1	1:160	6
	Trasadingen	1	1:20	4
	Hallau	2	1:40 2x	5,5/6
	Buchberg	1	1:40	6,5
	Stein am Rhein	3	1:40 2x/1:80	4/5,5/6
	Thayngen	2	1:80/1:10	6/3
AG	Fisibach	1	1:40	3
	Zeihen	1	1:80	5
	Eiken	1	1:40	4
	Zofingen	1*	1:40	0
ZH	Wülflingen	1	1:80	7,5
	Berg	1	1:160	7
	Neftenbach	1	1:640	7
	Dättlikon	1	1:80	6
	Kyburg	1	1:160	7
	Uster	1	1:80	6
	Horgen/Sihlwald	2	1:160 2x	8/6
	Laufen	1	1:160	3,5
	Rheinau	3	1:80 3x	5/6/6
	Ossingen	1	1:160	6,5
	Kl.Andelfingen	1	1:80	6
	Bülach	1	1:40	5
	Rafz	1	1:80	6
	Bachenbülach	1	1:80	6
	Frelenstein	1	1:80	5
	Eglisau	4	1:80 4x	4,5 2x/6/7
	Zürich	1	1:80	4
	BE	Gampelen	1	1:80
Ins		1	1:160	8
Gwatt		1**	1:40	4
SO	Lostorf	1	<1:10	3
	Niederbuchsiten	1	1:20	8
VD	Gimel	1***	1:160	9
	Yverdon	1	1:20	6

Tableau 4 : Comparaison des titres d'anticorps aux tests IHA et ELISA et localisation du personnel forestier présentant ces anticorps.

- + : Les résultats du test ELISA sont donnés en unités représentant la moyenne des mesures de la forme matrice de l'ELISA-reader, le contrôle positif ayant une valeur de 9 et le négatif de 0 à une dilution sérique de 1:40.
- \* : Il s'agit d'une réaction non spécifique de l'IHA ou d'une réaction croisée avec un autre Flavivirus.
- \*\* : Dans la région de Thoune, peu de forestiers ont été analysés.
- \*\*\* : Cas d'une personne ayant contracté une infection dans la région de Glattfelden (ZH) en 1979.

décelables à l'ELISA mais plus à l'IMA.

Un seul sérum présentait des anticorps à un titre  $> 1:320$ , tel qu'on le décèle souvent lors d'infections actuelles chez l'homme. Ceci est peut-être dû à une faible activité des tiques en 1980. Aussi a-t-on enregistré beaucoup moins de cas cliniques cette année-là qu'en 1979 par exemple (voir aussi figure 7).

Dans les cantons de Zurich et de Schaffhouse, la répartition géographique des lieux d'habitation ou de travail des personnes séropositives recouvre assez bien celle des foyers naturels déjà connus (117). La concordance est également bonne avec les résultats obtenus par KRECH (52), lequel a localisé des foyers naturels en questionnant les patients ayant subi une encéphalite à tiques clinique. Un foyer naturel supplémentaire doit exister dans la région de Horgen (Sihlwald). En effet, 2 forestiers de cette région ont subi une séroconversion et nous avons réussi à isoler le virus CEE à partir de la cervelle d'un poney ayant été infecté dans la même région (110). KRECH localisa également quelques cas d'encéphalite à tiques près de Horgen. Il s'agissait toutefois de cas incertains (52).

Dans le canton de Berne, seules 3 personnes étaient séropositives. Deux d'entre elles travaillent dans la région du "Grand Marais" (Ins, Gampelen). La présence d'un foyer naturel dans cette région a été confirmée par l'isolation du virus CEE à partir de tiques (63). La troisième personne est un employé de la protection de la flore et de la faune de la région de Thoune (Gwatt). Ce résultat, peu représentatif, n'a pu être confirmé par l'examen des forestiers de cette région. Ceux-ci se sont d'ailleurs montrés peu coopératifs. Néanmoins, lors d'investigations effectuées quelques années auparavant avec des semiprofessionnels de courses d'orientation de la région Thoune-Spiez, 2 sportifs sur 54 présentèrent des anticorps spécifiques au virus CEE. D'autre part, des foyers naturels ont été localisés dans la région de Thoune par l'isolation du virus à partir de tiques et de micromammifères (p.51).

Les 4 cas décelés dans le canton d'Argovie et les 2 cas du canton de Soleure ne se laissent que partiellement interpréter, étant donné que nous n'avons pas encore assez d'informations prouvant la présence du virus CEE dans ces cantons. L'un des forestiers séropositifs habite près des foyers naturels que nous avons localisés dans le canton de Zurich. Il est probable qu'il se soit infecté dans ces régions. Un autre cas, positif à l'IHA et provenant de la région de Zofingen, s'est montré négatif à l'ELISA et au SNT. Il ne s'agit donc pas de l'encéphalite à tiques.

Comme pour les cantons d'Argovie et de Soleure, le cas provenant d'Yverdon (canton de Vaud) ne peut être expliqué pour le moment. L'infection du forestier de Gimel, par contre, a pu être reporté à la région de Glattfelden (ZH), son lieu de travail en 1979, où il avait alors contracté une infection cliniquement diagnostiquée.

3.2. Chez le mouton

800 sérums de moutons ont été prélevés dans la vallée du Haut-Rhin et seulement deux aliquotes présentaient des anticorps inhibant l'hémagglutination, soit 0,25% des animaux. Les titres étaient bas (1:10 et 1:20). Les 2 animaux concernés provenaient des régions de Untervaz et de Malenfeld (tableau 5). Ces résultats sont d'autant plus étonnants que ces moutons sont régulièrement parasités par les tiques. D'autre part, le virus a été isolé d'une hermine de cette région (STECK, communication personnelle).

Région	Nombre de séra présentant des anticorps	/	Nombre de séras analysés	Pourcentage des séras positifs
Oberhasli	0	/	20	-
Sevelen	0	/	136	-
St. Martinsberg	0	/	15	-
Trübbach	0	/	18	-
Azmood	0	/	10	-
Oberschaan	0	/	6	-
Weite	0	/	14	-
Fontnas	0	/	15	-
Balzers	0	/	70	-
Pignia	0	/	48	-
Glaspas	0	/	41	-
Realta	0	/	21	-
Bonaduz	0	/	50	-
Felsberg	0	/	27	-
Rhazüns	0	/	26	-
Untervaz	1	/	67	1,50
Küblis	0	/	41	-
Malans	0	/	37	-
Malenfeld	1	/	24	4,10
Wangs	0	/	58	-
Flums	0	/	56	-
Total	2	/	800	0,25

Tableau 5 : Anticorps IHA contre le virus CEE dans le sérum de moutons de la vallée du Haut-Rhin.

### 3.3. Chez le chien

Nous avons eu connaissance de 3 cas d'encéphalite à tiques chez des chiens en Suisse. Le chien, plus souvent parasité que l'homme par la tique I. ricinus, représente sans doute un bon indicateur de virus CEE.

Canton	Nombre de séra présentant des anticorps	Nombre de séras analysés	Pourcentage des séras positifs	Moyenne géom. des titres à l'IHA
Zurich	15	/ 316	4,8	1 : 40
Berne	10	/ 534	1,9	1 : 74
Bâle	3	/ 53	5,6	1 : 25
Total	28	/ 903	3,1	

Tableau 6 : Anticorps IHA contre le virus CEE dans le sérum de chiens.

Les résultats des investigations sérologiques de chiens provenant des cliniques vétérinaires de Zurich, Berne et Bâle (Münchenstein) sont résumés dans les tableaux 6 et 7. Le pourcentage des cas enregistrés, soit 1,9% et 4,8% pour les cantons de Berne et Zurich respectivement, sont comparables à ceux obtenus chez le personnel forestier de ces deux cantons. Un sérum positif du canton de Berne provient d'un chien de la région de Thoune (Gwatt) où nous avons localisé des foyers d'encéphalite à tiques. Nous ne pouvons pas tirer de conclusions définitives pour le moment des autres résultats positifs de Berne et de ses alentours, ainsi que du cas de Moutier. Dans la région de Bâle, bien que nous n'ayons analysé qu'un petit nombre de séras, nous avons observé 3 cas positifs. Les chiens positifs du canton de Zurich proviennent en grande partie des régions habitées par les forestiers trouvés positifs, surtout du nord du canton (voir aussi figure 9).

Canton	Région	Titre (IHA)
BE	Bern	1 : 20
	"	1 : 20
	"	1 : 40
	"	1 : 80
	Gwatt	1 : 80
	Laupen	1 : 320
	Liebefeld	1 : 20
	"	1 : 40
	Moutier	1 : 40
Münchenbuchsee	1 : 80	
SG	Bazenheid	1 : 80
ZH	Benken	1 : 20
	Brütisellen	1 : 320
	Glattfelden	1 : 20
	Kaltbrunn	1 : 20
	Niederweningen	1 : 40
	Pfungen	1 : 20
	Rüschlikon	1 : 160
	Wallisellen	1 : 40
	Winterthur	1 : 40
	Zürich	1 : 20
	"	1 : 40
	"	1 : 80
	inconnu	1 : 20
"	1 : 80	
BS	Basel	1 : 10
	"	1 : 80
	Böttmingen	1 : 20

Tableau 7 : Provenance des chiens montrant des anticorps contre le virus CEE.

Comme pour les séra de moutons, nous n'avons utilisé que le test de l'inhibition de l'hémagglutination. On ne peut donc pas exclure des réactions apparemment positives mais non spécifiques. D'autre part, les Arbovirus sont encore trop peu étudiés en Suisse pour pouvoir exclure une réaction croisée avec un autre Flavivirus.

#### 4. Investigations virologiques

Parmi les tiques récoltées de 1978 à 1981 en Suisse, 13'039 exemplaires ont été analysés pour déterminer la présence de virus. Il s'agissait en majorité de l'espèce I. ricinus. Du Valais, du Tessin et de l'Ile de Kembs (Alsace), nous avons aussi analysé des tiques du genre Dermacentor marginatus (224 exemplaires) et D. reticulatus (44 exemplaires).

Les tiques récoltées en 1978 ont été uniquement analysées par inoculation intracrânienne à des souriceaux nouveau-nés (63). Par contre, des essais d'isolation ont été effectués aussi bien sur souriceaux que sur cultures de cellules rénales de porc (cellules MPK) avec les Ixodides récoltés dès 1979 (62).

Le tableau 8 démontre que 25 souches de virus ont pu être isolées: 10 souche à partir de lots de tiques femelles, 10 à partir de mâles et 5 à partir de nymphes. Toutes ces souches ont été obtenues avec I. ricinus uniquement. Les Dermacentor n'ont rien livré.

L'isolation de 18 souches a réussi sur des souriceaux et 6 autres souches ont été isolées de concert sur souriceaux et en culture cellulaire. Une souche a été isolée en culture de cellules alors que les souriceaux restaient négatifs. Cependant, l'inoculation du surnageant de cette culture infectée à une portée de souriceaux déclencha les symptômes typiques de paralysie de l'encéphalite à tiques.

Les tests de neutralisation virale et de l'inhibition de l'hémagglutination ont permis l'identification de 22 souches de virus CEE. Trois autres souches n'ont pas donné d'hémagglutinine et elles n'ont pu être neutralisées par des sérums de référence anti-CEE: elles n'appartiennent donc pas aux virus de l'encéphalite à tiques! Les expériences faites avec ces souches sont présentées ci-dessous (voir p. 49).

Souche	Date de capture	Lieu de capture	Nb. de tiques par pool
I.W.3	26.4.1978	Ins, Staatswald (BE)	10 F
I.C.7	3.5.1978	Ins, Staatswald (BE)	10 F
I.2	29.5.1979	Glattfelden, Laubberg (ZH)	10 F
I.102	"	"	10 M
I.103	"	"	10 M
I.206	"	"	10 F
I.115	16.5.1979	Eglisau, Stadtforen (ZH)	10 M
I.142	"	"	25 N
I.269	5.6.1979	Ins, Staatswald (BE)	20 N
I.273	"	"	62 N
I.276*	"	"	50 N
I.11	9.7.1979	Thun, Glütschbach (BE)	8 F
I.12	"	"	8 M
I.13	"	"	8 M
I.18	"	"	6 M
I.248	31.5.1979	Thun, Zulgrain (BE)	8 N
T.225	28.4.1980	Ins, Staatswald (BE)	16 F
T.229*	12.5.1980	"	16 F
T.232	"	"	15 M
T.234	"	"	22 M
T.235	"	"	23 M
T.243*	28.4.1980	"	12 M
T.246	"	"	14 F
T.258	"	"	20 F
L.107	20.5.1981	Glattfelden, Laubberg (ZH)	20 F

Tableau 8 : Isolation de souches de virus à partir de tiques de l'espèce Ixodes ricinus.

F: tiques femelles; M: tiques mâles; N: nymphes.

\*) souches de virus non identifiées.

Les résultats des analyses sont résumés dans le tableau 9. Les tiques de la région de Thoun montrent le plus haut pourcentage d'infection avec 0,82% et 0,84% d'I. ricinus porteurs de virus.

Les tiques récoltées dans la région d'Egliseau présentent un faible taux d'infection. Toutefois, dans ce cas, plus de la moitié des tiques analysées étaient des larves. En ne les prenant pas en considération (elles étaient d'ailleurs toutes

negatives), le taux d'infection atteint alors 0,38% (au lieu de 0,18%), soit un chiffre enregistré dans d'autres régions.

Les tiques récoltées au Staatswald permettent de constater l'existence d'une variation du taux d'infection d'une année à l'autre: 0,32% des tiques adultes sont positives en 1978, 0,75% en 1980. Les tiques récoltées en 1979 étaient uniquement des nymphes et des larves; par conséquent, ces résultats ne sont pas directement comparables.

