

Illustrations de la couverture extraites de la « Revue Vétérinaire », éditée en 1958  
par la Fédération de lutte contre les maladies animales du Hainaut.



**UNIVERSITE DE LIEGE**

**FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE**

**Département des maladies infectieuses et parasitaires  
Service de virologie, épidémiologie et pathologie des maladies virales**

**EPIDÉMIOSURVEILLANCE DES ÉVÉNEMENTS RARES CHEZ LES  
BOVINS EN BELGIQUE**

**EPIDEMIOSURVEILLANCE OF RARE EVENTS IN BELGIAN CATTLE**

**Claude SAEGERMAN**

**THESE PRESENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE  
DE DOCTEUR EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES  
Orientation médecine vétérinaire**

**ANNEE ACADEMIQUE 2004-2005**

© Presses de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège & Claude Saegerman

4000 Liège (Belgique)

Toute reproduction d'un extrait quelconque de ce livre,  
hors des limites restrictives prévues par la loi,  
par quelque procédé que ce soit, et notamment par photocopie ou scanner,  
est strictement interdite pour tous pays.

Imprimé en Belgique

D/2004/0480/32

ISBN 2-930404-02-7



9 782930 404028

*“Ce que mon esprit élabore n’a pas de valeur  
tant que la nature que j’interroge ne m’a pas dit si j’avais raison ou tort”*

*Christian de Duve, 2002*

Au terme de cette thèse, les mots justes sont difficiles à trouver pour exprimer mes remerciements et décrire mes sentiments.

Parmi tous ceux qui ont contribué à l'accomplissement de cette thèse, je rends un vivant hommage aux trois membres de mon Comité de thèse qui ont accepté de superviser ce travail multidisciplinaire et atypique. Un tout grand merci à Etienne Thiry qui a accepté d'en être le promoteur. Ses conseils, ses encouragements, et sa confiance ont contribué à la réussite du projet. Un merci particulier à Jean-Jacques Letesson qui m'a accueilli au Centre d'étude de la brucellose. Depuis lors, celui-ci s'est transformé en une Unité de recherche en biologie moléculaire. Merci pour ta confiance, ton ouverture d'esprit, la liberté d'action et l'aide prodiguée. Un tout grand merci à Dirk Berkvens qui a toujours été disponible et à l'écoute de mes questions. Tu m'as aidé à trouver le bon chemin pour aboutir à une solution statistique et biologique solide, le tout en soignant un environnement propice à la réflexion (Pink Floyd). Un grand merci pour le temps consacré et pour m'avoir ouvert l'esprit à d'autres statistiques moins classiques.

J'exprime ma profonde reconnaissance aux nombreux responsables sanitaires de troupeaux bovins et aux vétérinaires praticiens qui ont toujours accepté, sans aucune condition, de participer aux investigations complémentaires proposées. Sans vous ce travail d'interface « terrain-recherche » n'aurait jamais été possible. Un merci particulier à Frans Moreau, Jean-Marie Lecomte et Patrick Moutschen.

Je remercie tout particulièrement Laurence Dewaele et Dominique Gilson qui ont assuré une partie importante du travail expérimental de cette thèse concernant la brucellose bovine sous la supervision magistrale de Joseph Limet et de Jean-Jacques Letesson.

J'ai été très content de pouvoir travailler avec Niko Speybroeck (ITG, Antwerpen) dans le cadre du développement d'un arbre de décision clinique.

Je souhaite remercier Leen Claes qui m'a aidé, sans compter, à visiter une partie des laboratoires de diagnostic vétérinaire en Belgique dans le cadre de l'étude rétrospective d'incidence des troubles à expression nerveuse. J'associe mes remerciements à Patrick Biron lorsqu'il dirigeait le Centre de coordination et du diagnostic vétérinaire. Geachte Collega's, hartelijke bedankt voor uw medewerking.

Merci à Alfred Bernard et Fabrice Broeckert de l'Unité de toxicologie industrielle de l'UCL pour les discussions constructives à propos des contaminations PCBs/dioxines.

Un merci particulier à tous les membres de l'Association centrale de santé animale regroupée maintenant au sein de l'Agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire. Merci pour les risques partagés, pour l'assistance sans faille, pour votre compréhension prononcée du terrain.

Je souhaite remercier tous mes compagnons de lutte contre les maladies bovines, en particulier, Paul Matholet (†), Jacques Dufey, Pierre Thiange, Jean-Pierre Vermeersch, Etienne Matagne, Bernard Limbourg (†), Gilles Maquet, Guy Czaplicki, Emile Paquay (†), Paul Mullier, Pierre Dechamps, Gabrielle Conotte, Dominique Clobert, Nicolas Petit et Grégory Thiry.

Je remercie Jean-Michel Verralewyck, Vincent Monfort, et Jean-Marie Robijns qui ont rédigé les scripts informatiques complexes nécessaires à l'extraction de données SANITEL. Le résultat a toujours été égal ou supérieur à mes attentes. J'associe également ces remerciements à Jean-Yves Houtain et Guy Torck pour les conseils judicieux en Access et à Alain Leroy pour la conversion de certains fichiers informatiques.

Merci à tous ceux que j'ai rencontrés au Centre d'étude de la brucellose des FUNDP et en particulier : Jean-Jacques Letesson, Joseph Limet, Laurence De Waele, Dominique Gilson, Kim Vo, Vincent Weynants, Anne Tibor, Philippe Denoël, Karl Walravens, Anne Mager et Christian Didembourg.

Je remercie également tous mes collègues et complices du CERVA, en particulier, Jacques Godfroid, Karl Walravens, Hein Imberechts, Emmanuel Vanopdenbosch, Stefan Roels, Marc Dispas, Frank Boelaert, Kris De Clercq, Frank Koenen, Pierre Kerkhofs, Thierry van den Berg, Katjia Knapen, Guy Meulemans, Jean-François Lonneux, Patrick Michel et Christel De Smedt pour les discussions stratégiques sur les maladies animales et le support donné dans le cadre de mes investigations de terrain.

J'adresse mes remerciements également à mes collègues de l'Institut scientifique de Santé publique, en particulier Bernard Brochier et Françoise Costy.

Je n'oublie pas l'équipe du laboratoire de pathologie et d'immunologie de Tours-Nouzilly (INRA), en particulier Gérard Dubray, Jean-Michel Verger, Axel Cloeckert

et Jean-Luc Delonnay. Merci d'avoir partagé votre expérience de l'intradermoréaction et des infections expérimentales des bovins par *Brucella abortus*.

Je remercie le Docteur Bruno Garin-Bastuji de m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de référence de l'OIE pour les brucelloses dans le cadre de l'obtention du diplôme d'épidémiologie animale appliquée à l'ENV de Maisons-Alfort. J'associe ces remerciements à Pascal Pelzer (GDS des Ardennes, France) avec qui j'ai eu le plaisir de travailler.

Je remercie les Professeurs Albert Dewaele (ULg, Liège), Ferdinand Coignoul (ULg, Liège) et le Professeur Ric Ducatelle (RUG, Gent) de m'avoir permis d'accéder à des prélèvements historiques en ce qui concerne l'étude rétrospective d'incidence des troubles d'expression nerveuse.

Je remercie tous mes collègues du Secrétariat du Comité Scientifique de l'AFSCA : Luc Mohimont, Jeannine Pensaert, Agnès Clairbois, Frank Boelaert, Ilse Van Vlaenderen, Karen Vereecken, Sigrid Van Boxstael et Valérie Vromman. Un merci tout particulier à Luc Mohimont qui a partagé sa passion pour les risques chimiques. Je remercie également tous les membres du Comité scientifique de l'AFSCA pour les discussions enrichissantes auxquelles j'ai eu l'honneur de participer.

