

FORMATION CONTINUE - ARTICLE DE SYNTHÈSE

Le diagnostic immunologique rapide des encéphalopathies spongiformes transmissibles

Pastoret P.P.¹, Gouffaux M.³, Saegerman C.⁴, Roels S.⁵, Dechamps P.⁴,
Thiry E.², Vanopdenbosch E.⁵.

¹ Immunologie – Vaccinologie

² Virologie - Épidémiologie

Faculté de Médecine vétérinaire B43b, Université de Liège
20, boulevard de Colonster - B-4000 Liège

³ Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire
Boulevard Simon Bolivar, 30 - B-1000 Bruxelles

⁴ Ministère des Classes Moyennes et de l'Agriculture
Administration de la Santé animale et de la Qualité des produits animaux (DG 5)
Services vétérinaires, Boulevard Simon Bolivar, 30 - B-1000 Bruxelles

⁵ Centre d'Etude et de Recherches Vétérinaires et Agrochimiques
Département de Biocontrôle, Groeselenberg, 90 - B-1180 Bruxelles

RESUME : La mise au point des tests rapides pour le diagnostic post mortem de l'encéphalopathie spongiforme bovine a rendu possible la généralisation du dépistage chez les bovins de plus de 30 mois admis à l'abattoir. Cet article décrit les tests immunologiques rapides et les mesures en vigueur en Belgique pour améliorer le contrôle.

INTRODUCTION

La transmissibilité de l'agent responsable de l'encéphalopathie spongiforme bovine à l'homme chez qui il provoque le nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob ne fait plus de doute (Pastoret et al., 1999 ; Zeidler et Ironside, 2000 ; Vanopdenbosch et al., 2000).

La maladie de Creutzfeldt-Jakob est une maladie rare qui fait actuellement l'objet d'une surveillance efficace partout dans l'Union européenne. En ce qui concerne la Belgique, il y a eu respectivement, 14 cas en 1998, 13 cas en 1999 et 7 cas entre le 1er janvier et le 30 septembre 2000; tous les cas appartenaient à la forme sporadique (Quoilin, 2000). Il n'y a donc, jusqu'à présent dans notre pays, aucun cas du nouveau variant de la maladie chez l'homme.

L'incidence de l'encéphalopathie spongiforme bovine est également très faible en Belgique, 19 cas depuis 1997 : 1 cas en 1997 (Vanopdenbosch et al., 1998), 6 cas en 1998 (Saegerman et al., 1999), 3 cas en 1999 (Saegerman et al., 2001) et 9 en l'an 2000. Une enquête menée en Suisse à l'aide d'un test de Western blotting réalisé sur prélèvement de tissu cérébral bovin a prouvé que la surveillance basée sur le seul examen clinique pouvait se révéler insuffisante (Schaller et al., 1999). En effet, ces auteurs ont pu démontrer l'existence d'animaux infectés de manière sub-clinique parmi ceux qui avaient été soumis à un abattage de nécessité et parmi ceux qui avaient été abattus par ordre parce qu'ils appartenaient à la cohorte de l'animal ayant présenté les signes cliniques de la maladie. Les résultats des programmes suisses de surveillance active indiquent que la protéine prion anormale protéase-

résistante PrP^{Sc}, marqueur de la contamination de l'ESB, a été retrouvée, par ordre décroissant d'importance, chez des bovins morts ou tués, chez d'autres animaux abattus en urgence pour des raisons diverses et chez des animaux apparemment sains et conduits à l'abattoir. Le nombre total de cas détectés par ce programme de surveillance active est aussi important que celui du programme de surveillance passive qui concerne les suspicions cliniques (Office vétérinaire fédéral, 1999). La réalisation de tests rapides de dépistage de l'ESB sur certaines catégories d'animaux à risque (abattages de nécessité, animaux destinés au clos d'équarrissage) a été également suggéré en Belgique (Saegerman et al., 1999). L'Union européenne s'apprêtait à mettre en œuvre pareilles enquêtes dans l'ensemble des Etats membres afin notamment de débusquer les pays qui ne déclaraient jusqu'à présent aucun

cas indigène mais qui, sur base de l'analyse géographique de risque pour la BSE, étaient classés en catégorie supérieure à la classe I (absence de risque). Les dernières décisions européennes imposent que tous les Etats membres testent, à l'aide d'un test immunologique rapide, tous les bovins âgés de plus de 30 mois au moment de l'abattage et destinés à la consommation, ainsi qu'un certain pourcentage d'animaux trouvés morts à la ferme et les abattages de nécessité, au plus tard à partir du 1er janvier 2001. La Belgique a débuté ce programme dès le 1er janvier 2001 ; les carcasses de bovins répondant à ces critères et qui ne seraient pas testées à cette date devront être détruites.