Tableau 9 : Tiques capturées en Suisse de 1978 à 1981

Canton / Région	Tiques					Virus	%
	F	M	N	L	Total		
1978							
ZH Regensberg	8	4	12	9	33	-	0,32
Glattfelden (Laubberg)	41	27	48		116	-	
Eglisau (Stadtforen)	1	3	1	30	35	-	
BE Ins (Staatswald)	579	53			632	2	
NE Neuchâtel (Bois de l'Hôpital)	93	29			122	-	
ZG Winzwilen	9	5			14	-	
Hühnenberg (ZG/AG)	165	82			247	-	
FR Le Chablais (Sugiez)	270				270	-	
SH Geissberg	59	27			86	-	
total :	1225	230	61	39	1555	2	
1979							
ZH Bachs (Rüeblißberg)	44	41	105		190	-	0,48
Dietlikon (Gubel)	121*	121	270		512	-	
Dietlikon (Gubel)	22	23	151		196	-	
Glattfelden (Laubberg)	214	216	397		827	4	
Hochwart-Irchel	35	42	437		514	-	
Pfungen	36	29	410		475	-	
Regensberg	80*	93	296		469	-	
Regensberg	52	36	86		174	-	
Rüschlikon	68	61	65		194	-	
Stammheim	16	12	105		133	-	
Eglisan (Stadtforen)	62	62	402	563	1089	2	
BE Ins (Staatswald)			659	157	816	2(+1)	
Reutigen (Glütschbach)	152	144	189		485	4	
Thun (Allmend)	30	34	99		163	-	
Steffisburg/Homberg	25	20	74		119	1	
AG Geissberg	78	105	454		637	-	
VS Allodon	9	9			18	-	
Bois Noir	28	43	141		212	-	
Epinassay	22	15	30		70	-	
total :	1094	1106	4370	723	7293	13(+1)	

Tableau 9 (suite)

Canton / Région	Tiques				Total	Virus	%
	F	M	N	L			
1980							
AG Zeihen	6	11	123		140	-	
BE Ins (Staatswald)	413	385			798	6(+2)	0,75
TG Altikon	38	39	180		257	-	
Pfyn	9	10	79		98	-	
Bonau	9	9	72		90	-	
VS Martigny-Bourg	13	22			35	-	
Val d'Annivier	30				30	-	
Bramois	10	1			11	-	
Brgisch	6	3			9	-	
St-Martin	6	11			17	-	
a	1	2			3	-	
TI Valle Maggia	75	53	3		131	-	
a	35	22			57	-	
c	341	76	7		424	-	
d	82	102			184	-	
ZH Glattfelden(Laubberg)	40	28	782	4	854	-	
Ile de Kembs	71	25			96	-	
b	13	31			44	-	
total:	1198	830	1246	4	3278	6(+2)	
1981							
ZH Glattfelden(Laubberg)	167	165	730	52	1114	1	0,09
1978 - 81 total:	3684	2331	6407	818	13240	22(+3)	0,17

F: tiques femelles; M: tiques mâles; N: nymphes; L: larves;  
 %: pourcentage de tiques infestées; - : essais d'isolation négatifs.

\*: pas d'essais d'isolation effectués; a = D. marginatus;  
 b: D. reticulatus; c: I. ricinus récoltés sur chèvre;  
 d: D. marginatus récoltés sur chèvre; chiffres sans nota-  
 tions: I. ricinus libres; Virus: nombre de souches de virus  
 CEE isolées avec, entre parenthèses, le nombre de souches où  
 il ne s'agit pas du virus CEE.

Les micromammifères capturés dans la région de Thouné n'ont livré qu'une souche de virus CEE en 1977, à partir d'un pool d'organes (cerveau, rate, foie et glandes salivaires). Il s'agissait d'un Apodemus flavicollis mâle et adulte (5).

D'autre part, de la région de Horgen (ZH), nous avons réussi l'isolation d'une souche de virus CEE à partir de la cerveau d'un cheval ayant présenté des symptômes de paralysie (110). L'isolation n'a été effectuée que sur culture de cellules MPK. Les essais sur souriceaux nouveau-nés sont restés négatifs, même après 3 passages successifs. Par contre, les souriceaux tombèrent malades après injection intra-cérébrale du surnageant des cultures. Cette souche de virus, après avoir subi 3 passages sur souris, garda une plus grande affinité pour les cellules MPK que pour les souriceaux, ceci comparé à notre souche de référence I.40. En effet, les titres de cette souche "cheval" sont environ 100 fois supérieurs sur cellules que sur souris, tandis que le virus de référence montre des titres comparables dans les deux systèmes (tableau 10).

	DI <sub>50</sub> / 0,02 ml ic souriceaux	TCID <sub>50</sub> / 0,2 ml cellules MPK
souche "cheval"	10 <sup>8,16</sup>	10 <sup>9,75</sup>
souche I.40	10 <sup>8,0</sup>	10 <sup>7,6</sup>

Tableau 10 : Dose infectante sur souriceaux et en culture de cellules.

DI<sub>50</sub>: dose infectante 50%; TCID<sub>50</sub>: tissue culture infectious dosis 50%; ic: infection intra-cérébrale.

Nous avons par la suite analysé 14 chevaux du même troupeau. Bien que ces animaux aient été souvent parasités par des tiques, nous n'avons pas décelé d'anticorps contre le virus CEE dans leurs séras, ni par le test SN, ni par celui de l'IHA.

5. Souches de virus non identifiées (I.276, T.229, T.243)

En 1979, nous avons isolé une souche de virus (souche I.276) à partir d'un pool de 50 nymphes d'I. ricinus. Nous n'avons pu la neutraliser avec nos sérums de références anti-CEE; nous n'avons pas non plus réussi à produire une hémagglutinine. Ces tiques provenaient du "Staatswald" près d'Ins (BE) (tableau 9). L'année suivante, et dans la même région, 2 autres souches semblables ont été isolées, l'une d'un pool de 16 femelles I. ricinus (T.229) et l'autre de 12 mâles I. ricinus (T.243).

souche	P.1	P.3	-log TCID <sub>50</sub>	P.12	-log TCID <sub>50</sub>
I.276	8 j.	6-7 j.	5,0	6-7 j.	8,5
T.229	9 j.	6-7 j.	7,23	-	-
T.243	9 j.	5-6 j.	7,0	-	-
CEE-vi.	4-5 j.	4 j.			

Tableau 11 : Caractéristiques des souches indéterminées de virus sur souriceaux.

P.1: temps d'incubation (souriceaux) lors de l'isolation initiale; P.3: temps d'incubation lors du passage 3; P.12: lors du passage 12; -: passage pas effectué; TCID<sub>50</sub>: tissu culture infectious dosis 50%.

Les temps d'incubation sur souriceaux nouveau-nés étaient de l'ordre de 8-9 jours lors de l'isolation initiale et de 5-7 jours lors des passages suivants (tableau 11). Non seulement les temps d'incubation diffèrent de ceux observés pour les souches de virus CEE (4-5 jours), mais aussi les manifestations cliniques des souriceaux sont moins nettes avec ces 3 souches qu'avec le virus CEE. On n'observe pas vraiment d'affections paralytiques, mais plutôt une période d'excitation brève et violente. La mort survient rapidement, environ

12 heures plus tard.

En culture de cellules MPK, par contre, nous avons observé des tendances inverses. Ainsi, lors de l'infection des cellules avec le virus CEE, un début d'effet cytopathogène n'est observable que 2 à 3 jours post infection, par contre l'effet cytopathogène des 3 souches étudiées est détectable déjà 24 heures post infection. D'autre part, lors du titrage de ces virus en culture cellulaire, on observe une formation de plaques atteignant quelques centaines de cellules sans qu'il y ait besoin d'un "overlay". Le virus n'est donc pas, ou très peu, libéré directement dans le milieu. Le titre du virus dans le surnageant était d'ailleurs toujours très faible.

souche	filtration			sensibilité		contrôle
	0,3 $\mu$ m	0,2 $\mu$ m	0,1 $\mu$ m	éther	chloro	
I.276	7,5	6,5	<1,5	2,5	2,5	8,5
T.229	7,0	6,0	<1,5	3,5	-	7,23
T.243	6,66	6,66	<1,5	3,0	-	7,0
I.40*	7,7	7,0	6,5	4,66	4,0	8,0

Tableau 12 : Filtration et sensibilité à l'éther et au chloroforme

filtration : tissu Infectious dosis 50% (TCID<sub>50</sub>) après filtration sur millipores;

sensibilité: TCID<sub>50</sub> après incubation dans l'éther et le chloroforme (chloro);

contrôle : virus non traité;

- : pas effectué;

\* : souche de virus CEE de référence.

Les résultats des essais de filtration et des tests de sensibilité à l'éther et au chloroforme sont présentés dans le tableau 12. Il doit s'agir d'un virus ayant une enveloppe d'un diamètre se situant entre 100 et 200 nm. ne possédant pas de séra de référence des Arbovirus, nous ne pouvons pas déterminer ces 3 souches avec plus de précision, sinon supposer l'appartenance à la famille Bunyavirus (38). Le problème est à l'étude.

6. Etude épidémiologique détaillée dans la région de Thoune

Comme nous l'avons déjà mentionné plus haut, 6 souches de virus CEE ont été isolées dans la région de Thoune: 5 à partir de lots de tiques et 1 à partir d'un A. flavicollis. Les résultats des piégeages effectués en 1977 et des captures de tiques libres en 1979 sont présentés dans le tableau 13.

Région	Micromammifères 1977							Tiques 1979				
	As	Af	Cg	Ma	Tot	Vi	AC	F	M	N	Tot	Vi
1 Bärenholz	10	3	8		21	-	-					
2 Schiesstand			1	9	10	-	-					
3 Stallägerten	6	3	10		20	-	-					
4 Schiesstand	2				2	-	-					
5 Guntelsei	8	2	10		20	1	-	54	53	61	168	-
6 Cheibenau	1		1	4	6	-	4	58	56	77	191	4
7 Stägghalten			1	1	2	-	-	6	15	35	56	-
8 Chapf								30	19	12	61	-
9 U.Chandergrien								30	34	99	163	-
10 Zulgrain								13	10	8	31	1
11 Schwendibach								11	10	64	85	-
12 Homberg								1		2	3	-
13 Amsoldingen-See								2		1	3	-
14 Spiezberg								2	1	3	6	-
T o t a l	27	8	31	14	80	1	4	207	193	362	767	5

Tableau 13 : Investigations des foyers naturels de la région de Thoune.

As: A. sylvaticus; Af: A. flavicollis;  
 Cg: C. glareolus ; Ma: M. agrestis; F: tiques femelles; M: tiques mâles; N: nymphes;  
 Tot: total; Vi: nombre de souches de virus CEE;  
 AC : nombre de micromammifères montrant des anticorps contre le virus CEE

La numérotation des régions se rapporte à la figure 5.

Micromammifères : Des essais d'isolation de virus, sur souriceaux nouveau-nés, ont été effectués avec des "pools" d'organes de 80 micromammifères capturés en 1977. De plus, le sérum de 58 de ces animaux a été analysé par IHA afin de détecter des anticorps anti-CEE. Quatre rongeurs ont présenté des anticorps inhibant l'hémagglutination: 1 C. glareolus et 3 M. agrestis. Ces 4 animaux ont été capturés dans la région du "Cheibenau". Le micromammifère, source d'une souche de virus CEE, provient quant à lui d'une région proche, soit du "Guntelsei" (figure 5, nos 5 et 6).

Tiques : Parmi les 5 souches de virus CEE isolées de 767 tiques récoltées en 1979, 4 provenaient de tiques de la région du "Cheibenau", donc du même endroit où, deux années auparavant, nous avons détecté des anticorps dans le sérum de micromammifères. Le fait est intéressant. Il laisse supposer une certaine stabilité dans la localisation et le fonctionnement de ce foyer. La dernière souche de virus provenait de tiques capturées au "Zulgrain", à l'est de Steffisburg (figure 5, no 10). Ce foyer n'est donc pas en relation directe avec celui situé dans la vallée du Glütschbach.

La région de Thounne représente donc une mosaïque de foyers et le nombre annuel élevé de cas d'encéphalite à tiques enregistrés chez l'homme en prouve l'importance.