Je remercie tous mes professeurs des Facultés universitaires Notre-Dame de la Paix à Namur et de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège pour l'enseignement prodigué. Je remercie également tous les professeurs et autres experts scientifiques extérieurs de l'ENV Maisons-Alfort pour les formations dispensées en épidémiologie animale appliquée et en analyse des risques.

Je souhaite remercier tous les membres de l'Association d'épidémiologie et de santé animale (AESA), de l'Association pour l'étude de l'épidémiologie des maladies animales (AEEMA, France) et de la Société royale namuroise de médecine vétérinaire (SRNMV). Les discussions constructives auxquelles j'ai pu participer m'ont permis de développer un esprit confraternel et convivial tout en développant de nouveaux concepts.

J'exprime ma profonde gratitude aux étudiants que Jean-Jacques Letesson a accepté de me confier depuis plusieurs années dans le cadre du cours d'épidémiologie animale appliquée. Leurs regards et les questions posées ont toujours été pour moi un vivifiant stimulant et ont suscité une continuelle remise en question.

Merci aussi à Sophie Quoilin (ISSP, Belgique), Baert Van Everbroeck (Universiteit van Antwerpen), Didier Calavas (AFSSA, France), Géraldine Cazeau (AFSSA, France), Christian Ducrot (INRA, Theix), John Wilesmith (DEFRA, Royaume-Uni), de m'avoir offert de collaborer lors de futurs travaux.

L'inhabituel peut être dit. Qu'il me soit également permis de remercier tous ceux et celles qui se sont opposés à la prise en compte des réalités du terrain, opposés aux partages des résultats, des données et des expériences. Votre ténacité n'a fait que renforcer la mienne et je ne porte aucun jugement sur les raisons de vos agissements.

Je n'oublierai pas toutes les personnes que j'ai côtoyées et qui n'ont jamais cessé de m'encourager, de me conseiller. D'autres personnes auraient certainement mérité de figurer ici. Qu'elles veuillent bien m'excuser d'avoir omis de les mentionner.

J'adresse un merci particulier aux membres de mon Jury pour avoir accepté d'apporter un regard critique à ce travail : Professeur Etienne Thiry (ULg, Liège), Professeur Dirk Berkvens (ITG, Antwerpen), Professeur Jean-Jacques Letesson (FUNDP, Namur), Professeur Moëz Sanaa (ENV, Maisons-Alfort, France), Professeur Michèle Dramaix (ULB, Bruxelles) et les Professeurs Frédéric Farnier, Georges Daube, Guy Maghuin-Rogister, Jacques Mainil et Jean-François Beckers (ULg, Liège). J'associe ces remerciements au Professeur Antoine Clinquart (ULg, Liège) qui m'a aidé dans les démarches administratives liées à cette thèse.

L'amour, le sourire et le soutien de mon épouse Florence et de mon fils Sylvain m'ont été d'un grand secours. Un grand merci également à mes beaux-parents, Nelly et Louis-Philippe, pour leur compréhension et leur disponibilité.

Je dédie cette thèse à mon Papa qui est parti trop tôt. Je garde de toi le souvenir impérissable de ta ténacité à résoudre les problèmes rencontrés, ta justesse et ton optimisme sans faille.

J'exprime mes remerciements au Fonds National de la Recherche Scientifique sous les auspices duquel j'ai pu bénéficier de quelques crédits pour brefs séjours à l'étranger et qui m'ont permis de suivre des cours d'épidémiologie animale appliquée à l'ENV de Maisons-Alfort. Mes remerciements s'adressent également à l'Agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire sous les auspices de laquelle j'ai pu suivre une formation en analyse de risque en industries agroalimentaires et en santé publique vétérinaire également à l'ENV de Maisons-Alfort et j'ai pu faire partie, depuis 1999, de la délégation d'experts qui suivent les travaux de la Session générale du Comité international de l'Office international des Epizooties.



Les généreux sponsors que sont Intervet Belgium et Merial Belgium m'ont permis de réaliser l'impression de ce travail. Je les remercie beaucoup. J'associe ces remerciements à Christina Espert qui a assuré une dernière lecture du manuscrit et vérifier le layout final.

Ce travail a été partiellement subventionné par le Service publique fédéral, santé publique, sécurité de la chaîne alimentaire et environnement, Division recherche contractuelle et le Fonds pour la santé et la qualité des produits animaux (convention 5387A) et la région Wallonne.

# TABLE DES MATIERES

## **Chapitre 1 : Introduction**

1. Introduction générale .....	3
2. Epidémiologie des événements rares .....	5
2.1. Généralités .....	5
2.1.1. Adaptation des systèmes de détection aux caractéristiques épidémiologiques des événements rares étudiés .....	6
2.1.1.1. Expression clinique, contagion et transmissibilité .....	6
2.1.1.2. Objectifs de la surveillance .....	6
2.1.1.3. Les stratégies habituelles de détection et leurs limites .....	8
3. L'interprétation et l'utilisation des résultats de tests de diagnostic appliqués aux événements rares .....	11
3.1. Les événements rares étudiés .....	11
3.1.1. Encéphalopathie spongiforme bovine : l'émergence d'un événement rare .....	11
3.1.1.1. Etiologie, importance, répartition, mode de transmission .....	11
3.1.1.2. La maladie chez l'homme .....	12
3.1.1.3. La maladie chez les bovins .....	14
3.1.2. Contamination environnementale par des biphényles polychlorés et des dioxines : la persistance d'un événement rare .....	18
3.1.2.1. Les incidents chimiques en général .....	18
3.1.2.2. Les PCBs/dioxines en particulier .....	21
3.1.3. Brucellose bovine : la disparition d'un événement devenue rare .....	26
3.1.3.1. Etiologie, importance et répartition .....	26
3.1.3.2. La maladie chez l'homme .....	26
3.1.3.3. La maladie chez les bovins .....	27
3.2. La réponse immunitaire impliquée .....	36
3.2.1. L'immunité non-spécifique : première arme de défense naturelle .....	37
3.2.2. La réponse immunitaire spécifique ou la recherche de marqueurs spécifiques de l'infection .....	38
3.2.2.1. La dualité de la réponse immunitaire spécifique .....	38
3.2.2.2. Utilisation de l'immunité spécifique à des fins diagnostiques .....	40
3.3. Les principes épidémiologiques et statistiques utilisés .....	43
3.3.1. Sensibilité .....	43
3.3.2. Spécificité .....	44
3.3.3. Gold standard et test de référence .....	44
3.3.4. Valeurs prédictives d'un test .....	44
3.3.4.1. Valeur prédictive d'un résultat positif .....	45
3.3.4.2. Valeur prédictive d'un résultat négatif .....	45

3.3.5. Combinaison de plusieurs tests .....	45
3.3.5.1. Tests en parallèle .....	46
3.3.5.2. Tests en série .....	46
3.3.6. Détermination de la valeur seuil d'un test (cut-off) .....	46
3.3.7. Jugements catégoriels appariés .....	47
3.3.8. Estimation de la prévalence réelle .....	47
3.3.9. Odds ratio .....	48
3.3.10. Arbre de décision (classification and regression trees, CART) .....	48
3.3.11. La régression linéaire .....	49
3.3.12. Les modèles linéaires généralisés .....	49
3.3.12.1. Principes .....	49
3.3.12.2. Application à l'épidémiosurveillance des événements rares .....	50
3.4. Les principes de base de l'évaluation des risques chimiques .....	52
3.4.1. Définitions et principes .....	52
3.4.1.1. Identification des dangers .....	52
3.4.1.2. Caractérisation des dangers .....	53
3.4.1.3. Evaluation de l'exposition .....	54
3.4.1.4. Caractérisation des risques .....	54
3.4.1.5. Options de réduction du risque .....	55
3.4.1.6. Communiquer assure la transparence et la cohérence .....	55
3.4.1.7. Variabilités et incertitudes ou la raison d'un continuum .....	55
3.4.2. Importance des normes internationales .....	56
▪ Préambule .....	58
▪ Diagnostic différentiel des troubles à expression nerveuse dans l'espèce bovine en Europe occidentale .....	59