Trois tests immunologiques rapides ont jusqu'à présent été validés en Europe et peuvent être utilisés ; le choix de la Belgique s'est porté sur le test développé par le laboratoire du Centre de l'Energie Atomique (CEA) en France, commercialisé par la firme BIO-RAD. Ce test présente la même sensibilité que les deux autres. Cependant, il présente la détectabilité la plus élevée.

Après une brève description du principe des tests immunologiques rapides, cet article décrit les mesures mises en œuvre sur le terrain en Belgique afin de se conformer aux décisions prises par la Commission de l'Union européenne.

LES TESTS IMMUNOLOGIQUES RAPIDES DE DETECTION DE L'ENCEPHALOPATHIE SPONGIFORME BOVINE

Comme mentionné auparavant, plusieurs tests immunologiques rapides de détection de l'encéphalopathie spongiforme bovine sont actuellement validés et disponibles au niveau de l'Union européenne (Moynagh et Schimmel, 1999). Au départ, 4 tests ont été soumis aux épreuves de validation et seuls trois ont été retenus. D'autres sont actuellement en cours de validation dont celui éliminé au cours de la première évaluation mais amélioré depuis. Tous présentent fondamentalement les mêmes caractéristiques : ils sont basés sur la détection de la protéine prion anormale dans un homogénat tissulaire, après élimination enzymatique de la protéine prion normale. Ils fournissent un résultat rapide (dans les 24 à 48 heures), condition indispensable à la générali-

sation de leur emploi. Ils sont pratiqués après la mort de l'animal ou son abattage sur des prélèvements réalisés au niveau du système nerveux central des animaux (Obex du tronc cérébral), tissu potentiellement le plus riche en PrP^{sc} chez un animal contaminé (Venturini et al., 2000).

Les trois tests retenus par la Commission de l'Union européenne sont les suivants.

Test PRIONICS AG

Le test suisse Prionics est un test de Western blotting pour la détection de protéine prion anormale protéase-résistante. Un échantillon de tissu nerveux (0,5 g de tissu) est homogénéisé. L'homogénat obtenu est ensuite digéré à l'aide de protéinase K, bouilli en présence de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) et soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide. Après séparation, les protéines sont transférées sur membrane et la PrP^{sc} (PrP 27-30) est détectée grâce à l'anticorps monoclonal 6H4 par chemiluminescence. Le temps minimum requis pour l'ensemble du test est de 7 à 8 heures.

Test ENFER Ltd

Le test irlandais Enfer est un test ELISA de chemiluminescence qui peut être réalisé en l'espace de 4 heures et qui utilise un anticorps polyclonal anti PrP pour la détection. Le test consiste en une extraction rapide couplée à une technique ELISA relativement simple faisant intervenir un sérum polyclonal comme source primaire d'anticorps.

Test BIO-RAD (ancien test CEA)

Il s'agit d'un test ELISA sandwich pour la PrP^{sc} après une étape de dénaturation et une étape de concentration. Ce test fait intervenir deux anticorps monoclonaux. Le test nécessite moins de 24 heures pour être réalisé ; ce temps initial a été réduit à 4 heures par la firme BIO-RAD (Debecker et al., 2000). Des études comparatives demandées par la Commission européenne, il ressort qu'à spécificité, à sensibilité et à répétabilité égales, le troisième test (CEA/BIO-RAD), commercialisé sous le nom de "Platelia BSE" est celui qui a actuellement la limite de détection la plus élevée.

Motivation du choix de ce test en Belgique

Pour des raisons de facilité d'exécution en laboratoire, les tests faisant appel à la technique ELISA semblent plus adaptés : il s'agit des tests ENFER et BIO-RAD ; le test PRIONICS fait lui appel à une technique de Western Blotting beaucoup plus lourde à mettre en œuvre. Par contre, si l'on tient compte de la rapidité d'exécution, le test ENFER s'avère supérieur au test BIO-RAD. Malheureusement, le test ENFER fait encore appel à un anticorps polyclonal anti-PrP contrairement au test BIO-RAD qui utilise deux anticorps monoclonaux. Le fait d'utiliser un anticorps polyclonal est un sérieux désavantage, pour des raisons de standardisation et de disponibilité à plus long terme.

Sur la base de l'évaluation et de la validation des tests proposés pour l'Union européenne, le choix de la Belgique s'est porté sur le test ELISA CEA-BIO-RAD (dénommé Platelia BSE).

Non seulement d'une exécution facile, et dès lors aisément vulgarisable, il offre également des garanties de standardisation à long terme et a actuellement la plus grande détectabilité. L'utilisation exclusive d'anticorps monoclonaux (Williamson et al., 1998 ; Demart et al., 1999 ; Grassi et al., 2000) est un critère essentiel pour la détermination de ce choix.