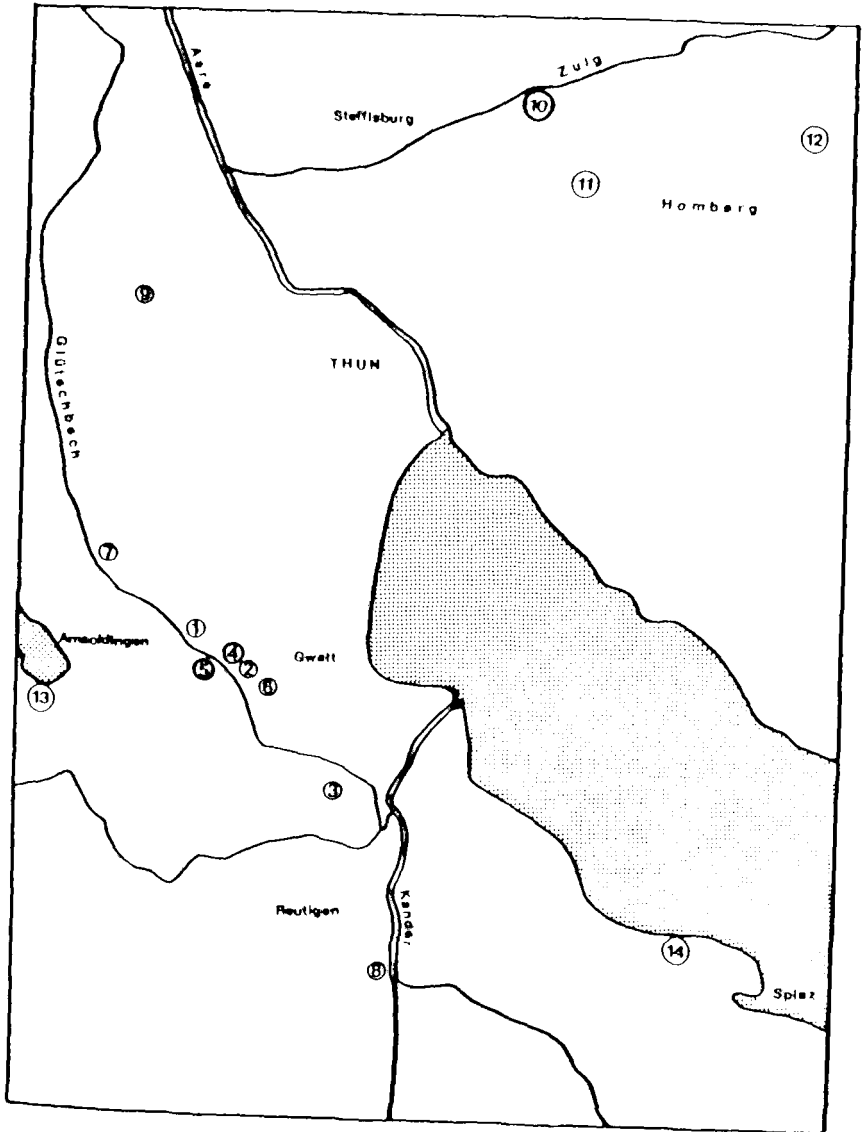


Figure 5 : Foyers d'encéphalite à tiques dans la région de Thoune.

Les numéros se rapportent au tableau 13. Régions nos 5, 6 et 10: foyers naturels confirmés par l'isolation du virus de l'encéphalite à partir de tiques I. ricinus.

## 7. Etude épidémiologique de l'encéphalite à tiques dans le canton de Zurich

L'activité saisonnière des tiques I. ricinus, en rapport avec l'apparition des cas d'encéphalite chez l'homme, a été observé dans le nord du canton de Zurich. Le choix de cette région est justifié par le grand nombre de cas annuels répertoriés.

### 7.1. Foyer naturel de la région de Glattfelden

Une attention particulière a été portée à cette région car elle est riche en tiques. D'autre part, lors de nos recherches précédentes (tableau 9), de nombreuses souches de virus ont été isolées à partir des I. ricinus de ce foyer.

#### 7.1.1. Situation et caractérisation du foyer

Ce foyer d'encéphalite à tiques se situe sur le versant sud-ouest de la colline du Laubberg (altitude 460 m, coordonnées: 680, 250/268, 750, carte de Suisse au 1/25'000, feuille Eglisau no 1051). Nous avons étudié l'activité saisonnière des tiques libres dans 3 stations.

##### Station 1: Intérieur de la forêt

L'association de cette station est un intermédiaire entre un Asperulo-Fagetum et un Carici-Fagetum, caractéristique de l'étage des collines des versants chauds, avec une strate arborescente d'un recouvrement de 85%.\*

##### Station 2: Clairière

Il s'agit ici d'un ancien Mesobromium (prairie maigre sèche) en voie de recolonisation par la forêt dont l'association reflète une station plus

\* Nous remercions vivement M. J.M. Gobat, de l'Institut de Botanique de Neuchâtel, pour avoir effectué les relevés phytosociologiques.

chaude que la station 1, caractérisée par des espèces thermophiles. La forêt en train de s'établir est probablement un Carici-Fagetum.

Station 3: Clairière

Cette station présente la même situation que la station 2, donc un ancien Mesobromium, mais à un stade plus avancé de colonisation par les buissons.

Selon les indications données par les espèces de végétaux, la station 2 est la plus chaude, suivie des stations 3 et 1. Ces 3 stations représentent des endroits plus chauds que les forêts environnantes du reste de la colline, surtout du fait de leur exposition au sud-ouest. Les rapports détaillés des relevés phytosociologiques sont présentés en annexe à ce chapitre.

Annexe: Relevé phytosociologique du 22.7.1980 au Laubberg

STATION 1

Situation: Haut de la butte, forêt de pins sylvestres plantés, avec quelques clairières de feuillus. En bas, hêtraie un peu plantée d'épicéas.

Relevé:

Altitude: 467m    Pente: 0-5%, surface concave    Surface: 100m<sup>2</sup>

Exposition: --

Strate arborescente:    Recouvrement: 85%    Hauteur moyenne: 15-20m

- 4 Pinus sylvestris planté
- 4 Fagus sylvatica
- 2.2 Clematis vitalba

Strate arbustive:    R: 20%    H: 2-3m

- |                        |                |                     |
|------------------------|----------------|---------------------|
| 2.1 Viburnum lantana   | r              | Acer campestre      |
| 1.2 Corylus avellana   | r              | Rubus sp            |
| 1.2 Ligustrum vulgare  | r              | Berberis vulgaris T |
| 1.2 Lonicera xylosetum | r              | Crataegus monogyna  |
| + 2 Cornus sanguinea   | r              | Viburnum opulus     |
| + Fagus sylvatica      | r              | Quercus petraea     |
| + Prunus avium         | r <sup>o</sup> | Rosa sp             |
| + Fraxinus excelsior   |                |                     |

Strate herbacée:    R: 10%    H: 20cm

- |                             |                |                         |
|-----------------------------|----------------|-------------------------|
| 2.2 Hedera helix            | + <sup>o</sup> | Convallaria majalis T   |
| 1.2 Asperula odorata        | + <sup>o</sup> | Polygonatum multiflorum |
| 1.2 Carex digitata          | r              | Fragaria vesca          |
| + 2 Brachypodium sylvaticum | r <sup>o</sup> | Listera ovata           |
| + Vicia sepium              | r <sup>o</sup> | Solidago virgaurea      |

T = espèces thermophiles

Profil de sol:

- 0-4cm : Litière de feuilles de hêtre et aiguilles de pin, relativement peu décomposée. pH = 6,5
- 4-8cm : Litière plus décomposée, brun-noir, grumuleux, limite nette en bas. pH = 7
- 9-24cm: Transition lente de brun-noir à ocre (sable molassique)
- 24 et en dessous: Sable molassique. pH = 7

Racines jusqu'à 25cm

Présence de carbonates dès 8cm. L'humus est un moder.

Taux de recouvrement des mousses: 5%

STATION 2

Situation: Clairière dans une "forêt" de pins et de mélèzes plantés. Lisière de feuillus bien fournie. La clairière est envahie par de jeunes buissons et des plantes d'ourlets.

Relevé:

Alt: 460m    Pente: 12%    Surface: 250m<sup>2</sup>    Exp: SW

Strate arborescente:    R: 10% (sur la clairière). Les arbres sont en bordure.    H: 25-30m

5 *Pinus silvestris* (2 au niveau de la clairière)

Strate arbustive:    R: 100% en lisière, 15% dans la clairière  
H: 4m en lisière, 1m dans la clairière

Lis. Clair.

3 + *Fagus sylvatica*  
3 + *Ligustrum vulgare*  
4 1.2 *Corylus avellana*  
2 2.1 *Juglans regia*  
1 + *Viburnum lantana*  
1 +.2 *Cornus sanguinea*  
1 *Prunus avium*

Clair.

1.2 *Cornus mas* T  
+ *Quercus petraea*  
+ *Berberis vulgaris* T  
+ *Crataegus monogyna*  
r *Tilia platyphyllos* T  
r *Rosa sp*

Strate herbacée:    R: 100%    H: 60cm

4.5 <i>Brachypodium pinnatum</i> O	+ <i>Bromus tectorum</i>
2.2 <i>Centaurea scabiosa</i>	+ <i>Lotus corniculatus</i> M
2.2 <i>Origanum vulgare</i> O	+ <i>Pimpinella minor</i>
2.2 <i>Festuca ovina</i>	+ <i>Salvia pratensis</i> M
2.1 <i>Avena pubescens</i> M	+ <i>Briza media</i>
2.1 <i>Euphrasia cyparissias</i>	+ <i>Scabiosa columbaria</i>
2.1 <i>Achillea millefolium</i>	+ <i>Galium mollugo</i> O
2.1 <i>Silene cucubalus</i>	+ <i>Vicia hirsuta</i>
1.3 <i>Calamagrostis villosa</i>	+ <i>Holcus lantana</i>
1.2 <i>Helianthemum nummularum</i> M	+ <i>Ononis repens</i> M
1.2 <i>Chrysanthemum leucanthemum</i>	+ <i>Orobanche purpurea</i> sur <i>Actillea</i>
1.2 <i>Dactylis glomerata</i>	+ <i>Knautia silvatica</i> O
1.2 <i>Bromus erectus</i> M	+ <sup>O</sup> <i>Verbascum sp</i>
+2 <i>Dianthus carthusianorum</i> M	+ <i>Clematis vitalba</i> T
+2 <i>Asperula odorata</i> O	+ <i>Vicia sepium</i>

M: espèces reliques du Mesobromium    O: espèces coloniatrices de l'ourlet    T: espèces thermophiles (comme aussi M et O)

Profil du sol:

0-3cm : Terre brun-noir bien décomposée, pH = 6,0  
3-30cm : Terre brune, avec bonne minéralisation de l'humus, pH 6,5  
30-65cm : Sable molassique ocre, pH = 6,8  
Racines principales jusqu'à 30cm, secondaires jusqu'à 60cm  
Présence de carbonates (peu) en surface, beaucoup dès 4cm

STATION 3

Situation comme la station 2, mais à un stade de colonisation des buissons plus avancé. Les buissons situés au milieu de la clairière recouvrent cette fois 25%, pour une hauteur de 1 à 2m.

Relevé:

Les espèces arbustives et herbacées sont en grande majorité les mêmes que celles de la station 2. En plus toutefois, *Populus tremula* dans les buissons (2.1), qui est un colonisateur rapide des clairières. Autres espèces notées: *Centaura jacea* (M), *Viola hirta* (O), *Trifolium medium* (O), *Veronica teucrium* (O), *Epipactis* sp, *Alium* sp.

7.1.2. Tiques sur hôtes

Un piégeage de micromammifères a été effectué au mois d'août 1980 dans ces trois stations et aussi à leur proximité immédiate. Les 100 pièges sont restés deux jours en place et ont été contrôlés 24 et 48 heures après leur pose. Trente micromammifères ont été capturés: 12 A. flavicollis, 10 A. sylvaticus, 7 C. glareolus et 1 M. agrestis. Les résultats de ce piégeage et du déparasitage des rongeurs sont présentés dans le tableau 14.

	rongeurs par./tot.	tot. tiques		moyenne tiques/rongeur	
		L.	N.	L.	N.
A.s.	10 / 10	213	3	21,3	0,3
A.f.	12 / 12	342	11	28,5	0,9
C.g.	4 / 7	15	0	2,1	0
M.a.	1 / 1	2	0	2	0

Tableau 14 : Tiques \* sur micromammifères

A.s.: A. sylvaticus; A.f.: A. flavicollis;  
 C.g.: C. glareolus ; M.a.: M. agrestis  
 par.: parasité; tot.: total; L.: larves  
 N.: nymphes

Ces rongeurs étaient parasités par des larves, plus rarement par des nymphes. Le nombre moyen de tiques trouvé sur Apodemus était environ 10 fois plus élevé que celui trouvé sur Clethrionomys et Microtus, A. flavicollis étant le plus hautement infesté. MERMOD et al. (65) ont publié des observations semblables. Ils supposent que l'activité globale de

\*) Ces tiques n'ont pas été déterminées. Elles ont été immédiatement congelées dans du HALB en vue des essais d'isolation du virus. Seules 2 espèces sont vraisemblablement en cause: I. ricinus d'abord, puis peut-être quelques I. trianguliceps.

cette espèce est supérieure à celle des autres. Ainsi les déplacements plus fréquents et plus importants des Apodemus augmenteraient les chances de rencontre avec les tiques.

### 7.1.3. Tiques libres

Les tiques libres ont été récoltées par la méthode dite du drapeau sur une surface de 100 m<sup>2</sup> à l'intérieur de la forêt (station 1), de 100 m<sup>2</sup> dans une clairière (station 2) et à la lisière de forêt sur 200 m (station 3). Les résultats de cet échantillonnage mensuel sont présentés dans la figure 6. Malheureusement, les investigations dans la station 3 ont dû être interrompues au printemps 1981, cette région ayant été détruite par la construction d'un chemin forestier. Tous les exemplaires récoltés appartenaient à l'espèce I. ricinus.

Beaucoup de larves ont été récoltées. Elles sont souvent groupées dans des "nids" disséminés irrégulièrement dans le biotope (1). Comme nous avons effectué nos échantillonnages sur de petites surfaces, nous n'avons pas tenu compte des larves dans cette étude.

Dans la station 1 (forêt), nous avons constaté deux pics d'activité des tiques en 1980: le premier en juin-juillet, et le deuxième, moins accentué, en septembre-début octobre. Ceci concorde avec d'autres observations faites en Suisse (1, 65, 66, 67). L'année suivante (1981), le premier pic était avancé d'un mois, sans doute à la suite de meilleures conditions météorologiques. Pendant ces 2 années d'observation, l'apparition en grand nombre des larves libres ne débute qu'au mois de juin, donc avec un retard de 3 à 4 mois par rapport aux nymphes et aux adultes. Ces larves sont sans doute issues de la ponte des femelles qui se sont gorgées au printemps.