## **Chapitre 2 : Objectifs du travail**

1. Objectif général .....	103
2. Objectifs spécifiques .....	103
2.1. Emergence d'un événement rare .....	103
2.2. Persistance d'un événement rare .....	104
2.3. Disparition d'un événement rare .....	104
2.4. Identification d'un indicateur du stade épidémiologique d'un événement rare .....	104

## **Chapitre 3 : Etude de l'émergence d'un événement rare**

### ***L'émergence de l'encéphalopathie spongiforme bovine en Belgique***

▪ Préambule .....	107
-------------------	-----

- Etude rétrospective à l'échelle de la population des troubles d'expression nerveuse chez les ruminants avant le début de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) en Belgique, un pays de catégorie III en ce qui concerne le risque géographique de l'ESB ..... 108
- Outils d'aide à la décision pour le diagnostic clinique d'une maladie chez des vaches suspectes d'encéphalopathie spongiforme bovine ..... 139

#### **Chapitre 4 : Etude de la persistance d'un événement rare**

##### ***La contamination environnementale du cheptel bovin par des PCBs/dioxines***

- Préambule ..... 164
- Détection des biphényles polychlorés et des dioxines dans le cheptel bovin belge et estimation de l'exposition potentielle maximale chez les humains par l'intermédiaire des aliments d'origine bovine ..... 166

#### **Chapitre 5 : Etude de la disparition d'un événement rare**

##### ***L'éradication de la brucellose bovine couplée à la mise en évidence des réactions sérologiques faussement positives***

- Préambule ..... 192
- Evaluation de trois tests ELISAs indirects pour sérum utilisant des anticorps monoclonaux et la protéine G comme conjugué couplé à la peroxydase pour le diagnostic de la brucellose bovine ..... 193
- Diagnostic de la brucellose bovine à l'aide du test cutané : conditions d'utilisation du test et évaluation de ses performances ..... 222

#### **Chapitre 6 : Identification d'un indicateur du stade épidémiologique d'un événement rare**

##### ***Choix d'un indicateur de la courbe épidémique de l'encéphalopathie spongiforme bovine***

- Préambule ..... 241
- L'évolution de l'âge à la détection des bovins atteints d'encéphalopathie bovine spongiforme : un bon indicateur de la courbe épidémique ..... 242

#### **Chapitre 7 : Discussion générale**

1. Emergence d'un événement rare ..... 261
  - 1.1. Etude rétrospective des troubles d'expression nerveuse chez les ruminants avant la déclaration du premier cas d'ESB en Belgique ..... 262
  - 1.2. Description des premiers cas cliniques d'ESB ..... 263
  - 1.3. Développement d'un outil d'aide à la décision clinique d'une maladie ..... 263
  - 1.4. Aspects normatifs internationaux ..... 265

2. Persistance d'un événement rare .....	265
2.1. Limite de détection .....	266
2.2. Echantillonnage standardisé .....	267
2.3. Meilleure connaissance des consommations individuelles .....	268
2.4. Prélèvements sur les bovins vivants .....	268
2.5. Approche probabiliste .....	268
3. Disparition d'un événement rare .....	269
3.1. Diagnostic sérologique et allergique de la brucellose bovine .....	269
3.1.1. Mise en évidence de réactions sérologiques faussement positives .....	269
3.1.2. Tests i-ELISAs .....	269
3.1.3. Test cutané .....	271
3.1.4. Aspects normatifs internationaux .....	271
3.1.5. Stratégie de testage .....	271
3.2. Adaptation de l'épidémiosurveillance de la brucellose bovine qui est devenu un phénomène rare .....	272
3.2.1. Développement d'un modèle déterministe d'estimation de la prévalence de la brucellose bovine et d'évaluation des programmes nationaux de surveillance .....	272
3.2.2. Développement d'un outil d'évaluation du risque d'importation de bovins infectés par <i>Brucella abortus</i> .....	273
3.2.3. Développement d'un modèle Bayésien de prédiction de la prévalence réelle de l'infection brucellique sur base de la combinaison de tests de dépistage .....	273
4. Indicateur d'état d'un événement rare .....	275
5. Modèle généralisé d'épidémiosurveillance des événements rares .....	276

## **Chapitre 8 : Résumé - Summary**

▪ Résumé .....	280
▪ Summary .....	282

## **Chapitre 9 : Bibliographie générale**

▪ Bibliographie générale .....	285
--------------------------------	-----

# LISTE DES ABREVIATIONS

<b>1C8</b>	Anticorps monoclonal anti-IgG1 bovin	<b>FN</b>	Faux négatif
<b>3H3</b>	Anticorps monoclonal anti-IgG2 bovin	<b>FP</b>	Faux positif
<b>ADI</b>	Admissible daily intake	<b>FPSR</b>	False positive serological reaction
<b>adj OR</b>	Adjusted odds ratio	<b>GBR</b>	Geographical BSE Risk assessment
<b>AFSCA</b>	Agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire	<b>GC</b>	Gas chromatography ; Chromatographie en phase gazeuse
<b>Ah (récepteur)</b>	Aryl hydrocarbure (récepteur)	<b>GC-ECD</b>	Gas chromatography - Electron capture detection ; Chromatographie en phase gazeuse suivie d'une détection par capture d'électron
<b>ARSIA</b>	Association régionale de santé et d'identification animale	<b>GC-HRMS</b>	Gas chromatography - High resolution mass spectroscopy ; Chromatographie en phase gazeuse suivie par une spectrométrie de masse haute résolution
<b>B19</b>	Vaccin atténué <i>Brucella abortus</i> Buck 19	<b>GC-MS</b>	Gas chromatography - Mass spectroscopy ; Chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse
<b>BASE</b>	Bovine amyloidotic spongiform encephalopathy	<b>GMLs</b>	Generalised linear models ; Modèle linéaire généralisé
<b>BB</b>	Body burden	<b>HSR</b>	Hypersensibilité retardée
<b>BSE</b>	Bovine spongiform encephalopathy	<b>IC</b>	Intervalle de confiance
<b>BSE signs</b>	Signes cliniques plus fréquemment rencontrés lors d'encéphalopathie spongiforme bovine	<b>IDR</b>	Intradermoréaction
<b>CART</b>	Classification and regression trees	<b>i-ELISA</b>	Indirect enzyme-linked immunosorbent assay
<b>CCBO</b>	Consumption of commodity of bovin origin	<b>IFN-g</b>	Interféron gamma
<b>CERVA</b>	Centre d'étude et de recherche vétérinaires et agrochimiques	<b>IgA</b>	Immunoglobuline A
<b>CFT</b>	Complement fixation test ; test de fixation du complément	<b>IgG</b>	Immunoglobuline G
<b>CI</b>	Confidence interval	<b>IgM</b>	Immunoglobuline M
<b>CIRC</b>	Chemical Incident Report Centre	<b>IL</b>	Interleukine
<b>CL</b>	Confidence level	<b>ILSI</b>	International life science institute
<b>CONSUM</b>	Contaminant surveillance system	<b>IMC</b>	Immunité à médiation cellulaire
<b>CWD</b>	Chronic wasting disease	<b>IMH</b>	Immunité à médiation humorale
<b>DARf</b>	Dose aiguë de référence	<b>IPCS</b>	International programme on chemical safety ; Programme international sur la sécurité chimique
<b>DG SANCO</b>	Direction générale "Santé et Protection des Consommateurs"	<b>IRR</b>	Incidence rate ratio
<b>DGZ</b>	Dierengezondheidszorg Vlaanderen	<b>IR-TSEHE</b>	Observed annual incidence rate of histologically examined TSE cases
<b>DHE</b>	Dose hebdomadaire estimée	<b>I-TEF</b>	International - Toxicity equivalent factor
<b>DHT</b>	Dose hebdomadaire tolérable	<b>IU/ml</b>	International unit / millilitre
<b>DJA</b>	Dose journalière admissible	<b>IUPAC</b>	International union of pure and applied chemistry
<b>DJE</b>	Dose journalière estimée	<b>JMPR</b>	Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues
<b>DJT</b>	Dose journalière tolérable	<b>LIMS</b>	Laboratory information management system
<b>DSEIO</b>	Dose sans effet indésirable observé	<b>LIS signs</b>	signes cliniques plus fréquemment rencontrés lors de listériose
<b>EDI</b>	Estimated daily intake	<b>LMR</b>	Limite maximale de résidu
<b>EDTA</b>	Ethylène diamine tétra-acétate	<b>LOAEL</b>	Lowest adverse effect level
<b>EECU</b>	Economic European community unit	<b>LOD</b>	Limite of detection ; limite de détection
<b>EFSA</b>	European Food Safety Authority	<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay	<b>LR</b>	Likelihood ratio
<b>EMEA</b>	European Agency for the Evaluation of Medical Products	<b>MBM</b>	Meat and bone meal
<b>ESB</b>	Encéphalopathie spongiforme bovine	<b>MCMC</b>	Markov chain Monte Carlo
<b>EST</b>	Encéphalopathie spongiforme transmissible	<b>ME signs</b>	Signes cliniques plus fréquemment rencontrés lors de méningite et/ou encéphalite
<b>EWI</b>	Estimated weekly intake	<b>MMBM</b>	Mammalian meat bone meal
<b>FAO</b>	Food and agriculture organization of the United Nations	<b>na</b>	Not available
<b>FASFC</b>	Federal agency for the Safety of the food Chain	<b>NAHMS</b>	National animal health monitoring system