CARACTERISTIQUES EPIDEMIOLOGIQUES DES TESTS IMMUNOLOGIQUES DE DETECTION RAPIDE

Les valeurs intrinsèques des tests actuellement reconnus par la Commission européenne sont les mêmes : leur sensibilité (capacité de déclarer positif un animal malade) et leur spécificité (capacité de déclarer négatif un animal sain) sont de 100 % ; ces valeurs ont été obtenues à partir d'un *échantillonnage* de 300 bovins infectés par l'ESB (cas *cliniques*) et 1000 bovins indemnes d'ESB. On peut calculer l'intervalle de confiance dans lequel se trouve, avec un risque d'erreur de 5 %, les véritables valeurs *dans toute la population* cible des bovins. Ainsi, la valeur réelle de la sensibilité est comprise entre 99 et 100 % et de la spécificité, comprise entre 99,7 et 100 % (Commission

européenne, 1999); aussi, la probabilité d'observer des résultats faussement positifs ou négatifs n'est pas nulle. Il est donc prévu que tous les résultats positifs à un test de dépistage soient confirmés par les tests conventionnels (examen histopathologique, immunohistochimique ou mise en évidence des fibrilles caractéristiques au microscope électronique de transmission).

La Belgique a opté pour le test CEA qui a la limite de détection la plus élevée (capacité de détection maximale après dilution progressive d'un échantillon positif). La valeur prédictive d'un résultat positif (probabilité qu'un individu donnant une réponse positive appartienne effectivement à la population d'animaux malades ; VPP) et la valeur prédictive d'un résultat négatif (probabilité qu'un individu donnant une réponse négative appartienne effectivement à la population d'animaux indemnes ; VPN) peuvent être calculées, en fonction des limites inférieures de sensibilité et de spécificité du test immunologique rapide et de la prévalence de l'ESB. Si une prévalence de 7 cas cliniques par million de bovins âgés de plus de 30 mois est posée, selon

l'incidence annuelle observée en 2000 (Saegerman et al., 2001), la valeur prédictive d'un résultat positif est très faible (0,000209) et la valeur prédictive d'un résultat négatif est très élevée (0,999999). Du 1^{er} janvier au 3 mai 2001, 98651 bovins abattus âgés de plus de 30 mois ont été analysés avec le test Bio-Rad (Platelia BSE) en vue d'établir un diagnostic rapide d'ESB. Parmi ceux-ci, 11 résultats positifs ont été observés (communiqué par l'Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire, 30 mars 2001). Ces résultats positifs ont été confirmés par un ou plusieurs tests conventionnels et correspondaient tous à des cas subcliniques d'ESB ou au moins sans signes cliniques typiques. En posant comme hypothèses que, d'une part, l'échantillonnage constitue une estimation de la prévalence des cas subcliniques d'ESB (soit 1 bovin sur 10000 bovins âgés de plus de 30 mois) et que, d'autre part, la sensibilité du test est égale à 70 % (valeur délibérément choisie, inférieure à celle annoncée si celle-ci avait été calculée sur base d'une population d'animaux infectés subcliniques), la VPP est égale à 0,002328 et la VPN

égale 0,999969. Les valeurs prédictives sont assez comparables dans les deux cas de figure envisagés. Sur base du résultat du test obtenu, la probabilité de conclure à tort qu'un " animal est infecté " (1-VPP) est élevée et la probabilité de conclure à tort qu'un " animal est indemne " (1-VPN) est faible. Bien que le risque "zéro " n'existe pas (probabilité non nulle d'observer des résultats faussement négatifs), la stratégie utilisée permet de donner le maximum de garantie au consommateur. Le retrait des matériels à risque spécifiés (en application depuis février 1998 en Belgique) est une autre mesure qui donne des garanties supplémentaires au consommateur. Le tableau 1 nous donne les résultats enregistrés dans l'Union européenne jusque fin mars 2001.

Tableau I : BSE testing. Cumulative table from January to March 2001.

	Adult cattle ¹ (in million)	BSE Suspect Animals ²		Risk Animals ³		Healthy Animals ⁴		BSE Eradication ⁵	
		Nr	Positive (pending)	Nr	Positive (pending)	Nr	Positive (pending)	Nr	Positive (pending)
Belgique/België	1,5	79	1	1280	0	69798	7	537	0 (200)
Danmark	0,9	39	1 (9)	3438	0	63026	0	1309	1
Deutschland⁶	6,6	88	2	40043	20	211746	10 (25)	4161	2
Ellas	0,3	2	0	100	0	1968	0	0	0
Espana⁶	3,4	29	4 (1)	2906	9 (81)	32899	17 (346)	764	0
France	11,0	229	35	12696	12	459649	15	502	0
Ireland⁶	3,4	111	30 ^b	1185	3 (1)	51731	0	1499	0
Italia	3,4	1	0	GB4937	3	27279	2	0	0
Luxembourg	0,1	11	0	640	0	3765	0	0	0
Nederland	1,8	55	0	9797	4	92746	2	557	0
Österreich	1,0	0	0	2455	0	45376	0	0	0
Portugal	0,8	376	35 (32)	913	2 (9)	194	0 (23)	917	0
Suomi-Finland	0,4	1	0	2821	0	715	0	0	0
Sverige	0,7	4	0 (3)	5823	0	0	0	0	0
United Kingdom⁶	5,3	196	77 (92)	580	3 (43)	17 ⁷	0	0 ⁷	0
Total	40,8	1221	185 (137)	89614	56 (134)	1060909	53 (394)	10246	3 (200)