Dans les stations 2 (clairière) et 3 (lisière de forêt), le pic d'activité en automne est pratiquement inexistant. Les tiques ayant besoin d'un degré hygrométrique assez élevé (23), elles ne survivent que difficilement, durant les mois chauds de l'année, dans un ancien Mesobromium sans couvert forestier

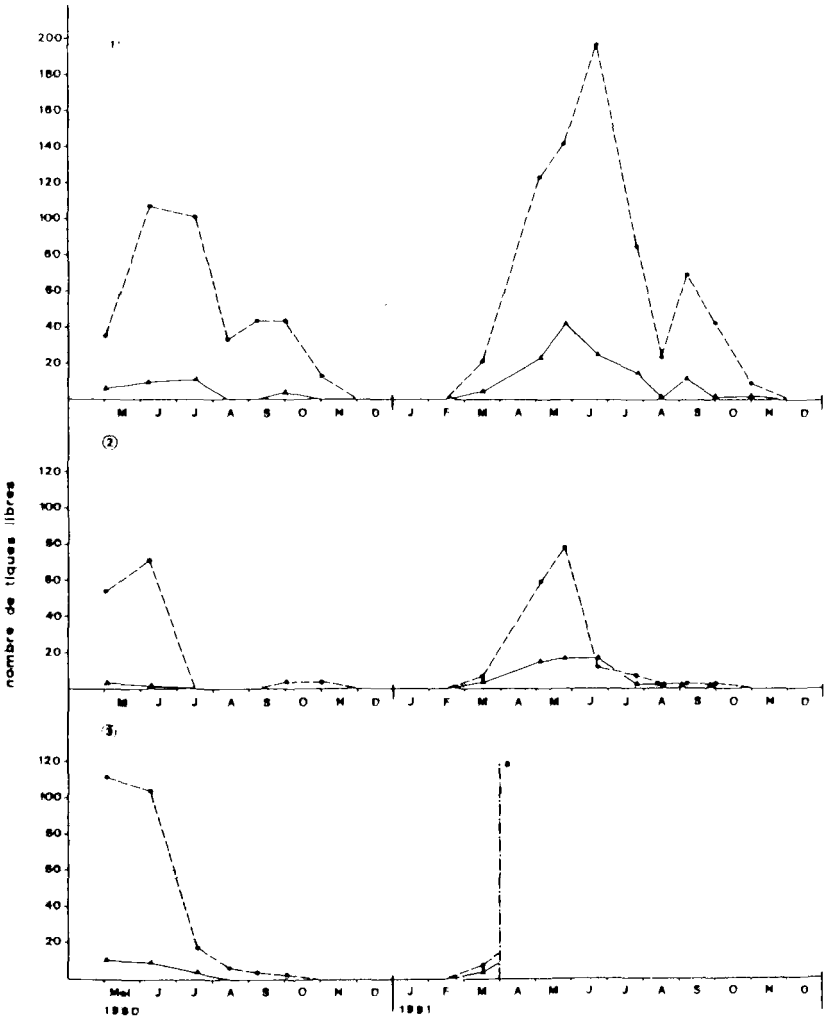


Figure 6 : Echantillonnage mensuel de tiques libres au "Laubberg"

- 1 : Station 1 (100 m<sup>2</sup> à l'intérieur de la forêt)
- 2 : Station 2 (100 m<sup>2</sup> dans une clairière)
- 3 : Station 3 (300 m le long de la lisière de la forêt)

← : tiques adultes; ●---● : nymphes; a: destruction de cette station par la construction d'un chemin forestier.

et sans sous-bois. L'absence d'activité des tiques durant l'hiver 1980-81 est due aux basses températures et à la neige qui a persisté de novembre à mi-février. A proximité de ces 3 stations, nous n'avons presque jamais capturé de tiques libres, peut-être pour des raisons de température et/ou à cause du très faible sous-bois des forêts environnantes.

#### 7.1.4. Etudes virologiques

Bien que nous ayaons réussi à isoler, en 1979, 4 souches de virus CEE à partir des tiques de cette région, en 1980 rien n'a été obtenu alors qu'au printemps 1981 une 5ème souche était identifiée. Cette différence est peut-être due au stade évolutif des tiques analysées. Les 4 premières souches ont été isolées à partir de 327 tiques récoltées au mois de mai 1979 dont plus de la moitié étaient des adultes. En 1980, sur les 782 tiques récoltées, il n'y avait que 68 adultes. Quant à la souche obtenue en 1981, elle avait été isolée à partir de 446 tiques dont 227 adultes. Ces tiques avaient également été récoltées au mois de mai.

Dans le sérum des micromammifères capturés, nous avons recherché des anticorps spécifiques du virus CEE. Un seul individu (A. flavicollis) présentait des anticorps neutralisant à un titre de 1:488. Nous n'avons pas effectué d'essais d'isolation de virus à partir de ces rongeurs.

Nous présenterons une hypothèse sur le fonctionnement d'un tel foyer naturel d'encéphalite à tiques dans la discussion finale.

#### 7.2. Répartition saisonnière des cas cliniques humains dans le canton de Zurich

Dans le canton de Zurich, 41 cas d'encéphalite à tiques ont été diagnostiqués en 1979, 13 en 1980 et 15 en 1981. La répartition saisonnière de ces cas est représentée dans la figure 7.

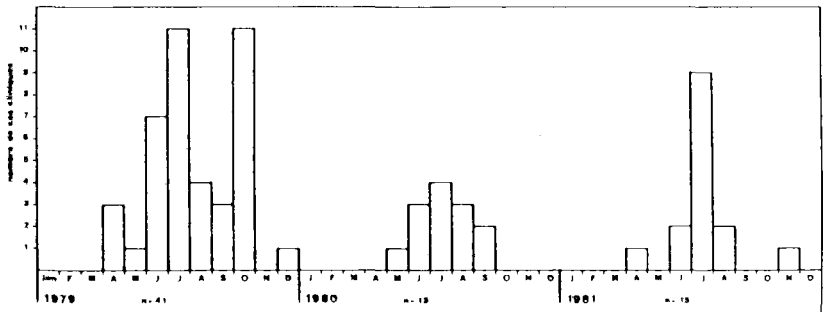


Figure 7 : Répartition saisonnière des cas cliniques humains d'encéphalite à tiques dans le canton de Zurich.  
n = nombre de cas annuels.

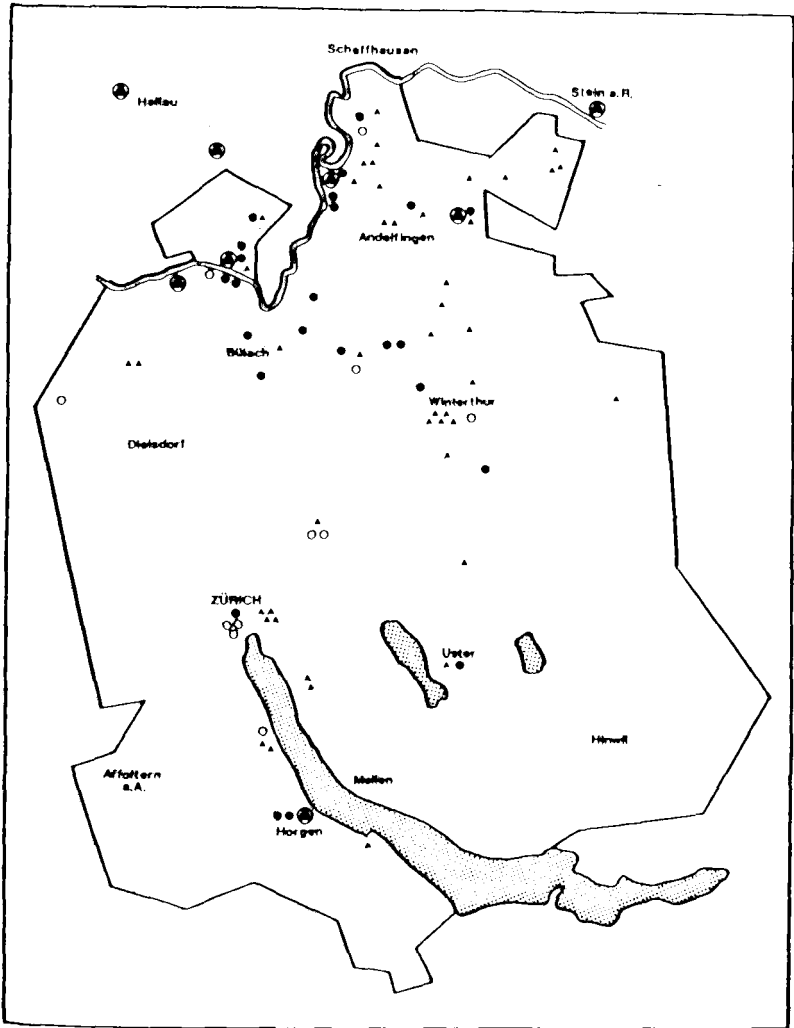
En comparant les données de l'échantillonnage mensuel des tiques du "Laubberg" à celles des cas d'encéphalite (1980/81), nous constatons un décalage d'environ 1 mois entre les pics. Cela pourrait correspondre au temps d'incubation du virus chez le patient, avant l'apparition de symptômes cliniques. D'autre part, on constate un rapport probable entre le nombre de tiques actives et le nombre d'infections, du moins au début de la belle saison. Ainsi, le nombre de tiques libres capturées au mois de juin semble pouvoir être mis en rapport avec le nombre de cas d'encéphalite de mois suivant. Le deuxième pic d'activité des *Ixodes*, par contre, ne se répercute, ni en 1980 ni en 1981, sur le nombre d'infections chez l'homme. Ceci pourrait être dû à une variation du pouvoir pathogène du virus. Ces problèmes sont exposés en détail dans la discussion finale.

### 7.3. Répartition géographique

La figure 8 représente la répartition, dans le canton de Zurich, des cas à sérologie positive provenant du personnel forestier, des malades hospitalisés, et des chiens examinés.

Pour le personnel forestier, la localisation des cas est donnée par le lieu de travail, pour les malades et les chiens, par leur lieu d'habitation. En ce qui concerne la localisation des foyers naturels détectés par isolation du virus CEE, outre nos propres résultats, nous avons aussi représenté ceux de WYLER et al. (117), et de RADDÀ et al. (86).

Les cas cliniques et sérologiques se rencontrent surtout dans le nord du canton et plus modestement à l'ouest du bas du lac. Ainsi, il existe une assez bonne corrélation entre les localisations des cas cliniques d'encéphalite à tiques et celles des investigations sérologiques des forestiers. Ces derniers ont donné des résultats plus précis que ceux obtenus par l'analyse des séra de chiens. Rappelons que les séra de chiens ont été analysés uniquement par le test de l'inhibition de l'héماغglutination. Ces résultats ne nous permettent pas d'exclure les réactions non spécifiques dues éventuellement à d'autres Flavivirus.



**Figure 8 :** Répartition géographique de l'encéphalite à tiques dans le canton de Zurich.

- : foyers naturels d'encéphalite à tiques localisés par isolation du virus;
- : anticorps chez le personnel forestier;
- : anticorps chez les chiens;
- ▲ : cas cliniques d'encéphalite à tiques de 1979 à 1981.

#### IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

##### 1. Introduction de nouvelles méthodes

L'introduction du test ELISA détectant les anticorps spécifiques du virus CEE nous permet d'établir actuellement un diagnostic sur l'encéphalite à tiques. Ces anticorps sont présents dans le sérum du patient dès le début de la deuxième phase de la maladie. Il nous faut toutefois pouvoir nous assurer qu'ils ne proviennent pas d'une ancienne infection, ou d'un vaccin anti-CEE (ce qui supposerait que le patient ne souffre pas d'une encéphalite due au virus de l'encéphalite à tiques) (35). Il est connu que, lors d'une infection, des anticorps de la classe IgM sont tout d'abord formés, mais qu'ils disparaîtront par la suite assez rapidement. Les anticorps de la classe IgG, par contre, persistent durant plusieurs années et sont responsables d'une immunité durable. En utilisant, dans le test ELISA, des conjugués permettant de différencier les IgG et les IgM, nous pouvons diagnostiquer avec sûreté une infection récente. Finalement, étant donné sa simplicité d'exécution, ce test permet l'analyse simultanée d'une grande quantité de séra.

Nous avons d'autre part l'intention de mettre au point un test ELISA permettant de détecter et d'identifier rapidement le virus CEE dans un organe de vertébré, dans une culture cellulaire, ou même directement dans la tique. La limite de sensibilité de ce test s'est révélée être aux environs de  $10^4 ID_{50}$  du virus CEE de référence. Cette sensibilité est largement suffisante pour l'identification du virus à partir d'organes ou de cultures de cellules infectés, mais malheureusement pas pour le dépistage direct de l'antigène viral dans la tique. Nous nous sommes trouvés là à la limite de détection du test, les taux de virus dans la tique variant de  $10^1$  à  $10^5 ID_{50}$  (20, 45).

## 2. Recherches épidémiologiques

Le but principal de ce travail concernait l'établissement d'une répartition des foyers naturels d'encéphalite à tiques en Suisse. D'emblée nous étions conscient qu'un tel objectif ne serait pas facile à réaliser. En principe, pour voir se dessiner une répartition exhaustive des foyers, il eût fallu récolter et analyser plusieurs centaines de milliers de tiques dans toute la Suisse. Un tel procédé ne nous aurait d'ailleurs pas empêché de manquer les très petits foyers.