<b>NED</b>	Neurologically expressed disorders	<b>SDS-I</b>	Fraction insoluble dans dodécylsulfate de sodium bouillant
<b>NOAEL</b>	No-observed-adverse-effect level	<b>Se</b>	Sensibilité
<b>OCB</b>	Ovin, caprin, bovin	<b>S-LPS</b>	Smooth lipopolysaccharide
<b>OCDD</b>	Octachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxine	<b>SMV</b>	Sambre and Meuse valley
<b>OIE</b>	Office international des Epizooties	<b>Sp</b>	Spécificité
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la Santé	<b>SPS</b>	Sanitaire et phytosanitaire
<b>OR</b>	Odds ratio	<b>SRM</b>	Specific risk materials
<b>PCBs</b>	Polychlorinated biphenyls ; Biphényles polychlorés	<b>ST</b>	Skin test
<b>PCD</b>	Percentile of dioxin concentration	<b>TCD4</b>	voir Th2
<b>PCDDs</b>	Polychlorinated-dibenzo-furans ; Dibenzofuranes polychlorés	<b>TCD8</b>	voir Th1
<b>PCDFs</b>	Polychlorinated-dibenzo- <i>p</i> -dioxins ; Dibenzodioxines polychlorés	<b>TCDD</b>	2,3,7,8 tétrachloro- <i>para</i> -dibenzodioxine
<b>PG</b>	Protein G ; anticorps monoclonal anti-IgG	<b>TDI</b>	Tolerable daily intake
<b>PIR-NED</b>	Predicted incidence rate for reported NED	<b>TEF</b>	Toxicity equivalent factor ; Facteur d'équivalence toxique
<b>PIR-Rabies</b>	Predicted annual incidence rate of suspected rabies cases	<b>TEN</b>	Trouble d'expression nerveuse
<b>PIR-TES</b>	Predicted incidence rate of suspected TSE cases	<b>TEQ</b>	Toxic equivalent factor ; Quantité d'équivalent toxique
<b>PRNP</b>	Gène codant pour la protéine prion PrP	<b>Th1</b>	Sous-type de lymphocyte T auxiliaire (réponse cellulaire)
<b>prn-p</b>	Gène codant pour la protéine prion PrP	<b>Th2</b>	Sous-type de lymphocyte T auxiliaire (réponse humorale)
<b>PrP<sup>c</sup></b>	Protéine prion normale d'origine cellulaire	<b>TMDI</b>	Theoretical maximum daily intake
<b>PrP<sup>res</sup></b>	Fraction restante de la PrP <sup>sc</sup> après l'un et/ou l'autre traitement (res = résistante)	<b>TNF-B</b>	Tumor necrosis factor bêta
<b>PrP<sup>sc</sup></b>	Isoforme anormale de la protéine prion (pathologique)	<b>TSE</b>	Transmissible spongiform encephalopathy
<b>PTWI</b>	Percentage of tolerable weekly intake	<b>TTL</b>	Test de prolifération des lymphocytes T en réponse à l'antigène
<b>PVL</b>	Provincial veterinary laboratories	<b>TWI</b>	Tolerable weekly intake
<b>RB 51</b>	Vaccin obtenu à partir d'un mutant stable de <i>Brucella abortus</i> 2308, rugueux et résistant à la rifampicine	<b>UG</b>	University of Ghent
<b>RBPT</b>	Rose bengale plate test ; Séroagglutination rapide sur lame	<b>UL</b>	University of Liege
<b>ROC</b>	Receiver Operating Characteristic	<b>vCJD</b>	Nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob
<b>RSFP</b>	Réaction sérologique faussement positive	<b>VN</b>	Vrai négatif
<b>RT</b>	Ring test	<b>VP</b>	Vrai positif
<b>RT</b>	Room temperature	<b>VP-</b>	Valeur prédictive d'un résultat négatif à un test de diagnostic
<b>RU</b>	Royaume-Uni	<b>VP+</b>	Valeur prédictive d'un résultat positif à un test de diagnostic
<b>S2</b>	Vaccin obtenu à partir d'une souche de <i>Brucella suis</i> biotype 1 (lisse), par passages multiples dans des milieux de culture	<b>WHO</b>	World Health Organization
<b>SAF</b>	Scrapie associated fibrils	<b>WHO-TEF</b>	World Health Organization - Toxic equivalent factor
<b>SAW-DTT</b>	Séro-agglutination de Right, en présence du facteur rhumatoïde, après traitement du sérum par le dithiothréitol	<b>YOPs</b>	<i>Yersinia</i> outer proteins
<b>SAW-EDTA</b>	Séro-agglutination de Right en présence d'EDTA	<b>yr</b>	year

# **Chapitre 1**

## **Introduction**



*« Former des esprits sans les conformer,  
les enrichir sans les endoctriner,  
leur communiquer une force dont ils puissent faire leur force,  
leur donner le meilleur de soi sans attendre ce salaire qu'est la ressemblance. »*

*Edmond Rostand.*

# 1. Introduction générale

La santé publique vétérinaire est un concept qui englobe la santé et le bien-être des animaux, la qualité de la pratique vétérinaire, l'épidémiosurveillance<sup>1</sup>, la prévention des maladies animales et la sécurité de la chaîne alimentaire, tels que présentés dans les statuts du collège européen de santé publique vétérinaire (European College of Veterinary Public Health, 2004). Le monde vétérinaire engage de plus en plus sa responsabilité afin de garantir à la société une alimentation de qualité, exempte d'agents pathogènes ou de contaminants et provenant d'animaux élevés dans un souci de bien-être, en l'absence de maladies zoonotiques, épizootiques et enzootiques. Depuis longtemps, la notion du « tout ou rien » est devenue obsolète, principalement dans les matières traitées en santé publique vétérinaire, car elles relèvent de la biologie, avec ce que cela comporte comme variabilité et incertitude.