(1) Source : Eurostat;

(2) Animals reported as BSE clinical suspects;

(3) Dead-on-farm animals, emergency slaughtered animals, animals sent for normal slaughter but found sick at ante mortem inspection

(4) Healthy animals subject to normal slaughter

(5) Birth and rearing cohorts, feed cohorts, offspring of BSE cases, animals from herds with BSE

(6) Data at the end of February

(7) GB only

REGLEMENTATIONS DE LA COMMISSION EUROPEENNE

Diverses réglementations européennes sont venues récemment compléter le dispositif en vigueur en matière d'épidémiologie des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST). Ces textes complètent, par l'organisation d'un dépistage obligatoire de la maladie avec des tests de diagnostic rapides, un dispositif de surveillance fondé jusqu'alors essentiellement sur l'épidémiologie clinique, encore qualifiée de "passive".

Ces textes sont les suivants :

1. Décision 2000/764/CE de la Commission du 29 novembre 2000 relative au dépistage de l'encéphalopathie spongiforme bovine chez les bovins et modifiant la décision 98/272/CE relative à la surveillance épidémiologique des encéphalopathies spongiformes transmissibles. (*Journal officiel* n° L 305 du 06/12/2000 p. 0035 – 0038).

2. Décision 2001/8/CE de la Commission du 29 décembre 2000 modifiant la Décision 2000/764/CE relative au dépistage de l'encéphalopathie spongiforme bovine chez les bovins et mettant à jour l'annexe IV de la décision 98/272/CE relative à la surveillance épidémiologique des encéphalopathies spongiformes transmissibles. (*Journal officiel* n° L 2 du 05/01/2001 p. 0028 – 0031).

Ces deux Décisions instaurent dans tous les Etats membres, à partir du 1er janvier 2001, un dépistage obligatoire de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) par la mise en œuvre de tests de diagnostic rapides :

1. sur tous les bovins âgés de plus de 30 mois soumis à un abattage spécial d'urgence ou abattus alors qu'ils présentent une maladie transmissible à l'homme ou aux animaux, ou encore une maladie ou une perturbation de leur état général susceptible de rendre leurs viandes impropres à la consommation humaine ;
2. sur un échantillonnage représentatif de la population des bovins de plus de 30 mois morts à la ferme

ou pendant le transport mais non abattus pour la consommation humaine.

Les viandes, les abats et les déchets animaux provenant des animaux testés doivent être gardés sous contrôle en l'attente des résultats. Les viandes ne peuvent recevoir l'estampille attestant qu'elles sont propres à la consommation humaine que si le résultat du test est favorable.

Il est aussi prévu que, à partir du 1^{er} juillet 2001, tous les bovins de plus de trente mois présentés à l'abattage normal pour la consommation humaine soient soumis aux tests de diagnostic rapides. Toutefois le nombre d'animaux à examiner sera, le cas échéant, modifié sur base d'une évaluation des résultats des tests rapides pratiqués jusqu'au 1^{er} juin 2001. La Belgique a anticipé cette décision et ce programme a débuté dès le 1^{er} janvier 2001.

3. Règlement (CE) N° 2777/2000 de la Commission du 18 décembre 2000 arrêtant des mesures de soutien exceptionnelles en faveur du marché de la viande bovine. (*Journal officiel* n° L 321 du 19/12/2000 p. 0047 – 0051).

Bien que relevant de la réglementation de la régulation du marché communautaire de la viande bovine, ce texte n'est pas sans conséquence sur le dispositif d'épidémiologie.

En effet, ce Règlement précise que les viandes issues de bovins âgés de plus de 30 mois et abattus après le 1^{er} janvier 2001 ne peuvent être autorisées pour la consommation humaine que si elles ont donné un résultat négatif au test de diagnostic rapide de dépistage de l'ESB. La Communauté européenne participe au financement de ces tests, à l'exception de ceux pratiqués sur les animaux visés aux Décisions évoquées aux points 1 et 2.