La localisation de foyers naturels d'agents infectieux nécessite l'usage d'indicateurs appropriés. Nous avons donc choisi de déterminer la présence d'anticorps contre le virus CEE dans le sérum de personnes exposées, c'est-à-dire travaillant professionnellement dans la forêt. Les forestiers, bûcherons et garde-chasse courent un plus grand risque d'infection que le reste de la population (42, 54, 55). Nous avons aussi analysé le sérum d'animaux tels que les chiens qui, souvent, sont parasités par les tiques. Ces investigations sérologiques englobent pratiquement tout le Plateau suisse, du lac de Constance au lac Léman, le canton de Lucerne excepté.

Dans 4 régions du Plateau, nous avons pu délimiter des foyers naturels d'envergure variable (figure 9).

Région 1: Cette région comprend le nord et le nord-ouest du canton de Zurich, avec les arrondissements de Winterthur, Bülach, Andelfingen et le sud du canton de Schaffhouse (Klettgau, Stein, Schaffhausen-S et Reiat). Plusieurs souches de virus CEE ont été isolées à partir de tiques récoltées près de Glattfelden et d'Eglisau (p. 46). La plupart des cas d'encéphalite à tiques enregistrés en Suisse proviennent de cette zone. Le pourcentage de forestiers séropositifs s'élevait en moyenne à 5,4% dans le canton de Zurich. Mais, dans certains arrondissements, comme celui d'Andelfingen, ce pourcentage culminait à 12,5%, celui de Bülach à 16,3% (tableau 15).

Région 2 : Un autre foyer naturel a été localisé dans l'arrondissement de Horgen (ZH), où quelques cas d'encéphalite à tiques chez l'homme ont été enregistrés. D'autre part, le virus CEE a pu être isolé à partir d'un cheval infecté dans cette région.

Région 3 : Dans la région de Thoune, deux foyers ont été découverts par isolation du virus CEE à partir de tiques et de micromammifères (p. 51). L'un se trouve près de "Zwieselberg" (Reutigen-Tierachern), l'autre au nord-est de Steffisburg, le long de la rivière Zulg. Plusieurs cas d'encéphalite à tiques sont enregistrés chaque année dans cette région.

Région 4 : Un autre foyer se trouve dans le "Grand Marais" (Grosses Moos), près d'Ins. Deux forestiers de cet arrondissement (arr. Erlach) présentaient des anticorps. D'autre part, nous avons isolé 10 souches de virus CEE à partir des I. ricinus de cette région. Il y a 10 ans, Krech supposait d'ailleurs l'existence de foyers naturels d'encéphalite à tiques dans le Grand Marais (53). Cette région est particulièrement intéressante, car elle présente des foyers de dimension restreinte. Le virus a par exemple été isolé de tiques capturées dans le "Staatswald", une forêt étroite d'environ 3 km de longueur, entourée de terrains cultivés, par conséquent absolument isolée des autres forêts. Ce lambeau de forêt déjà ancienne peut être considéré comme un foyer naturel typique, dans lequel se maintient une importante population de tiques, possédant ses propres microorganismes, et trouvant ses hôtes dans la faune locale de vertébrés. L'homme entre par accident dans ce foyer et s'infecte à la suite d'une piqûre de tique.

En 1980, le pourcentage de tiques infectées était exceptionnellement élevé dans les foyers de Thoune (0,8%) et du Staatswald (0,75%). De tels taux d'infection ont déjà été constatés lors d'autres enquêtes effectuées en Suisse (117), en Autriche et en Allemagne de l'Est (8, 41). Dans d'autres régions endémiques, seul le 0,1 à 0,5% des tiques étaient

porteuses du virus CEE. Nous pouvons donc admettre que, dans un foyer naturel d'encéphalite à tiques, 0,1 à 1% des tiques sont infectieuses. Le taux d'infection moyen de toutes les tiques analysées en Suisse au cours de ce travail se montait à 0,17%, ce qui correspond aux résultats d'autres régions d'Europe occidentale (11, 28, 81, 84). Il faut souligner que les tiques provenant du Tessin et du Valais n'ont livré à ce jour aucune souche de virus CEE.

Les recherches sérologiques effectuées auprès du personnel forestier démontrent que ces personnes sont exposées à un risque d'infection 5 fois plus élevé que le reste de la population et les résultats obtenus dans le canton de Zurich le prouvent clairement. En effet, les taux d'infection des forestiers de ce canton sont de 5% alors que celui de la population se situe à environ 1% (71). Ainsi, dans les régions où des foyers naturels ont été décelés, les personnes exposées devraient impérativement se faire vacciner contre l'encéphalite à tiques.

Les chasseurs et garde-chasse, par contre, semblent être moins exposés que les forestiers. Parmi les 249 sujets contrôlés dans le canton de Schaffhouse, 38 étaient des chasseurs. Aucun d'entre eux ne présentait d'anticorps contre le virus CEE alors que parmi les 211 forestiers testés 4,8% étaient positifs (tableau 3). Le nombre de séra de chasseurs étant toutefois assez faible, une conclusion absolue ne peut être encore apportée. Cependant, il faut relever que la saison de la chasse ne coïncide pas avec la période principale de l'activité des tiques.

Les sportifs participant à des courses d'orientation ne semblent pas plus exposés que les chasseurs à un très grand risque d'infection. En effet, parmi les 26 sportifs du cadre national de courses d'orientation, aucun ne présentait des anticorps, bien qu'ils aient parcouru de nombreux kilomètres en forêt, parfois dans des foyers d'encéphalite. Il serait tout de même souhaitable que les sportifs prennent les

précautions d'usage, soit la vaccination, lorsque le parcours passe par des foyers démontrés d'encéphalite à tiques (voir les deux cas positifs de la région de Thoune-Spiez).

La figure 9 montre la localisation géographique des 4 régions principales à foyers naturels d'encéphalite à tiques que nous avons pu relever en Suisse. En général, les lieux où nous avons pu isoler le virus CEE sont proches des lieux de travail ou d'habitation du personnel forestier séro-positif. Notre méthode d'approche était donc bonne. Il est évident que cette carte ne saurait être complète puisque nous n'avons pas eu accès à toutes les informations possibles. Cependant, en relation avec cette carte, le tableau 15 récapitule le nombre de séra analysés en Suisse, par région, démontrant ainsi que les localisations géographiques enregistrées correspondent grossièrement aux principaux cas séro-positifs.

Les régions où nous n'avons pu localiser de foyers ne peuvent être à priori décrétées "sans risques d'infection". Partout où le vecteur de la maladie, I. ricinus, est présent, l'existence de foyers comparables à celui du Staatswald ne peut être exclue. En effet, de temps en temps, des cas d'encéphalite à tiques isolés sont enregistrés en dehors des principaux foyers reconnus. Ainsi, les 2 forestiers positifs du Laufenburg (AG) pourraient s'être infectés dans des foyers localisés dans le Fricktal. D'autre part, il y a possibilité d'installation de nouveaux foyers naturels dans des biotopes indemnes par importation de tiques infectées (pulsation d'un foyer). Le renard et le chevreuil, puisqu'ils parcourent parfois d'assez grandes distances, peuvent certainement jouer un rôle dans la dissémination de tiques infectées. Il en va de même des oiseaux, car ils sont souvent les hôtes des immatures d'I. ricinus, les nymphes surtout (4).

Parmi les tiques analysées parallèlement sur culture cellulaire et sur souriceaux, 22 souches de virus CEE ont été isolées; 16 n'étaient positives que sur souris, 5 sur souris et sur culture de cellules et 1 seulement sur cellules. Les

chances d'isoler le virus sur les cellules MPK se montrent donc à 25% tandis que sur souriceaux elles sont de 95% ! Dès que ces souches ont subi au moins un passage, que ce soit sur souriceaux ou en culture de cellules, elles deviennent toutes pathogènes. Les souches de virus non identifiées se sont comportées de la même manière, une seule souche sur trois ayant été positive en culture cellulaire à la suite de l'isolation initiale. Dans ces deux systèmes, l'isolation sur souriceaux est donc nettement supérieure à celle effectuée avec les cellules MPK. Les cultures de cellules embryonnaires de fibroblastes de poulet (CEC) pourraient peut-être donner de meilleurs résultats. En effet, lors du titrage de tiques infectées artificiellement, Kozuch a obtenu des titres similaires en culture CEC et sur souriceaux (47).

---

Figure 9 : Répartition géographique des foyers naturels  
(voir p.72) d'encéphalite à tiques en Suisse.

- : foyers naturels, localisés par l'isolation du virus à partir de tiques et de mammifères;
  - : lieu d'habitation ou de travail des forestiers et autres personnes exposées séro-positives.
- La numérotation des foyers se rapporte au texte.

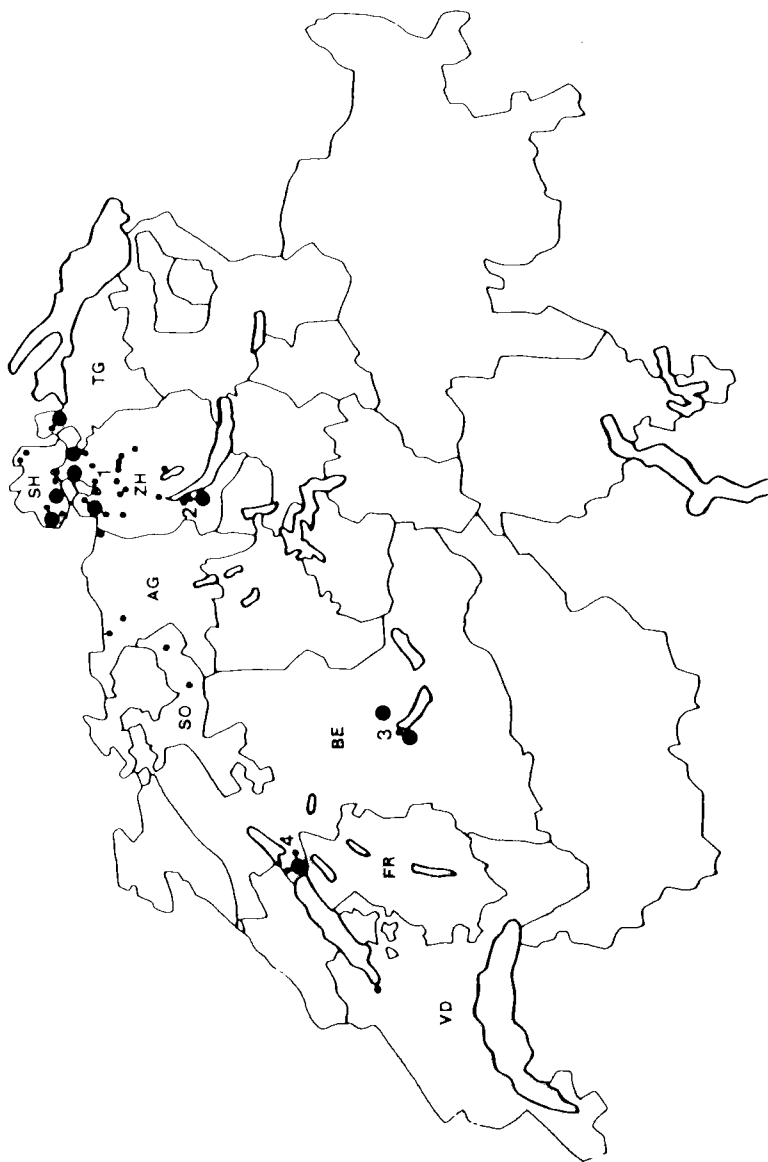


Figure 9 : Répartition géographique des foyers naturels d'encéphalite à tiques en Suisse

Tableau 15 : Anticorps contre le virus CEE dans le sérum  
du personnel forestier de différents cantons.

Canton - Région	Nombre de séra présentant des anticorps	/	Nombre de séras analysés	Pourcentage des séras positifs
ZH Affoltern a. Albis	2	/	57	3,5
Uster / Hinwil	1	/	46	2,2
Winterthur	5	/	130	3,8
Bülach / Eligsau	8	/	49	16,3
Dielsdorf	0	/	26	-
Andelfingen / Rheinau	6	/	48	12,5
Zürich	1	/	69	1,5
TG Frauenfeld / Mönchwil	0	/	25	-
Kreuzlingen / Weinfelden	0	/	21	-
BE Aarberg	0	/	18	-
Langnau	0	/	27	-
Burgdorf	0	/	26	-
Langenthal	0	/	47	-
Laufen	0	/	6	-
Biel	0	/	26	-
La Neuveville	0	/	5	-
Erlach (Grosses Moos)	2	/	22	9,1
Thun	1	/	44	2,3
Bern	0	/	79	-
Brienz	0	/	5	-
VD Morges	0	/	43	-
Yverdon	1	/	71	1,4
Nyon	0	/	4	-
Montreux	0	/	6	-
Lausanne	0	/	4	-
Pompaples	0	/	35	-
Payerne	0	/	33	-
Aigle	0	/	17	-
autres	0	/	7	-
SO Breitenbach	0	/	21	-
Dornach	0	/	5	-
Grenchen	0	/	16	-
Solothurn	0	/	48	-
Olten	2	/	72	2,8

(suite p. 74)

Tableau 15 (suite)

Canton - Région	Nombre de séra / Nombre de présentant des / séra anticorps / analysés	Pourcentage des séra positifs
AG Zofingen	0 / 121	-
Aarau	0 / 72	-
Rheinfelden	0 / 75	-
Schöftland	0 / 30	-
Zurzach	1 / 32	3,1
Laufenburg	2 / 62	3,2
Teufental	0 / 18	-
Baden	0 / 64	-
Bremgarten	0 / 36	-
Muri	0 / 34	-
Lenzburg	0 / 40	-
Brugg	0 / 43	-
FR	0 / 47	-
SH	10 / 249	4,0

### 3. Le virus de l'encéphalite à tiques dans la nature

Remarques préliminaires : L'épidémiologie du virus de l'encéphalite à tiques dans la nature n'est pas encore élucidée dans tous ses détails. Trois questions se posent à ce sujet :

- 1) Comment le virus circule-t-il entre ses hôtes potentiels et le vecteur ?
- 2) Comment expliquer les variations du nombre des cas cliniques observées au cours des années dans une même région ?
- 3) Comment expliquer la durée et parfois l'extrême localisation des foyers d'encéphalite à tiques dans le terrain ?