Comparé à d'autres pays européens, le secteur agricole belge est particulièrement axé sur l'exportation. Dans le commerce européen des produits agricoles et agro-industriels (Europe des 15), l'Union économique belgo-luxembourgeoise joue un rôle important avec une sixième place pour les importations (15,9 milliards d'euros) et une quatrième place pour les exportations (17,2 milliards d'euros). Contrairement à l'Union européenne qui est importatrice nette de produits agroalimentaires, la Belgique se caractérise par un solde positif de sa balance commerciale (Agrinfo, 2001). Pour maintenir et augmenter ce dernier, elle devait pouvoir garantir la sécurité sanitaire des produits agricoles d'origine bovine. C'est ainsi que trois grands objectifs ont dû être atteints : (i) obtenir une reconnaissance opérationnelle du réseau de surveillance des exploitations bovines (décision 2002/544/CE ; Anonyme, 2002) ; (ii) obtenir un statut sanitaire élevé du cheptel bovin (décision 2003/467/CE ; Anonyme, 2003) et (iii) maintenir ce statut.

Dans un tel contexte, l'épidémiosurveillance des événements rares<sup>2</sup> est particulièrement indiquée. L'approche de ces événements est encore actuellement exploratoire et constitue un des défis de demain. Le recours à l'épidémiologie<sup>3</sup> (Zepeda *et al.*, 2001) et le recours à l'analyse de risque<sup>4</sup> (Ahl *et al.*, 1993 ; Office international des Epizooties, 2004a ; 2004b) sont devenus des démarches incontournables pour appréhender de tels événements (Hiatt et Goldman, 1994, Parlement européen et Conseil, 2002).

---

<sup>1</sup> méthode d'observation, fondée sur des enregistrements en continu, permettant de suivre l'état de santé ou les facteurs de risque d'une population définie, en particulier de déceler l'apparition de processus pathologiques et d'en étudier le développement dans le temps et dans l'espace, en vue de l'adoption de mesures appropriées de lutte (Toma *et al.*, 1991).

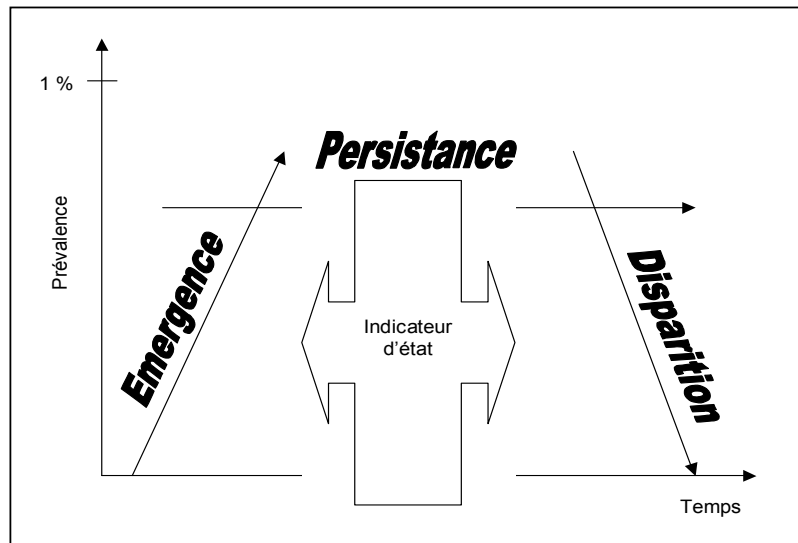
<sup>2</sup> un événement est qualifié de rare lorsque sa fréquence relative est inférieure à 1% ou lorsqu'il ne survient que sporadiquement (Toma, 1998).

<sup>3</sup> étude des maladies et des facteurs de santé dans une population (Toma *et al.*, 1991).

<sup>4</sup> une démarche scientifique faite dans le but d'identifier les dangers connus ou potentiels, d'en évaluer les risques, de les gérer et de communiquer à leur propos (Ahl. *et al.*, 1993).

Un événement rare peut se présenter selon trois états. Il peut soit émerger, persister ou disparaître (figure 1).

Figure 1. Les trois états d'un événement rare et le choix d'un indicateur d'état.



Dans le cadre de cette thèse, l'émergence d'un événement rare sera analysée dans le contexte de l'apparition de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) en Belgique. La persistance d'un événement rare sera étudiée par le biais d'une estimation, dans deux scénarii extrêmes, de l'exposition potentielle du consommateur à une contamination par des PCBs et des dioxines, en dehors de la crise PCBs/dioxines de 1999. La disparition d'un événement rare sera analysée en prenant comme exemple la certification et le maintien de l'absence de brucellose bovine en Belgique, dans un contexte d'apparition de réactions sérologiques faussement positives. Enfin, un indicateur du stade épidémiologique d'un événement rare a été recherché en prenant l'exemple de l'ESB (figure 1).

## 2. Epidémiologie des événements rares

(d'après Toma, 1998 et Saegerman *et al.*, 2003)

### 2.1. Généralités

Les mesures d'éradication, de gestion ou de prévention appliquées vis-à-vis d'un certain nombre d'agents pathogènes ou de contaminants chimiques ont réduit considérablement leur fréquence, jusqu'à un niveau que l'on qualifie d'« événements rares ». De même, lorsqu'une nouvelle maladie ou contamination apparaît, sa fréquence peut être réduite et, éventuellement, le rester en cas de non réussite émergente (Toma et Thiry, 2003).

Lorsque la fréquence relative d'un événement est inférieure à 1% ou lorsqu'un événement ne survient que sporadiquement, il est qualifié de rare (Toma, 1998). La rareté peut toutefois s'apprécier différemment en fonction des événements rencontrés (agents pathogènes, agents non conventionnels, contaminants), du statut sanitaire initial de la population ou de l'unité épidémiologique considérée (par exemple, un événement peut être fréquent à l'échelle des troupeaux et rare à l'échelle des animaux comme c'est le cas pour les réactions sérologiques faussement positives dans le cadre du dépistage de la brucellose bovine) et dès lors, il est très difficile de définir le seuil maximal en dessous duquel un événement peut être qualifié de rare. Ces événements peuvent être apparents ou inapparents. Ils sont apparents lorsqu'ils sont traduits par des signes cliniques et/ou des lésions (la rage par exemple). Ils sont inapparents soit de manière permanente (contamination, infection ou infestation inapparente), soit de manière prolongée (longue incubation précédant une expression clinique de durée variable) ou transitoire (rémission clinique). Les maladies à prions sont des événements rares inapparents (phase d'incubation) et qui peuvent devenir apparents (phase clinique). Les contaminations par les polychlorobiphényles (PCBs) et les dioxines chez le bovin sont souvent des événements rares inapparents. La brucellose bovine est un événement qui est devenu rare en Belgique. Il est soit apparent (avortement ou mise bas de veaux viables, orchite et épидидymite avec stérilité fréquente chez le taureau, hygromas brucelliques) ou inapparent (bovin porteur latent). Lorsqu'un événement rare est apparent, il peut faire l'objet d'un diagnostic clinique ou nécropsique (épidémiologie dite passive). Lorsqu'un événement rare est inapparent, il peut être soumis à un dépistage (épidémiologie dite active), si un marqueur de l'infection est disponible et détectable (Saegerman *et al.*, 2003). Le dépistage peut soit être systématique (appliqué régulièrement à tous les individus d'une population) ou occasionnel (appliqué dans des cas particuliers ; par exemple, le contrôle des animaux d'un troupeau suite à la découverte de lésions suspectes de tuberculose bovine à l'abattoir). Le dépistage systématique peut être de masse (appliqué à la très grande majorité des individus d'une

population ; par exemple, le contrôle trisannuel du cheptel en vue de dépister la brucellose bovine) ou sélectif (appliqué aux individus de certains groupes d'une population ; par exemple, le contrôle des animaux importés). Au lieu de dépister un ensemble d'animaux, il est possible de n'en tester qu'un échantillon (une partie). L'échantillonnage consiste à choisir au sein d'une population un sous-ensemble appelé échantillon. Ce dernier peut être aléatoire (tiré au sort), ou ciblé (en fonction d'un facteur de risque).