Le Règlement spécifie encore que, à partir de la même date, avec l'aide financière de l'Union européenne et moyennant le respect de multiples exigences, les Etats membres achètent en vue de leur mise à mort et de leur destruction, sans qu'ils ne soient obligatoirement soumis au test de diagnostic rapide, les bovins âgés de

plus de 30 mois qui sont présentés à cette fin par leur producteur, pour autant qu'ils aient séjourné au moins 6 mois sur le territoire de l'Etat membre concerné.

Des dérogations à l'obligation visée à l'alinéa précédent peuvent être accordées aux Etats membres qui peuvent démontrer l'existence d'une capacité suffisante pour soumettre aux tests de diagnostic rapides la production normale pour l'abattage de bovins de plus de 30 mois. La Belgique a introduit un dossier faisant état de cette capacité mais sa demande de dérogation n'a pas jusqu'ici rencontré un accueil favorable auprès de la Commission.

Les animaux présentés en vue de leur mise à mort dans ce régime sont soumis au préalable à un examen sanitaire par un vétérinaire officiel visant notamment à déterminer s'ils doivent être considérés comme suspects d'ESB. Si c'est le cas, ils sont soumis aux mêmes procédures de déclaration obligatoire et de diagnostic que les animaux suspects détectés lors de l'examen sanitaire précédant un abattage aux fins de consommation humaine.

Les animaux mis à mort dans ce régime sont cependant soumis au test de diagnostic rapide s'ils font l'objet d'un abattage spécial d'urgence ou s'ils sont abattus alors qu'ils présentent une maladie transmissible à l'homme ou aux animaux, ou encore une maladie ou une perturbation de leur état général susceptible de rendre leurs viandes impropres à la consommation humaine.

APPLICATION DES MESURES EN BELGIQUE.

Les réglementations européennes décrites au point précédent ont été transposées dans le droit belge (arrêtés royaux des 18 décembre 2000 et 19 janvier 2001 modifiant l'arrêté royal du 17 mars 1997 organisant la surveillance épidémiologique des encéphalopathies spongiformes transmissibles chez les ruminants). Elles ont également été promulguées par voie de circulaires ministérielles ou administratives, lesquelles portent

généralement diverses modalités d'application.

Les mesures actuellement en vigueur dans le pays sont les suivantes.

Celles qui concernent **la surveillance épidémiologique clinique** des EST à l'abattoir ont fait l'objet d'une description détaillée dans une précédente publication (Pastoret et al., 1999).

Pour rappel, elles reposent sur le fait que tout animal de boucherie est soumis avant l'abattage à un examen sanitaire *ante mortem* par un vétérinaire. En principe, cet examen est réalisé dans un abattoir par un expert de l'I.E.V., mais, en cas d'abattage de nécessité, il peut être réalisé en dehors d'un abattoir par un vétérinaire agréé (vétérinaire d'exploitation, vétérinaire de contrôle) ; celui-ci délivre un document " I.E.V. 20 " dans lequel il mentionne ses constatations à l'intention de l'expert, en vue de l'expertise *post mortem*.

L'examen sanitaire avant l'abattage a notamment pour but de déterminer si l'animal doit être considéré comme suspect d'être atteint d'une EST, maladie à déclaration obligatoire.

Sont considérés comme suspects d'être atteints, les ruminants âgés de plus de douze mois :

1. qui présentent des signes cliniques nerveux évoquant une EST ou ne pouvant être attribués de façon certaine à une étiologie autre qu'une EST ;
2. qui sont morts de cause indéterminée, qui présentent une pathologie progressive débilante et résistante aux traitements, ou encore qui ont été abattus sans document I.E.V. 20 alors que celui-ci était obligatoire, c'est-à-dire chaque fois qu'un examen sanitaire *ante mortem* n'est pas effectué par un expert.

L'expertise de ces animaux suspects est interdite. Après avertissement de l'inspecteur des Services vétérinaires du Ministère des Classes Moyennes et de l'Agriculture, ces animaux sont transférés via le Centre Expérimental de Machelen au Centre d'Etude et de Recherches Vétérinaires et Agrochimiques (C.E.R.V.A.), laboratoire national de référence pour les EST, en vue d'un diagnostic officiel.

Le dépistage de l'ESB par les tests de diagnostic rapides, encore qualifié d'épidémiosurveillance "active", est programmé indépendamment de la procédure spéciale applicable aux animaux suspects et décrite ci-dessus.

Il est organisé comme suit depuis le 1^{er} janvier 2001.

Les bovins âgés de plus de 24 mois (en lieu et place des 30 mois proposés par la Commission européenne) morts autrement que par abattage aux fins de consommation humaine font l'objet d'un dépistage réalisé sur un échantillonnage de bovins choisis au hasard au clos d'équarrissage (Firme RENDAC à Denderleeuw). La taille de l'échantillon est fixée pour chaque Etat membre par la Décision 2000/764/CE précitée, sur base de la taille population bovine âgée de plus de 30 mois. Pour la Belgique, la taille de cet échantillon est fixé à 3.000 animaux par an.