Nous tentons d'apporter une réponse, parfois spéculative, à chacune de ces questions.

#### 3.1. Cycle du virus de l'encéphalite à tiques dans la nature

I. ricinus représente sans doute, en Europe occidentale, le vecteur et le réservoir principal du virus CEE. Les vertébrés, vu leurs courtes phases virémiques et la formation d'anticorps, ne peuvent être considérés comme réservoirs.

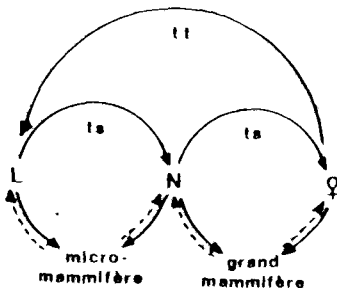


Figure 10 : Cycle du virus de l'encéphalite à tiques. (selon RADDA (81))

L: larve; N: nymphe;  
♀: femelle;  
tt: transmission transovarienne;  
ts: transmission transstadiale;  
—→ : repas infectant;  
- - - -> : repas infectieux.

La tique s'infecte lors d'un repas sanguin sur un hôte virémique (repas infectieux, figure 10) si elle n'est pas

déjà infectante d'emblée par le biais du phénomène de la transmission transovarienne (89). Après la mue, le virus se localise, entre autres organes, dans les glandes salivaires du vecteur (20). Il sera injecté à un autre hôte lors du prochain repas sanguin (repas infectant).

Il est ici nécessaire de rappeler que la tique ne peut s'infecter que lors de la phase virémique du vertébré. Le titre du virus dans le sang de l'hôte doit atteindre un seuil minimum ("threshold") pour que l'arthropode puisse s'infecter (81: FAIVRE, communication personnelle). L'hôte infecté développe des anticorps spécifiques et il ne pourra plus être ré-infecté une seconde fois par le virus CEE. Il sera donc un frein à la dissémination du virus dans une population de tiques. Pour que le virus puisse circuler librement entre l'hôte et le vecteur, il faut donc faire appel soit à d'autres vertébrés réceptifs au virus, soit à des hôtes se reproduisant fréquemment, diminuant ainsi l'impact de la rapide immunisation. D'une manière générale, les micromammifères réunissent ces conditions et jouent probablement un rôle prépondérant dans l'infection des tiques par le virus.

RADDA (81) a décrit en détail le rôle épidémiologique des hôtes pour le virus CEE. Selon lui, les hôtes les plus importants se recrutent parmi les espèces suivantes: A. flavicollis, C. glareolus, Sorex araneus, T. europea et E. europea. D'après les résultats des piégeages effectués à Thounne (BE) et au "Laubberg" (ZH), nous pensons pouvoir ajouter à cette liste les espèces A. sylvaticus et M. agrestis. Tous ces micromammifères développent des virémies assez hautes pour permettre l'infection des tiques (81) il est vrai pendant un laps de temps assez court (5 jours). Les immatures d'I. ricinus doivent donc se nourrir au "bon" moment pour s'infecter du virus. Quant aux vertébrés de grande taille, les hôtes principaux des adultes d'I. ricinus, ils ne sont vraisemblablement pas un maillon du cycle du virus CEE dans la nature, car leur état virémique est apparemment en dessous du seuil d'infection minimum pour les tiques (81).

### 3.2. Y a-t-il une variation dans la virulence des souches d'encéphalite à tiques ?

Tout d'abord, relevons quelques constatations et questions non résolues:

- Parmi les tiques récoltées dans le canton de Zurich, environ 0,1% étaient porteuses de virus. En partant du fait que seulement 10% des personnes infectées subissent une encéphalite à tiques clinique (voir p. 8), la probabilité de tomber malade après la piqûre d'une tique est donc de 1:10'000. En 1979, plus de 40 cas d'encéphalite à tiques ont cependant été enregistrés dans ce canton. Il faudrait donc admettre que plus de 100'000 personnes sont entrées en contact avec des tiques, ceci uniquement dans le nord du territoire, ce qui n'est guère probable. Comment expliquer ce phénomène ?
- Le nombre de cas annuels d'encéphalite à tiques chez l'homme est très variable. KRECH (52) a observé, pour la période 1970 - 1978, des "années record" avec 55 cas en 1973 et 39 en 1976, la moyenne étant de 26 cas par an. Nous avons constaté d'autre part que l'année 1979 représentait aussi une "année record" pour le canton de Zurich, comparée aux deux années suivantes. Bien qu'il semble se démarquer un cycle trisannuel (1973, 1976, 1979, ?), il est encore trop tôt pour tirer des conclusions définitives de ces observations. Nous ne pensons pas que ce rythme soit uniquement explicable par des variations de densité de population de tiques, bien que celles-ci existent (66).
- Dans le canton de Zurich, la répartition saisonnière des cas d'encéphalite dus au virus CEE correspond à l'activité d'I. ricinus, comme nous l'avons constaté au "Laubberg" (années 1980/1981). Toutefois, si, en 1979, nous observons une correspondance directe entre les deux pics d'activité des tiques et l'apparition des cas cliniques, la corrélation n'existe plus avec le pic automnal des années 1980/81. En Autriche (Neuenkirch), une même observation a été

relevée: bien que le deuxième pic annuel d'activité des tiques soit plus marqué qu'en Suisse, très peu de cas ont été enregistrés en automne 1961 et 1962 (84).

- Les souches de virus proviennent presque toutes de tiques capturées aux mois de mai/juin. Aucune souche de virus n'a pu être isolée à partir de tiques capturées en automne. Ceci concorde avec les observations faites par PRETZMANN et al. (77) et aussi avec l'apparition saisonnière des cas d'encéphalite à tiques chez l'homme, le plus grand nombre ayant lieu après le pic de printemps. Différentes théories tentent d'expliquer ces phénomènes saisonniers ou sporadiques, faisant intervenir des différences éventuelles dans la virulence du virus CEE. Une explication pourrait reposer sur l'hypothèse de SCHLESINGER et al. (94). Celle-ci fait intervenir l'existence de mutants du virus sensibles à la température. A notre avis, le modèle du cycle saisonnier proposé par ces auteurs pour les Alphavirus et les moustiques pourrait être similaire pour les Flavivirus transmis par des tiques. SCHLESINGER et al. pensent que sous les latitudes tempérées, le virus dans l'arthropode devient progressivement sensible à la température (mutants ts). Ce ne sera que lors de la transmission à un vertébré homéotherme que pourra à nouveau jouer une sélection favorisant le virus non ts. L'hypothèse de Schleseinger suppose donc l'existence de virus virulent et non virulent.

Dernièrement, IGARASHI et al. (39) ont réussi l'isolation de plusieurs souches de virus Getah (Alphavirus) et de virus de l'encéphalite japonaise (Flavivirus) à partir de Culex tritaeniorhynchus capturés dans la nature. Ces souches ont été isolées sur culture de cellules d'Aedes albopictus à 28°C et ont été classées comme étant des mutants à caractère ts et dépendant de l'hôte. Il n'est donc pas impossible que le virus de l'encéphalite à tiques puisse se maintenir sous forme de mutant ts dans son vecteur, non détectable avec les méthodes utilisées couramment. Ceci

expliquerait aussi que nous n'ayons trouvé le virus CEE que dans des régions à population de tiques assez importante, groupées dans de relativement petites stations. En effet, une grande population de tiques favorise la circulation du virus entre l'hôte et l'arthropode, imposant ainsi une sélection du virus non ts (virulent?).

Cette sélection du virus virulent, variant selon l'intensité de la circulation du virus, pourrait expliquer les variations annuelles des nombres de cas d'encéphalite à tiques, mais pas l'absence quasi totale d'activité du virus en automne. D'autre part, en effectuant nos essais d'isolation à 37°C, que ce soit sur souriceaux ou en culture de cellules, nous manquons donc la plupart des mutants ts. L'utilisation d'une culture de cellules de tiques à 28°C est actuellement à l'étude pour répondre à cette question.

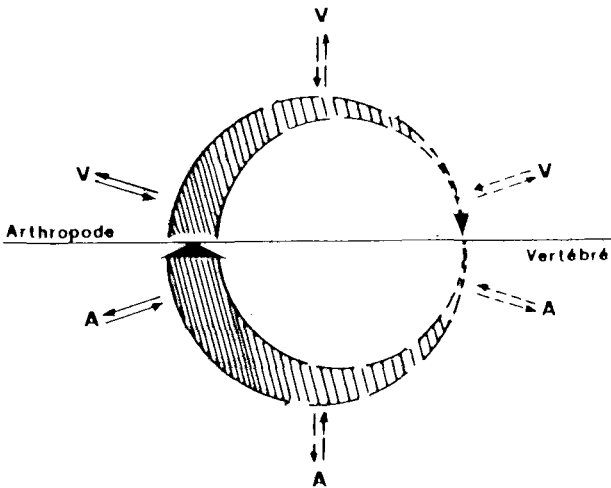


Figure 11 :

Cycle saisonnier d'un virus potentiellement pathogène sous climat tempéré (selon SCHLESINGER et al. (94)).

V: vertébré; A: arthropode; amincissement de la flèche: accumulation des mutants ts (non virulents?); épaissement de la flèche: accumulation de virus non ts (virulents?); ———> : transmission de virus non ts; -----> : transmission de virus ts.

### 3.3. Fonctionnement d'un foyer: Cycles endophile et exophile

La survie d'un foyer naturel et sa durée dans des biotopes précis sur plusieurs années demandent aussi une explication. AESCHLIMANN (2) a proposé l'introduction dans le cycle d'une tique monotrope et endophile, I. trianguliceps par exemple. Cette espèce ayant une grande spécificité parasitaire, elle accomplit son cycle évolutif entier sur les micromammifères. Sans l'intervention de tiques d'autres espèces, le foyer fonctionnera donc en circuit fermé et l'homme n'en sera jamais le révélateur. Ce ne sera que par l'intervention de tiques télétropes parasitant une large gamme d'hôtes (cas d'I. ricinus) que le virus pourra être transmis à de grands vertébrés et à l'homme.

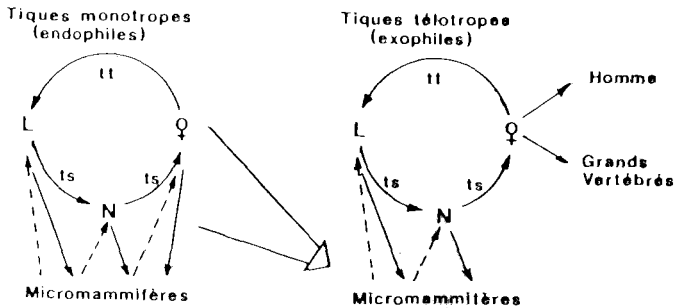


Figure 12 : Chaîne épidémiologique des encéphalites à tiques (selon AESCHLIMANN (2))

L: larves; N: nymphes; ♀: femelles; tt: transmission transovarienne; ts: transmission transstadiale; —>: repas infectant; ---->: repas infectieux.

Ce diagramme représente donc le maintien d'un foyer dans un biotope de surface variable, mais qui peut être très réduit, par conséquent difficile à déceler pour le chercheur.

En effet, si le cycle s'effectue uniquement avec des tiques monotropes endophiles, il restera strictement localisé et inapparent. L'introduction de tiques exophiles permettra au foyer original, par le biais d'hôtes plus mobiles, de donner naissance à d'autres foyers. En Suisse, il s'agira d'I. ricinus qui, une fois infecté dans un microfoyer, pourra être transporté au loin par divers animaux. AESCHLIMANN appelle "pulsation d'un foyer" cette exportation de tiques infectées, donc infectantes pour de nouveaux hôtes. L'homme s'infecte par hasard dans ce foyer, en rencontrant un quelconque stade évolutif d'I. ricinus.

Constatons que l'écologie du virus CEE n'est pas encore établie dans tous ses détails et que les hypothèses émises par différents auteurs, hypothèses que nous avons citées plus haut, demandent encore à être contrôlées et approfondies.

## REMERCIEMENTS

Je suis en tout premier lieu sincèrement reconnaissant au Prof. A. Aeschlimann, Directeur de l'Institut de Zoologie de l'Université de Neuchâtel, qui, en tant que Directeur de thèse, m'a suggéré le thème de cette recherche. Celui-ci s'intègre parfaitement dans la série de travaux effectués à Neuchâtel sur l'écologie des tiques et sur les mécanismes de la transmission de microorganismes par ces vecteurs.

Ma reconnaissance toute particulière va au Prof. R. Wyler, co-Directeur de thèse, Directeur de l'Institut de Virologie de l'Université de Zurich, qui a rendu possible l'exécution de ce travail en mettant à ma disposition toute l'infrastructure de son laboratoire et qui, tout au long de ma recherche, m'a guidé très judicieusement.