### **2.1.1. Adaptation des systèmes de détection aux caractéristiques épidémiologiques des événements rares étudiés**

La surveillance spatio-temporelle des événements rares doit tenir compte des caractéristiques cliniques et épidémiologiques des maladies et des contaminations rencontrées ainsi que de la population cible.

#### **2.1.1.1. Expression clinique, contagion et transmissibilité**

Un événement rare, transmissible<sup>5</sup>, contagieux, d'expression clinique fréquente (taux de morbidité<sup>6</sup> intra-troupeau élevé comme dans le cas de la fièvre aphteuse) et/ou intense (taux de mortalité<sup>7</sup> élevé comme dans le cas de la rage) est plus facilement détectable mais dans ce cas, il est capital de pouvoir le détecter le plus tôt possible afin d'éviter des répercussions de santé publique, sanitaires et économiques. A l'inverse, un événement rare, non transmissible, non contagieux, d'expression clinique rare (contamination des bovins par des PCBs/dioxines) ou un événement rare transmissible, non contagieux, d'expression clinique tardive (ESB) peut également être difficile à détecter et les conséquences de la non détection tout aussi dommageables.

#### **2.1.1.2. Objectifs de la surveillance**

Les objectifs de l'épidémiosurveillance des événements rares (tableau 1) sont variables en fonction de (i) les états possibles de l'événement ; (ii) la nature de l'événement (apparent ou inapparent), (iii) l'unité épidémiologique de la détection de l'événement (bovin, troupeau, région, pays) et (iv) l'expression qualitative (absence ou présence) ou quantitative de l'événement (présence avec un tel taux de fréquence ou absence en dessous d'un tel taux de fréquence).

---

<sup>5</sup> Une maladie dont l'agent peut être transmis et retransmis à des organismes. Une maladie peut être transmissible mais non contagieuse si elle exige pour sa transmission l'intervention d'un vecteur (Toma *et al.*, 1991)

<sup>6</sup> Nombre de malades dans une population pendant une période donnée ou à un instant donné (Toma *et al.*, 1991)

<sup>7</sup> Nombre de morts dans une population pendant une période donnée (Toma *et al.*, 1991).

**Tableau 1. Objectifs et principes de la détection des événements rares (adapté de Toma, 1998)**

Nature de l'événement	Unité épidémiologique	Epidémiosurveillance	
		Objectifs	Principes
Apparent	Animal	<ul style="list-style-type: none"> <li>détection des signes cliniques et/ou des lésions</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>étude systématique</li> <li>examens complémentaires de confirmation</li> </ul>
	Animal	<ul style="list-style-type: none"> <li>vérifier l'absence d'infection ou de contamination d'un animal introduit ou importé</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>test de dépistage très sensible</li> <li>qualification du troupeau d'origine</li> <li>protection vis-à-vis des facteurs de risque</li> <li>répétition du test</li> </ul>
Inapparent	Lot ou troupeau	<ul style="list-style-type: none"> <li>déterminer le taux de prévalence du lot ou du troupeau (objectif quantitatif)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>échantillon représentatif et de taille adaptée à la précision souhaitée</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>détecter l'infection ou la contamination du lot ou du troupeau si elle se situe au-dessus d'un certain niveau (objectif qualitatif)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>échantillon représentatif et de taille adaptée au risque d'erreur accepté</li> </ul>
	Zone (région ou pays)	<ul style="list-style-type: none"> <li>vérifier l'absence d'infection du lot ou du troupeau (acceptation du lot ou qualification du troupeau indemne)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>résultats négatifs sur un échantillon adapté au risque d'erreur accepté</li> <li>protection vis-à-vis des facteurs de risque</li> <li>répétition du test</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>déterminer le taux de prévalence de troupeaux infectés ou contaminés dans la zone (objectif quantitatif)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>échantillon représentatif et de taille adaptée à la précision souhaitée</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>détecter l'infection ou la contamination de la zone si elle se situe au-dessus d'un certain niveau de troupeaux infectés ou contaminés (objectif qualitatif)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>échantillon représentatif et de taille adaptée au risque d'erreur accepté</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>vérifier l'absence d'infection ou de contamination de la zone (qualification de la zone indemne)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>résultats négatifs sur un échantillon adapté au risque d'erreur accepté</li> <li>protection vis-à-vis des facteurs de risque</li> <li>répétition du test</li> </ul>

**Etats possibles de l'événement** : Un événement rare peut s'exprimer selon trois états en fonction de l'évolution de son taux d'incidence. L'événement peut soit émerger (encéphalopathie spongiforme bovine, ESB), persister (contamination par le PCBS/dioxines), ou disparaître (brucellose bovine). La surveillance d'un événement rare dépendra de l'état de celui-ci. Il conviendra, par exemple, d'améliorer la détection des nouveaux cas en condition d'émergence (détection clinique et/ou outils de diagnostic), de vérifier l'impact des événements sur la santé publique et la santé publique-vétérinaire en condition de persistance et d'adapter les outils de diagnostic existant en condition de disparition d'un événement rare dès lors que la valeur prédictive d'un résultat positif (confiance que l'on peut accorder dans un résultat positif) diminue drastiquement.

**Nature de l'événement** : Pour certaines maladies ou contaminants, la détection sera fondée exclusivement sur l'identification des signes cliniques et/ou des lésions (rage, ESB au début des années 90). Pour d'autres, la détection portera principalement sur les signes cliniques

et/ou des lésions, mais comportera également un dépistage de l'événement rare inapparent par l'utilisation de tests de mesure de l'immunité à médiation humorale ou cellulaire, ou la mise en évidence de l'agent pathogène (épizooties), ou le dosage du contaminant dans des matrices appropriées (PCBs/dioxines). Pour d'autres encore, la détection portera au contraire principalement sur les animaux infectés ou contaminés de façon inapparente, l'identification des signes cliniques et/ou des lésions n'étant qu'occasionnelle (brucellose, tuberculose, leucose bovine enzootique).

**Unité épidémiologique** : Celle-ci peut être un animal, un lot d'animaux, un troupeau, une région (zone) ou un pays. L'animal sera l'unité d'intérêt lors d'une introduction ou d'une importation d'un animal dans un troupeau. La probabilité qu'un animal soit infecté (en incubation ou infecté de façon latente) ou contaminé (événement rare inapparent) est en général faible compte tenu des garanties apportées par la certification (législation nationale ou communautaire). Cependant les conséquences d'une non détection sont dramatiques. Le lot d'animaux sera généralement l'unité d'intérêt dans le cadre d'une contamination (par exemple, les animaux ayant reçu le même lot d'aliment dans le cas d'une contamination alimentaire). Le troupeau sera l'unité d'intérêt dans le cas de maladies transmissibles. Enfin, l'unité épidémiologique peut être une région (zone) ou un pays dans le cas d'une reconnaissance du statut officiellement indemne pour une maladie donnée.