Les bovins âgés de plus de 24 mois (en lieu et place des 30 mois proposés par la Commission européenne) abattus pour cause de nécessité font l'objet du dépistage aussitôt après l'abattage, quelles que soient les conditions ayant justifié l'abattage de nécessité.

Les bovins âgés de plus de 30 mois abattus aux fins de consommation humaine ne peuvent être déclarés propres à la consommation que s'ils ont été soumis aussitôt après l'abattage à un test de diagnostic rapide de dépistage de l'ESB dont le résultat est favorable.

L'âge des animaux concernés est déterminé sur base de la date de naissance mentionnée au passeport SANITEL. Au clos d'équarrissage, une première sélection s'opère par l'observation du nombre de dents d'adulte.

En raison du risque de propagation de l'agent responsable de l'ESB par voie sanguine, tous les bovins qui ont fait l'objet d'une spinalisation (" jonchage ") après l'étourdissement sont d'office assimilés à un animal suspect d'EST.

Les analyses de laboratoire inhérentes aux tests de diagnostic rapides sur les animaux au clos d'équarrissage sont réalisées par le C.E.R.V.A. ;

les autres sont réalisées par des laboratoires accrédités, agréés à cette fin par le Ministre qui a la santé publique dans ses attributions. Cependant, le CERVA est le seul organisme qui puisse confirmer les résultats douteux ou positifs et habilité à poser le diagnostic d'ESB.

Les tests de diagnostic rapides sont réalisés selon la méthode BIO-RAD, décrite plus haut.

Les modalités de l'échantillonnage par les experts de l'I.E.V. (prélèvement, identification, conditionnement, emballage, stockage, transport) ont été déterminées par voie de circulaire ministérielle.

L'organisation de la collecte des échantillons, leur répartition entre les laboratoires agréés et la gestion des résultats des tests de diagnostic rapides effectués sur les bovins abattus dans les abattoirs sont assurés par une "Cellule de crise ESB" créée au sein de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire. Les laboratoires transmettent les résultats à cette Cellule, qui transmet à son tour les résultats négatifs aux experts dans les abattoirs et les résultats positifs aux responsables des Administrations concernées.

En cas de résultat négatif, les viandes peuvent être livrées à la consommation humaine.

En cas de résultat positif, il s'ensuit des conséquences tant à l'abattoir que dans les exploitations agricoles d'origine et de provenance.

A l'abattoir.

L'identification de la carcasse et de la tête du bovin est vérifiée ; les données relatives à la classification SEUROP de la carcasse sont recueillies afin de servir de base à une éventuelle indemnisation au cas où le résultat s'avérerait faussement positif. La carcasse, la tête, les autres abats et les déchets animaux provenant de l'animal concerné, de même que ceux provenant d'animaux dont le test est négatif mais entreposés à leur contact, sont dénaturés sous la surveillance de l'expert puis remis à une usine agréée en vue de leur destruction par incinération.

Si d'autres bovins soumis au test de dépistage par les tests de diagnostic rapides âgés de plus de 30 mois provenant de la même exploitation ont été abattus en même temps que l'animal positif, ces carcasses sont placées sous saisie conservatoire. L'appartenance éventuelle de ces animaux à la cohorte de naissance du bovin positif (*c'est-à-dire les bovins nés pendant la période comprise entre les douze mois qui précèdent et les douze mois qui suivent la naissance du bovin positif, dans les troupeaux où ledit bovin a séjourné au cours de la première année de sa vie*) est ensuite vérifiée. Si ces bovins n'appartiennent pas à la cohorte de naissance de l'animal positif, et si le test rapide qu'ils ont subi est négatif, les viandes peuvent être livrées à la consommation humaine. Si les bovins appartiennent à la cohorte de naissance de l'animal positif, les carcasses sont maintenues sous saisie conservatoire jusqu'à obtention du résultat d'un second test rapide exécuté par le C.E.R.V.A.. Si le résultat de ce test est négatif, les viandes peuvent être livrées à la consommation humaine.

Dans les exploitations agricoles.

L'Inspecteur vétérinaire mène une enquête épidémiologique visant à identifier les troupeaux dans lesquels le bovin positif a séjourné depuis sa naissance.

Jusqu'à obtention du résultat des tests conventionnels de confirmation, ces exploitations sont placées sous suspicion d'ESB. Toutefois, elles ne doivent pas être mises sous surveillance si toutes les conditions suivantes sont remplies :

- la bête bovine positive n'y a séjourné que durant les 12 derniers mois avant l'abattage ;
- la bête bovine positive n'y a pas vêlé, ni servi de donneur pour la récolte d'embryons ;
- n'y séjournent pas d'autres bovins originaires du troupeau dans lequel la bête bovine positive est née ou a séjourné pendant les 12 premiers mois de sa vie.