Je remercie également le Dr M. Brossard pour avoir relu et corrigé mon manuscrit et pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Le Prof. Ch. Kunz, de Vienne, n'a pas craint de faire le voyage de Neuchâtel pour juger de cette recherche. Qu'il soit remercié de mettre ainsi sa grande expérience à ma disposition.

Mes remerciements s'adressent également aux personnes et institutions qui ont collaboré à la récolte de sérums. Ce sont notamment les Hôpitaux vétérinaires de Berne, Zurich et Bâle (Münchenstein), les Services de Santé cantonaux ainsi que les Services forestiers cantonaux.

Finalement, je tiens également à remercier tous les collaborateurs de l'Institut de Virologie de leur aide et de leur soutien. Je citerai, en particulier, Mlle E. Ferrari pour son aide technique, Mmes E. Boeniger et D. Schneiter pour la mise au propre de ce manuscrit.

Ce travail a été soutenu financièrement par le canton de Zurich et par le Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique (Requête no 3'303.78) que je remercie de leur générosité.

BIBLIOGRAPHIE

1. Aeschlimann, A.: *Ixodes ricinus*, Linné, 1758 (Ixodoidea, Ixodidae). Essai préliminaire de synthèse sur la biologie de cette espèce en Suisse. *Acta tropica*, Sep. Vol. 29/4, 321-340, 1972.
2. Aeschlimann, A.: Les tiques, leurs biologie et les maladies qu'elles transmettent. *Annales 1975-76*, Université de Neuchâtel.
3. Aeschlimann, A., Büttiker, W., Eichenberger, G.: Les tiques (Ixodidae) sont-elles vecteurs de maladies en Suisse ? *Mitteil. der Schweiz. Entom. Ges.* 42, 317-320, 1969.
4. Aeschlimann, A., Vaucher, C., Mermod, C.: The role of birds in the life cycle of *Ixodes ricinus* L. in a low marsh forest of Switzerland. *Proc. 3rd Intern. Congr. Parasit.*, München, 949-950, 1974.
5. Aeschlimann, A., Burgdorfer, W., Matile, H., Peter, O., Wyler, R.: Aspects nouveaux du rôle de vecteur joué par *Ixodes ricinus* L. en Suisse. *Acta Tropica* 36, 181-191, 1979.
6. Albrecht, P.: Pathogenesis of neutropic arbovirus infections. *Current Topics Microbiol. Immun.* 43, 44-91, 1968.
7. Apitsch, L.: Untersuchungen über Reservoir der Zeckenzephalitis und ihre epidemiologische Bedeutung im Herdgebiet "Torgolow". *Z.ges.Hyg.* 11, 65-74, 1965.
8. Apitsch, L., Sinnecker, H., Wigand, R., Berndt, D.: Zeckenzephalitis-Virusisolierung in der DDR 1965/66 und einige Stammdifferenzierungen. *Zbl. Bact. Hyg. I. Abt. Orig. A* 207, 429-434, 1968.

9. Berge, T.O.: International catalogue of Arboviruses including certain other viruses of vertebrates. Ed. 2, U.S. Dept. of Health, Education and Welfare Publ. No. (CDC) 75-8301, 1975, with updatings by Subcommittee on Information Exchange to Dez. 1978.
10. Blascovic, D.: Tick-borne encephalitis in Europe: some aspects of epidemiology and control. Trans. N.Y. Acad. Sci. 23, 215-232, 1961.
11. Brummer-Korvenkontio, M., Saiku, P., Korhonen, P., Oker-Blom, N.: Arboviruses in Finland. I. Isolation of tick-borne encephalitis (TBE) virus from arthropodes, vertebrates and patients. Am. J. trop. med. hyg. 22/3, 382-389, 1973.
12. Chumakov, M.P.: Investigation on ultraviral encephalitides. VI. Transmission of tick-borne encephalitis virus to the progeny of ixodid ticks and the problem of natural reservoirs of this infection. Med. Parazit. (Mosk) 6, 38, 1944 (in russian).
13. Clarke, D.H.: Further studies on antigenic relationships among the viruses of the group B tick-borne complex. Bull. WHO 31, 45-56, 1964.
14. Clarke, D.H.: Antigenic variation and geographic distribution of arboviruses. Proc. 7th int. Congr. trop. med. mal. 3, 175-178, 1964.
15. Clarke, D.H., Casals, J.: Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with Arboviruses. Amer. J. trop. med. hyg. 7, 561-573, 1958.
16. De Madrid, A.T.: Studies of Flavivirus (group B Arbovirus) with particular references to antigenic composition. Thesis, Division of Virology, National Institute for medical research, Mill Hill, London, 1972.

17. Ernek, E.: The role of water birds in the circulation of tick-borne encephalitis virus. Proc. 7th. Congr. trop. med. malar. 3, 151-184, 1964.
18. Ernek, E., Lichard, M.: Role of the english sparrow (*Passer domesticus*) in the circulation of TBE-virus. J. Hyg. Epidem. (Praha) 8, 375-379, 1964.
19. Ernek, E., Kozuch, O., Lichard, M., Nosek, J., Albrecht, P.: Experimental infection of *C. glareolus* and *A. flavicollis* with TBE-virus. Acta virol. 7, 434-436, 1963.
20. Faivre, J.P.: thèse, en préparation.
21. Freundt, E.A.: The western boundary of endemic tick-borne meningo-encephalitis in southern Scandinavia surveys in Denmark. Acta Pathol. et Microbiol. Scand. 57, 87-103, 1963.
22. Frisch-Niggemeyer, W.: Inaktivierung der Hämagglutinationsfähigkeit des Frühsummer-Meningoenzephalitis (FSME)-Virus. Arch. Virusf. 18, 163-171, 1966.
23. Graf, J.F.: Copulation, nutrition et ponte chez *Ixodes ricinus* L. (Ixodoidea: Ixodidae) - 1. partie. Bull. soc. entom. suisse 51, 89-97, 1978.
24. Gresikova, M., Albrecht, P.: Experimental pathogenicity of the TBE-Virus for the green lizard, *Lacerta viridis* (Laur.) J. Hyg. Epidemiol. 3, 258-262, 1959.
25. Gresikova, M., Nosek, J.: Isolation of tick-borne encephalitis virus from *Haemaphysalis inermis* ticks. Acta virol. 10, 359-361, 1966.
26. Gresikova, M., Sekeyova, M., Prazniakova, E.: Isolation and identification of Group B Arboviruses from the blood of birds captured in Czechoslovakia. Acta virol. 19, 162-164, 1975.

27. Hannoun, C., Rodhain, F.: Répartition géographique des encéphalites à arbovirus. G.M. de France, 82 (32), 3761-3774, 1975.
28. Hannoun, C., Chatelain, J., Krams, S., Guillon, J.C.: Isolement, en Alsace, du virus de l'encéphalite à tiques. C.R.Acad.Sc.Paris 272, 766-768, 1971.
29. Hebert, G.A., Pelham, P.L., Pittman, B.: Determination of the optimal ammonium sulfate concentration for the fractionation on rabbit, sheep, horse and goat antisera. Appl. Microbiol. 25, 26, 1973.
30. Heigl, Z., von Zeipel, G.: Experimental infection with TBE-virus in *Cl. glareolus*, *Ap. flavicolis*, *Ap. sylvaticus* and *Mus musculus*. Acta path. microbiol. Scandinav. 66, 489-509, 1966.
31. Heinz, F., Kunz, Ch.: Ein sensitives Gewebekultur-Antigen des Frùhsommer Meningoenzephalitis-Virus zur Verwendung im HHT. Arch. Virol. 48, 191-194, 1975.
32. Heinz, F., Kunz, Ch.: Concentration and purification of tick-borne encephalitis virus grown in suspensions of chick embryo cells. Acta virol. 21, 301-307, 1977.
33. Heinz, F., Kunz, Ch.: Characterization of tick-borne encephalitis virus and immunogenicity of its surface components in mice. Acta virol. 21, 308-316, 1977.
34. Heinz, F., Kunz, Ch.: Dissociation of tick-borne encephalitis virus by Triton-X-100 and Cetyltrimethylammonium Bromide. Acta virol. 23, 189-197, 1979.
35. Hofmann, H.: Diagnosis of TBE in the virological routine laboratory. dans: Tick-Borne Encephalitis, Int. Symp. Baden/Vienna 1979, ed. Ch. Kunz, ISBN 3-85076-090-1, 1981.

36. Hofmann, H., Frisch-Niggemeyer, W., Heinz, F.: Rapid diagnosis of tick-borne encephalitis by means of enzyme linked immunosorbent assay. *J. gen. Virol.* 42, 505-511, 1979.
37. Hofmann, H., Frisch-Niggemeyer, W., Heinz, F., Kunz, Ch.: Immunoglobulins to tick-borne encephalitis in the cerebrospinal fluid of man. *J. med. Virol.* 4, 241-245, 1979.
38. Hoogstraal, H.: Ecology of the Tete-serogroup. *Dokl. Simp. Transkont. Svyazi Perelethn. Ptits Rol'v Rasp. Arbovirus*, 212-213, 1978.
39. Igarashi, A., Sasao, F., Fukas, K., Bues, K., Ueba, N., Yoshida, M.: Mutants of Getah and Japanese encephalitis virus isolated from field-caught *Culex tritaeniorhynchus* using *Aedes albopictus* clone C6/36 cells. *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)* 132E, 235-245, 1981.
40. Iliencko, V.J.: Experimental facts concerning the mechanism of alimentary infection with the virus of biphasic meningo-encephalitis. *Acta virol.* 1, 46-56, 1957.
41. Jettmar, H.M.: Ueber die Rolle der Zecken bei der Verbreitung der 2-welligen Virus-Meningoenzephalitis in Oesterreich. *Anzeiger für Schädlingskunde* 30, 129-137, 1957.
42. Körting, H.J.: Problems of diagnosis and epidemiology of tick-borne encephalitis. *dans: Tick-Borne Encephalitis*, Int. Symp. Baden/Vienna 1979, ed. Ch. Kunz, ISBN 3-85076-090-1, 1981.
43. Kozuch, O., Nosek, J.: Alimentary infection of the hedgehog with tick-borne encephalitis (TE) virus. *Acta virol.* 8, 284, 1964.

44. Kozuch, O., Nosek, J.: Transmission of tick-borne encephalitis (TBE) virus by *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* ticks. *Acta virol.* 15, 334, 1971.
45. Kozuch, O., Nosek, J.: Experimental transmission of tick-borne encephalitis (TBE) virus by *Haemaphysalis concinna* ticks. *Acta virol.* 24, 377, 1980.
46. Kozuch, O., Grulich, I., Nosek, J.: Experimental infection of the mole (*Talpa*) with TBE-virus. *Acta virol.* 9, 287, 1965.
47. Kozuch, O., Mayer, V., Nosek, J.: Quantitative study of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks. *Acta virol.* 14, 53-58, 1970.
48. Kozuch, O., Nosek, J., Lichard, M.: Ueberleben des Zeckenenzephalitisvirus in der Zecke *Ixodes ricinus* und die Uebertragung dieses Virus auf den Igel (*Erinaceus roumanicus*). *Zbl. Bakt. Hyg.* 199, 152-161, 1966.
49. Kozuch, O., Nosek, J., Radda, A.: Synökologische Untersuchungen in Naturherden des FSME-Virus vom Karpatischen Typus. *Zbl. Bakt. I. Orig.* 209, 293-299, 1969.
50. Kozuch, O., Nosek, J., Lichard, M., Grulich, I.: Transmission of TBE-virus by nymphs of *Ixodes ricinus* to the european mole (*Talpa europea*). *Acta virol.* 10, 83, 1966.
51. Kozuch, O., Nosek, J., Ernek, E., Lichard, M., Albrecht, P.: Persistence of tick-borne encephalitis virus in hibernating hedgehogs and dormice. *Acta virol.* 7, 430-433, 1963.
52. Krech, T.: Die Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) in der Schweiz. Dissertation, med. Fakultät Universität Bern, 1980.

53. Krech, O., Jung, F., Jung, M.: Zentraleuropäische Zecken-enzephalitis in der Schweiz. Schweiz. med. Wschr. 99, 282-285, 1969.
54. Kunz, Ch.: Die Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) in Oesterreich mit besonderer Berücksichtigung der Forstwirtschaft. Proc. 15. Int. Congr. Arbeitsmedizin III, 363-368, 1966.
55. Kunz, Ch.: Die Frühsommer-Meningoenzephalitis. Pädiatr. Praxis 14, 189-192, 1974.
56. Kunz, Ch., Hofmann, H.: Die Frühdiagnose der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) im Hämagglutinationshemmtest durch Behandlung des Serums mit 2-Mercaptoaethanol. Zbl. Bakt.Hyg.I. Abt. Orig. A 218, 273-279, 1971.
57. Lennette, E.H., Schmidt, N.J.: Diagnostic procedures for viral and rickettsial infections (ed.). Amer. Publ. Hlth. Ass. 264-265, 743-744, N.Y., 1969.
58. Libikova, H.: Biology of viruses of the tick-borne encephalitis complex. Symp. of the czechoslovak acad of sciences Acad.Press, N.Y. 1962.
59. Likar, M., Kmet, J.: Virus meningoencephalitis in Slovenia. IV. Isolation of the virus from the ticks *Ixodes ricinus*. Bull. W.H.O. 15, 275-279, 1956.
60. Malkova, D., Smetana, A., Flischer, J., Marhoul, Z.: Course of infection of *Clethrionomys glareolus* and white mice with TBE-virus freshly isolated from *Ixodes ricinus* ticks. Acta virol. 9, 367-374, 1965.
61. Matile, H., Aeschlimann, A., Wyler, R.: Seroepidemiologic investigations on the incidence of TBE in Man and Dog in Switzerland. Int. Symp. Baden/Vienna 1979: Tick-borne encephalitis, ed. Ch. Kunz, 227-234, ISBN 3-85076-090-1, 1981.