**Expression qualitative ou quantitative de l'événement** : Au sein d'un troupeau ou pour un ensemble de troupeaux (zone), l'objectif peut être qualitatif (détecter la présence de l'événement à un taux de prévalence supérieur ou égal à un taux théorique retenu par hypothèse) ou quantitatif (connaître le taux de prévalence réelle de la maladie avec un certain risque d'erreur).

### 2.1.1.3. Les stratégies habituelles de détection et leurs limites

**Etude des suspicions cliniques** : La détection d'une suspicion clinique d'un événement rare est cruciale. Elle doit s'accompagner d'examen de laboratoire de confirmation (peu des signes cliniques sont pathognomoniques). L'amélioration de la détection clinique repose sur : (i) une amélioration des outils d'identification et de précocité de détection ; (ii) une amélioration de la déclaration des cas cliniques suspects observés ; (iii) une communication et une médiatisation des informations collectées (transparence) ; et (iv) la recherche et la rapidité des réponses administratives qui en découlent (efficacité) (Saegerman *et al.*, 2003).

Une détection optimale dépend du fonctionnement satisfaisant de l'ensemble de la chaîne des acteurs du réseau d'épidémiosurveillance (éleveurs, vétérinaires, personnel des laboratoires, autorités responsables). Comme dans tout mécanisme semblable, comportant une séquence d'événements, l'efficacité du système de détection est conditionnée par le « maillon » le plus

faible. L'efficacité de tels réseaux ne peut être appréciée qu'au travers des évaluations régulières et/ou l'élaboration et le suivi en continu d'indicateurs de performance (Saegerman *et al.*, 2003). De nombreux facteurs conditionnent cette efficacité :

- plusieurs facteurs dépendent des **éleveurs** : (i) le degré de vigilance accordé aux animaux, (ii) le degré de conscience sanitaire des éleveurs, (iii) le degré de connaissance des maladies soumises à déclaration obligatoire et l'expression clinique de celles-ci et (iv) le degré de médicalisation vétérinaire des animaux.
- plusieurs facteurs dépendent des **vétérinaires** : (i) l'acquisition d'un mandat sanitaire, (ii) le degré de sensibilisation des vétérinaires praticiens aux maladies à surveiller ; le degré d'expérience des vétérinaires praticiens à distinguer l'anormal du normal.
- plusieurs facteurs dépendent du **personnel des laboratoires de diagnostic vétérinaire** : (i) le degré de compétence ; (ii) le degré de participation à des réseaux de surveillance pré-existant (expérience), (iii) le degré d'accréditation, (vi) le degré de performance (ring test).
- plusieurs facteurs dépendent des **autorités sanitaires** : (i) le niveau et la rapidité des indemnités octroyées, (ii) la décision de communiquer et de médiatiser des informations collectées ; et (iii) la recherche et la rapidité de mise en oeuvre des réponses administratives (Toma, 1998; Saegerman *et al.*, 2003).

**Echantillonnage** : Les modalités de l'échantillonnage que sont le choix et la taille de l'échantillon déterminent, respectivement, l'exactitude et la précision des résultats obtenus. L'efficacité d'un échantillonnage est conditionnée par la fraction de sondage<sup>8</sup> (rapport entre l'effectif de l'échantillon et celui de la population d'étude) et le taux de prévalence instantanée<sup>9</sup> (proportion de sujets atteints parmi la population réceptive à un moment donné). La comparaison de ces deux valeurs permet d'avoir une idée approximative de la probabilité de détection d'un événement rare. Plus la taille de l'échantillon aléatoire se rapproche de la valeur du dénominateur du taux de prévalence instantanée, plus la probabilité de détection de la maladie augmente (Toma, 1998). Pour illustrer le propos, deux exemples sont présentés : (i) si 100 sujets sont atteints dans une population réceptive de 10000 animaux, alors le taux de prévalence instantané est de 1/100 et la probabilité de détection de l'événement augmente lorsque la taille de l'échantillon aléatoire se rapproche de 100 unités ; (ii) si 10 sujets sont atteints dans une population réceptive de 10000 animaux, alors le taux de prévalence instantané vaut 1/1000 et la probabilité de détection de l'événement augmente lorsque la taille de l'échantillon aléatoire se rapproche de 1000 unités. Ainsi, pour des événements rares, la

<sup>8</sup> Lorsque la fraction de sondage est inférieure à 5 %, la population est dite infinie ; dans le cas contraire, la population est dite finie.

<sup>9</sup> En santé animale, la connaissance de l'incidence et du temps moyen de maladie ou de portage de l'agent pathogène est capitale pour calculer le taux de prévalence instantanée moyenne qui correspond à la probabilité d'avoir affaire à un individu malade ou porteur, par tirage au sort d'un animal dans la population (Toma, 2002).



taille de l'échantillon aléatoire à étudier est élevée, ce qui induit des coûts. Une solution pour limiter ceux-ci est d'augmenter la prévalence de la maladie à détecter en utilisant un échantillon ciblé en fonction de facteurs de risque connus. Bien que cette démarche soit appropriée pour répondre à un objectif qualitatif (présence ou absence de maladie), elle ne l'est pas pour un objectif quantitatif (estimation d'un taux de prévalence).

**Caractéristiques et qualités du test de dépistage** : Celles-ci sont plus longuement décrites et discutées au point 3.3. Une première limite et difficulté rencontrée réside dans la nécessité d'obtenir un test de dépistage très sensible pour augmenter la chance de détecter un événement rare. Une deuxième limite et difficulté rencontrée dans l'approche des événements rares peut être comprise par simple intuition. En effet, si la fréquence d'une maladie est nulle, tous les animaux sont sains. En santé publique et en santé publique vétérinaire, il est rarissime d'avoir un test de diagnostic qui soit 100 % spécifique. Lorsqu'un tel test est appliqué sur une population ou un échantillon d'animaux, un certain nombre de résultats faussement positifs au test sera constaté. Dès lors, en l'absence de maladie, la confiance que l'on peut accorder dans un résultat positif au test de diagnostic est nulle (valeur prédictive d'un résultat positif), à cause des faux positifs (manque de spécificité du test). De la même manière, si la fréquence d'un événement est très faible, cette confiance sera très faible. Ceci nécessite de contrôler tous les résultats positifs (examens complémentaires) et d'inventorier la présence éventuelle de facteurs de risque.

**Limites** : L'épidémiosurveillance des événements rares se heurte aux difficultés liées aux limites statistiques de l'échantillonnage et aux caractéristiques des tests de diagnostic (examen clinique et tests de dépistage). Ces difficultés incitent à utiliser des méthodes visant à privilégier : (i) l'échantillonnage ciblé en fonction des facteurs de risque, (ii) l'application de test de mélange et (iii) la vérification de tous résultats positifs en vue d'identifier les erreurs par excès.

### **3. L'interprétation et l'utilisation des résultats de tests de diagnostic appliquées aux événements rares**

Comme signalé au point 2, l'amélioration de la détection d'un événement rare repose sur la surveillance clinique et/ou sur l'application de tests rapides de dépistage (Saegerman *et al.*, 2003). Il s'agit à chaque fois de tests de diagnostic. Une interprétation correcte de ceux-ci est nécessaire avant toute décision ou action et repose sur la compréhension de l'histoire naturelle des maladies et des troubles de la santé (point 3.1.), de l'immunologie (point 3.2.), de l'épidémiologie et des statistiques (3.3.) et de l'évaluation des risques (point 3.4.).