Les bovins appartenant à la cohorte de naissance de la bête bovine positi-

ve se voient attribuer par le Ministère des Classes Moyennes et de l'Agriculture un "antécédent SANITEL". Dans cette cohorte, les bovins encore vivants et âgés de moins de 30 mois sont placés sous saisie conservatoire et bloqués dans SANITEL.

Pour les bovins dont le test de diagnostic rapide est positif, le C.E.R.V.A. exécute un nouveau test de diagnostic rapide et effectue les 3 tests classiques.

Si le résultat du test rapide réalisé au C.E.R.V.A. est négatif, les mesures peuvent être levées dans les exploitations placées sous surveillance.

Lorsque le résultat du test de diagnostic rapide au C.E.R.V.A. est positif et que les résultats des tests classiques sont négatifs, les bovins de la cohorte de naissance âgés de moins de 30 mois restent sous saisie conservatoire jusqu'à ce qu'ils atteignent cet âge ; leurs passeports sont estampillés avec un cachet spécial. Ces bovins ne peuvent quitter l'exploitation que pour être abattus dans le pays et soumis à un test de diagnostic rapide. Les viandes ne peuvent être livrées à la consommation humaine que si le résultat du test est négatif.

Quand ces bovins atteignent l'âge de 30 mois, ils sont débloqués dans SANITEL, car ils devront de toute façon être soumis à un test de diagnostic rapide après l'abattage.

Si le résultat d'un des tests classiques est positif, l'animal est déclaré atteint d'ESB et les mesures d'éradication décrites dans de précédentes publications sont mises en œuvre dans les exploitations d'origine et de provenance (Vanopdenbosch et al., 1998 ; Saegerman et al., 1999).

CONCLUSIONS

L'application des décisions européennes en matière de détection des bovins infectés par l'agent responsable de l'encéphalopathie spongiforme bovine ne pose pas de problème en Belgique. En effet, en complément du CERVA, 13 laboratoires accrédités ont déjà été sélectionnés en date du 30 avril 2001. Ce réseau de laboratoires permettra de faire face à la demande du marché national.

Il faut cependant remarquer que ces mesures de détection destinées à donner les meilleures garanties actuellement disponibles de salubrité alimentaire aux consommateurs doivent impérativement être associées à une épidémiosurveillance clinique de grande qualité.

D'autres tests sont actuellement en cours d'élaboration (Fischer et al., 2000) et un nouvel appel d'offre a été lancé par la Commission de l'Union européenne. Les qualités recherchées pour ces nouveaux tests sont, d'une part, une meilleure détectabilité et, d'autre part, la capacité de distinguer une infection due à un agent de la tremblante ou à l'agent responsable de l'ESB.

Il faut également garder à l'esprit que les tests actuellement retenus même s'ils donnent les meilleures garanties disponibles aux consommateurs, ne permettent cependant pas de certifier qu'une carcasse est indemne de toute contamination.

SUMMARY

Rapid immunological diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies.

The development of rapid tests for the post mortem diagnosis of bovine spongiform encephalopathy made possible to extend the detection to bovine carcasses older than 30 months in slaughterhouses. This article reviews the rapid immunological tests and the measures enforced in Belgium to improve the control.