62. Matile, H., Ferrari, E., Aeschlimann, A., Wyler, R.: Die Verbreitung der Zeckenenzephalitis in der Schweiz. Schweiz. med. Wschr. 111, 1262-1269, 1981.
63. Matile, H., Wyler, R., Aeschlimann, A., Burgdorfer, W., Peter, O.: Isolation of two strains of TBE-virus from Ixodes ricinus ticks from a low-lying marshy forest in Switzerland. Proc. int. Symp.: New aspects in ecology of Arboviruses, Smolenice/Bratislava 1979, 271-278, 1980.
64. Mc Lean, D.M.: Virology in health care. Williams and Wilkins, Baltimore, USA, ISBN 0-683-05864-9, 1980.
65. Mermod, C., Aeschlimann, A., Graf, J.F.: Ecologie et éthologie d'Ixodes ricinus Linné 1958 en Suisse (Acarina, Ixodoidea). Première note: Fluctuations numériques. Acarologia 15 (2), 197-205, 1973.
66. Mermod, C., Aeschlimann, A., Graf, J.F.: Ecologie et éthologie d'Ixodes ricinus L. en Suisse. Deuxième note: Comparaison des populations 1972 et 1973. Acarologia 16 (4), 1974.
67. Mermod, C., Aeschlimann, A., Graf, J.F.: Ecologie et éthologie d'Ixodes ricinus L. en Suisse. Quatrième note: Comparaison de deux populations d'altitude différentes. Acarologia 17 (3), 1975.
68. Moritsch, H., Kunz, Ch.: Frühsummer-Meningoenzephalitis (FSME) in Oesterreich 1960-63. Wien. Klin. Wochenschr. 76, 387-389, 1964.
69. Mornsteinova, D., Albrecht, P.: Experimental infection of Micromys minutus mice with Czechoslovak tick-borne encephalitis virus. Cs. Epid. Microbiol. 6, 157-161, 1957.
70. Molnar, E., Gresikova, M., Kubaszova, T., Kubiny, L., Szabo, J.B.: Arboviruses in Hungary. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 17, 1-10, 1973.

71. Munziger, J., Märki, H., Modde, H., Hiltbold, P., Schneider, M., Henn, V., Wyler, R.: Seroepidemiologische Untersuchungen zum Vorkommen der ZE-Virus-Infektion in der Schweiz. Schweiz. Rundschau Med. (PRAXIS) 66, 968-972, 1977.
72. Nosek, J., Grulich, I.: The relationship between tick-borne encephalitis virus and the ticks and mammals of the Tribeč mountain range. Bull. W.H.O. 36, suppl. 1, 31-47, 1967.
73. Nosek, J., Kozuch, O., Lichard, M.: Persistence of tick-borne encephalitis virus in, and its transmission by *Haemaphysalis springera* and *H.turturis* ticks. Acta virol. 11, 479, 1967.
74. Odelola, H.A., Oduye, O.O.: West Nile virus infection of adult mice by oral route. Arch. virol. 54, 251-253, 1977.
75. Pattyn, S.R., Wyler, R.: Méningo-encéphalite à virus en Autriche. 4. La virémie dans l'infection expérimentale. Essais de transmission par les moustiques. Bull. W.H.O. 12, 581-589, 1954.
76. Pavlov, P., Daniel, M., Georgiev, B., Kolmann, J.M., Rashev, K.H., Arnaudov, D., Ignatov, D.: The natural focus of tick-borne encephalitis of sheep and man in the Rhodope mountains (Bulgaria). Folia parasitol. (Praha) 19, 33-40, 1972.
77. Pretzmann, G., Radda, A., Loew, J.: Untersuchungen in einem Naturherd der Frühsommer-Meningoenzephalitis in Niederösterreich. 5. Mitteilung: Weitere Untersuchungen des Viruskreislaufes im Naturherd. Zbl.Bakt.Hyg. 194, 431-439, 1964.
78. Przesmycki, F., Taytsch, Z., Wroblewska, Z., Lachmayer, J.: Investigation of encephalitis in the "Puszcza Bialowieska" natural park. J. Infect. Disease 106, 276-283. 1960.

79. Radda, A.: Die Biozönosen von Naturherden des Frühsommer-Meningo-Enzephalitis (FSME)-Virus in Oesterreich. Kongr. Ber. II. Tagung der Oesterr. Ges. f. Trop. Med. 50-55, Salzburg, 1969.
80. Radda, A.: Virämie bei einigen heimischen Karnivoren nach Infektion mit Frühsommer-Meningo-Enzephalitis (FSME)-Virus durch Zecken. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. 209, 464-469, 1969.
81. Radda, A.: Die Zeckenenzephalitis in Europa. Geographische Verbreitung und Oekologie des Virus. Z. Angew. Zool. 60, 409-461, 1973.
82. Radda, A., Hofmann, H., Kunz, Ch.: Experimentelle Infektion einiger heimischer Säugerarten mit dem Frühsommer-Meningo-Enzephalitis (FSME)-Virus. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. 208, 100-104, 1968.
83. Radda, A., Kunz, Ch., Hofmann, H.: Nachweis von Antikörpern in Wildseren zur Erfassung von Herden des Virus der Frühsommer-Meningo-Enzephalitis (FSME) in Niederoesterreich. Zbl. Bakt. Hyg. 208, 88-93, 1968.
84. Radda, A., Loew, J., Pretzmann, G.: Untersuchungen in einem Naturherd der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) in Niederösterreich. 2. Mitteilung: Virusisolierungsversuche aus Arthropoden und Kleinsäugetern. Zbl. Bakt. Hyg. I. Orig. 190, 281-298, 1963.
85. Radda, A., Pretzmann, G., Kovac, W.: Experimentelle Infektion von *Mus musculus* mit Frühsommer-Meningoenzephalitis Virus. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. 193, 285-292, 1964.

86. Radda, A., Schmidke, W., Wandeler, A.: Virus der Fröhsummer-Meningo-Enzephalitis. Nachweis des Virus der Fröhsummer-Meningo-Enzephalitis in Ixodes ricinus aus dem Kanton Zürich. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. 229, 268-272, 1974.
87. Reed, J., Münch, H.: A simple method of estimating fifty percent endpoints. Amer. J. Hyg. 27, 493-497, 1938.
88. Rehacek, J.: Experimental hibernation of the tick-borne encephalitis virus in engorged larvae of the tick Ixodes ricinus L. Acta virol. 4, 106-109, 1960.
89. Rehacek, J.: Transovarial transmission of tick-borne encephalitis virus by ticks. Acta virol. 6, 220-226, 1962.
90. Rehacek, J., Gresikova, M., Nosek, J., Albrecht, P.: Experimental infection of the buzzard (*Buteo buteo* L.) and kestrel (*Falco tinnunculus* L.) with TBE-virus. J. Hyg. Epid. Microbiol. 7, 145-150, 1963.
91. Reinhardt, F.: Zur Prophylaxe der Fröhsummer-Meningoencephalitis (FSME). Wiener klin. Wochenschr. 88 (8), 253-257, 1976.
92. Riedl, H., Kozuch, O., Sixl, W., Schmeller, E., Nosek, J.: Isolierung des Zeckenzephalitis-Virus (TBE-Virus) aus der Zecke *Haemaphysalis concinna* Koch. Arch. Hyg. Bact. 154, 610-611, 1971.
93. Schindler, R., Krampitz, H.E.: Ueber Unterschiede in der Empfänglichkeit verschiedener Mausstämmen und -arten gegenüber dem Virus der FSME. Zschr. Tropenmed. Parasit. 15, 29-37, 1964.
94. Schlesinger, W.R., Stollar, V., Guild, G.M., Igarashi, A., Shenk, T., Peleg, J.: The significance and nature of defective interfering viruses. Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss. 33, 229-242, 1977.

95. Sinnecker, R., Apitsch, L., Berndt, D., Sinnecker, H., Zilske, E.: Ueber weitere Zeckenezephalitis (ZE)-Virus-isolierungen in der DDR. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 223, 436-440, 1973.
96. Sixl, W., Batikova, M., Stünzner, D., Sekeyova, M., Sixl-Volgt, B., Gresikova, M.: Haemagglutination-inhibiting antibodies against Arboviruses in animal Sera, collected in some regions in Austria II. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 224, 303-308, 1973.
97. Slavik, J., Mayer, V., Mrena, E: Morphology of purified tick-borne encephalitis virus. Acta virol. 11, 66, 1967.
98. Slonim, D., Kramar, J.: Versuch der Uebertragung des Virus der tschechoslovakischen Zeckenezephalitis durch einige Mückenarten. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 165, 64-68, 1955.
99. Smetana, A.: On the transmission of tick-borne encephalitis virus by fleas. Acta virol. 9, 375, 1955.
100. Smith, C.E.G., McMahon, D.A., O'Reilly, K.J., Wilson, A.L., Robertson, J.M.: The epidemiology of Louping-ill in Ayrshire: the first year of studies in sheep. J. Hyg. 62, 53-68, 1964.
101. Smorodintsev, A.A.: Tick-borne springSummer encephalitis. Prog. Med. Virol. 1, 210-247, 1958.
102. Spless, H., Mumenthaler, M., Burkhardt, S., Keller, H.: Zentraleuropäische Enzephalitis (Zeckenezephalitis) in der Schweiz. Schweiz. med. Wschr. 99, 277-282, 1969.
103. Streissle, G.: Untersuchungen zur Uebertragung des Virus der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) durch die Zecke *Ixodes hexagonus* Leach. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. 179, 289-297, 1960.

104. Streissle, G.: Versuche zur Uebertragung des Virus der Fröhsummer-Meningoenzephalitis (FSME) durch Lederzecken. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. 182, 159-167, 1961.
105. Tongeren van, H.A.E.: Encephalitis in Austria IV. Excretion of virus by milk of the experimentally infected goat. Arch. ges. Virusforsch. 4 (2-3), 1955.
106. Traavik, T.: The first tick-borne encephalitis virus isolated from Norway. Acta path. microbiol. scand. Sect. B 86, 253-255, 1978.
107. Traavik, T.: Antibodies to tick-borne encephalitis virus in human sera from the western coast of Norway. Acta path. microbiol. scand. 87, 9-14, 1979.
108. Verani, P., Lopes, M.C., Ciufolini, M.G., Nicoletti, L., Amaducci, L., Fratiglioni, L., Paci, P., Leoncini, F., Balducci, M.: Studies on the occurrence of tick-borne encephalitis in Italy. Proc. int. symp.: new aspects in ecology of Arboviruses, Smolenice 1979, ed: Labuda, M. Calisher, C.H., 1980.
109. Voller, A., Bidwell, D.E., Barlett, A.: The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Flowline Publications, Guernsey, Europe, ISBN 0-906146-003, 1980.
110. Waldvogel, A., Matile, H., Wegmann, Ch., Wyler, R., Kunz, Ch.: Zeckenenzephalitis beim Pferd. Schweiz. Arch. Tierheilk. 123, 227-233, 1981.
111. Wandeler, A., Kunz, Ch., Steck, F.: Beobachtungen über die Zentraleuropäische Zeckenenzephalitis in der Schweiz. Path. Microbiol. 39, 35-36, 1973.

112. Wandeler, A., Steck, F., Fankhauser, R., Kammermann, B., Gresikova, M., Blascovic, D.: Isolierung des Virus der Zentraleuropäischen Zeckenzephalitis in der Schweiz. Schweiz. Path. Microbiol. 38, 258-270, 1972.
113. Westaway, E.G.: Replication of Flaviviruses. dans: The Togaviruses, Biology, Structure, Replication. ed: Schlesinger, R.W., Academic Press 1980.
114. W.H.O. Arbovirus and Human Disease. Techn. Rep. Ser. No. 369, 1967. Citée d'après McLean, D.M.: Virology in health care. Williams and Wilkins, Baltimore, U.S.A.
115. Williams, H., Thorburn, H.: Serum antibodies to Louping-ill virus. Scott. Med. J. 7, 353-355, 1962.
116. Wilson, M.B., Nakane, P.K.: Recent developments in the peroxidase method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. dans: Immunofluorescent and related staining techniques, ed: Knapp, W. Holnbar, K. Wick, G. Elsevier North-Holland Biochemical Press, 215, 1978.
117. Wyler, R., Schmidtke, W., Kunz, Ch., Radda, A., Henn, V., Meyer, R.: Zeckenzephalitis in der Region Schaffhausen: Isolierung des Virus aus Zecken und serologische Untersuchungen. Schweiz. med. Wschr. 103, 1487-1492, 1973.
118. Volken, R.H., Stopa, P.J.: Enzyme-linked fluorescence assay: Ultrasensitive solid-phase assay for detection of human rotavirus. J. clin. microbiol. 10, 317-321, 1979.
119. Zeipel von, G.: Isolation of viruses of the russian spring-summer encephalitis-louping-ill-group from swedish ticks and from a human case of meningoencephalitis. Arch. gesamte Virusforsch. 9, 460-469, 1959.

120. Zeipel von, G., Heigl, Z.: Experimental infection with tick-borne virus in *C. glareolus*, *A. flavicollis*, *A. sylvaticus* and *Mus musculus*. *Acta path. et microbiol. scandinav.* 68, 211-229, 1966.
121. Zilber, L.A.: Vernal (verno-aestival) endemic tick-borne encephalitis. *Arch. Biol. Nank* 56, 9-37, 1939, citée d'après Libikova, H.: *Virus der Zeckenzephalitis*, *Slovac. Akad. Sc.* 1969.