BIBLIOGRAPHIE

- DEBECKER D., ROELS S., VANOPDENBOSCH E. BSE-onderzoek : opsoren van PrPres door middel van de BIO-RAD platelia BSE kit. *Vi. Dierg. Tijdschrift*, 2000, **69**, 382-384.
- Décision de la Commission du 29 novembre 2000 relative au dépistage de l'encéphalopathie spongiforme bovine chez les bovins et modifiant la décision 98/272 CE relative à la surveillance épidémiologique des encéphalopathies spongiformes transmissibles. *Journal officiel des Communautés européennes*, L305/35 du 06/12/2000.
- Décision de la Commission du 30 novembre 2000 portant approbation des programmes de surveillance de l'ESB présentés par les Etats membres pour l'année 2001 et fixant le montant de la participation financière de la Communauté. *Journal Officiel des Communautés européennes* L308/35 du 08/12/2000.
- DEMART S., FOURNIER J.G., CREMINON C., FROBERT Y., LAMOURY F., MARCE D., LASMEZAS C., DORMONT D., GRASSI J., DESLYS J.P. New insight into abnormal prion protein using monoclonal antibodies. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1999, **265**, 652-657.
- FISCHER M.B., ROECKI C., PARIZEK P., SCHWARZ H.P., AGUZZI A. Binding of disease-associated prion protein to plasminogen. *Nature*, 2000, **408**, 479-483.
- GRASSI J., CREMINON C., FROBERT Y., FRETIER P., TURBICH I., REZAEI H., HUNSMANN G., COMOY E., DESLYS J.P. Specific determination of the proteinase K-resistant form of the prion protein using two-site immunometric assays. Application to the post-mortem diagnosis of BSE. *Arch. Virol.*, 2000, **16**,
- OFFICE VETERINAIRE FEDERAL. Rapports sur la santé de l'animal et de l'homme, Centre d'information sur la santé en Suisse, 1999, **4**, 10-12.
- MOYNAGH J., SCHIMMEL H. Test for BSE evaluated. *Nature*, 1999, **400**, 105.
- QUOILIN S. Réseau de surveillance de la maladie de Creutzfeldt-Jakob en Belgique. Rapport annuel 1999 pour la Commission Creutzfeldt-Jakob. Document D/2000/2505/42, 38 pages.
- PASTORET P.P., GOUFFAUX M., THIRY E. Le point sur l'encéphalopathie spongiforme bovine et le nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob chez l'homme – les implications en santé publique et en réglementation de l'inspection des viandes. *Ann. Méd. Vét.*, 1999, **143**, 313-320.
- Preliminary report The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines. 8 July, 1999. European Commission, Directorate General XXIV consumer policy and consumer health protection. Directorate B-scientific health opinions, Unit B3. Management of Scientific committee.
- SAEGERMAN C., DECHAMPS P., VANOPDENBOSCH E., ROELS ST., PETROFF K., DUFÉY J., VAN CAENESEM G., DEVRIESE D., VAREWYCK H., DECRAEMERE H., DESMEDT I., CORMANN A., TORCK G., HALLET L., HAMELRIJCKX L., LEE-MANS M., VANDERSANDEN A., PEHARPRE D., BROCHIER B., COSTY F., MULLIER PH., THIRY E., PASTORET P.P. Epidémiologie-surveillance de l'encéphalopathie spongiforme bovine en Belgique : bilan de l'année 1998. *Ann. Méd. Vét.*, 1999, **143**, 423-436.
- SAEGERMAN C., DECHAMPS P., ROELS S., PETROFF K., GEEROMS R., TORCK G., DUFÉY J., FOUREZ R., HAMELRIJCKX M., CORMANN A., VIATOUR P., DE CONINCK V., LOMBA F., VERMEERSCH J.-P., HALLET L., LHOST O., LEE-MANS M., VANDERSANDEN A., PEHARPRE D., BROCHIER B., COSTY F., PASTORET P. -P., THIRY E., VANOPDENBOSCH E. Epidémiologie-surveillance de l'encéphalopathie spongiforme bovine en Belgique : bilan de l'année 1999. *Ann. Méd. Vét.*, 2001, **145**, 47-58.
- SAEGERMAN C., CLAES M., ROELS S., DECHAMPS P., HALLET L., DELUYKER H., PASTORET P.-P., VANOPDENBOSCH E., THIRY E. L'encéphalopathie spongiforme bovine en Belgique : un système intégré de détection. Symposium de l'AESA, Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège, 16 mars 2001, In *Proceedings*, 50-54.
- SCHALLER O., FATZER R., STACK M., CLARK J., COOLEY W., BIFFIGER K., EGLI S., DOBERR M., VANDELVELDE M., HEIM D., OESCH B., MOSER M. Validation of a Western immunoblotting procedure for bovine PrP^{Sc} detection and its use as a rapide surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Acta. Neuropathol.*, 1999, **98**, 437-443.
- VANOPDENBOSCH E., DECHAMPS P., DUFÉY J., ROELS ST., MULLIER P., HALLET L., BROCHIER B., COSTY F., CHARLIER G., SAEGERMAN C., PASTORET P.P. Le premier cas d'encéphalopathie spongiforme bovine diagnostiqué en Belgique. *Ann. Méd. Vét.*, 1998, **142**, 111-118.
- VANOPDENBOSCH E., ROELS S. BSE en variant CJZ : nieuwe inzichten en achtergrondinformatie. *Vi. Dierg. Tijdschrift*, 2000, **69**, 371-376.
- VENTURINI M., SIMOENS P., DE JAEGER C. Obductie van runderhersenen voor het BSE-onderzoek. *Vi. Dierg. Tijdschrift*, 2000, **69**, 377-381.
- WILLIAMSON R.A., PERETZ D., PINILLA C., BALL H., BASTIDAS R.B., ROZENSHTAYN R., HOUGHTEN R.A., PRUSINER S.B., BURTON D.R. Mapping the prion protein using recombinant antibodies. *J. Virol.*, 1998, **72**, 9413-9418.
- ZEIDLER M., IRONSIDE J.W. The new variant of Creutzfeldt-Jakob disease. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2000, 19(1), 98-120.