#### **3.1. Les événements rares étudiés**

Nous nous focaliserons sur les trois sujets traités dans cette thèse : (i) l'encéphalopathie spongiforme bovine (exemple d'apparition d'un événement rare, transmissible, non contagieux et n'induisant pas de réponse immunitaire) ; (ii) la contamination environnementale par les PCBs et les dioxines (exemple de persistance d'un événement rare, de nature chimique et hautement toxique) et (iii) la brucellose bovine (exemple de disparition d'un événement rare, transmissible, contagieux, zoonotique et induisant une réponse immunitaire complexe).

##### **3.1.1. Encéphalopathie spongiforme bovine : l'émergence d'un événement rare**

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) comprennent des maladies neurologiques subaiguës dégénératives dont les prototypes sont la tremblante du mouton et certaines formes de maladie de Creutzfeldt-Jakob chez l'homme. Aucune réponse immune n'est constatée mais des auto-anticorps pourraient jouer un rôle dans la pathogénie (Wilson *et al.*, 2004). En 1986, l'émergence d'une forme nouvelle d'EST chez les bovins au Royaume-Uni (RU), dénommée « encéphalopathie spongiforme bovine » (ESB), a considérablement renforcé l'intérêt porté à ces maladies, essentiellement à cause de la nature épidémique de l'ESB au RU, à son extension en Europe continentale et à la découverte ultérieure de son caractère zoonotique (Thiry *et al.*, 2004).

###### **3.1.1.1. Etiologie, importance, répartition, mode de transmission**

L'ESB est une maladie de la liste B de l'Office international des Epizooties (OIE, 2000). Elle a été reconnue cliniquement et définie comme une nouvelle entité pathologique neurodégénérative au RU en 1986 (Wells *et al.*, 1987). Par la suite, une augmentation significative du taux d'incidence de la maladie clinique a été constatée dans et en dehors du

RU (tableau 2) (Wilesmith *et al.*, 1988 ; Gouello, 1991 ; Vanopdenbosch *et al.*, 1998 ; Wilesmith, 1998 ; Pastoret *et al.*, 2001 ; Ducrot *et al.*, 2001 ; Heim *et al.*, 2001 ; Kimura *et al.*, 2002 ; Hoag, 2003). L'évolution spatiale et temporelle de l'incidence de l'ESB a conduit à la qualifier de maladie émergente (Pattison, 1998 ; Brown, 2001 ; Toma & Thiry, 2003). A ce jour, l'origine exacte de l'ESB n'est pas déterminée. La protéine prion anormale<sup>10</sup>, pathologique (PrP<sup>res</sup>), est le marqueur de l'anazootie (Prusiner, 1998) et des résultats récents renforcent son rôle d'agent infectieux à part entière (Legname *et al.*, 2004). L'exposition du cheptel bovin de Grande-Bretagne coïncide avec la réduction de l'usage de solvants organiques qui permettaient d'augmenter la production de suif dans la production des farines de viandes et d'os à la fin des années septante (Bradley & Wilesmith *et al.*, 1991 ; Wilesmith *et al.*, 1992a ; 1992b ; Bradley, 1994). Les premiers cas cliniques confirmés d'ESB sont nés au moment de cette modification de procédure (Department for environment, food and rural affairs, 2003) mais le lien de cause à effet n'est pas établi avec certitude car aucune procédure pour la fabrication de farines de viandes et d'os, ne permet d'inactiver complètement la protéine prion (Commission européenne, 1998a ; 1998b). Ces cas résultent du recyclage de tissus bovins infectés, par le biais d'une exposition aux farines de viandes et d'os lors du jeune âge (Wilesmith *et al.*, 1991 ; 1992b ; Durand *et al.*, 1999). L'infection initiale pourrait être liée à l'incorporation dans ces farines de produits issus d'animaux atteints d'EST. Il pourrait s'agir soit de bovins atteints d'une forme sporadique d'ESB (« origine bovine »), soit d'ovins infectés par une souche particulière de tremblante (« origine ovine »), soit de ruminants sauvages entretenus dans les jardins zoologiques britanniques (« origine exotique »). Rien ne permet d'accorder plus de crédit à l'une ou l'autre de ces hypothèses (Savey, 2003). Outre la transmission par l'alimentation animale (contenant des farines de viandes et d'os, soit directement ou par le biais de contaminations croisées), des travaux menés au RU ont permis d'identifier un risque significatif d'infection des veaux nés de mères malades ou en fin d'incubation de la maladie, durant la période des 6 mois précédant ou suivant la mise bas (Hoinville *et al.*, 1995; Wilesmith, 1998). Cette constatation n'a pas pu être vérifiée en dehors du RU où l'incidence de l'ESB est beaucoup plus faible (Saegerman *et al.*, 1999).

### 3.1.1.2. La maladie chez l'homme

Le nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) a été identifié en 1996 au Royaume-Uni (Will *et al.*, 1996). Par la suite, plusieurs investigations ont précisé le lien entre le vCJD et l'ESB (Bruce *et al.*, 1997 ; Hill *et al.*, 1997). En février 2004, 146 cas de vCJD (cas

<sup>10</sup> Toutes les maladies à prions (particules transmissibles dépourvues d'acide nucléique) sont caractérisées par le métabolisme aberrant et l'accumulation consécutive de la protéine prion (Prusiner, 1991). La conversion post-transcriptionnelle de la protéine normale d'origine cellulaire (PrP<sup>C</sup>) en une isoforme anormale causant la maladie (PrP<sup>Sc</sup>) implique un changement conformationnel (Pan *et al.*, 1993) qui s'accompagne d'un changement profond des propriétés de la protéine. La PrP<sup>Sc</sup> est thermorésistante, insoluble en présence de détergent et partiellement résistante à la protéolyse. La fraction restante après l'un et/ou l'autre traitement est nommée PrP<sup>res</sup>.

probables ou définitifs) ont été identifiés chez des patients anglais (tableau 1) (Prusiner, 2004 ; Donnelly, 2004).

**Tableau 2. Situation sanitaire <sup>a</sup> mondiale de l'encéphalopathie spongiforme bovine et du nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (adapté de Prusiner S.B., 2004).**

Pays	Année du 1 <sup>er</sup> cas d'ESB	Nombre de cas d'ESB	Année du 1 <sup>er</sup> cas de $\nu$ CJD	Nombre de cas de $\nu$ CJD
Allemagne	2000	312		
Autriche	2001	1		
Belgique	1997	125		
Canada	2003	2	2002	1
Danemark	2000	13		
Espagne	2000	412		
Etats-Unis d'Amérique	2004	1	2004	[1] <sup>c, d</sup>
Finlande	2001	1		
France	1991	891	1996	6
Grèce	2001	1		
Hong Kong			2001	1 <sup>b</sup>
Iles Falkland	1989	1		
Irlande	1989	1353		
Israël	2002	1		
Italie	2001	117		
Japon	2001	11		
Lichtenstein	1998	2		
Luxembourg	1998	2		
Pays-Bas	1998	75		
Pologne	2002	14		
Portugal	1994	875		
République tchèque	2001	9		
Royaume Uni	1986	183803	1995	141 [5]
Slovaquie	2001	15		
Slovénie	2001	4		
Suisse	1990	453		
Sultanat d'Oman	1989	2		
Monde		188496		151 [6]

<sup>a</sup> situation en février 2004 ; <sup>b</sup> en attente de confirmation ; <sup>c</sup> entre [ ] : nombre de patients toujours en vie ; <sup>d</sup> patient originaire de Grande-Bretagne

Le pic épidémique a été constaté en 2000 (28 cas) et la décroissance ultérieure a amenuisé l'incertitude concernant la taille de l'épidémie humaine annoncée (Donnelly, 2004). Toutefois, une inconnue subsiste en ce qui concerne les géotypes plus résistants du codon 129, situé sur le gène PRNP<sup>11</sup> (méthionine/valine ou valine/valine) ; ceux-ci pourraient être associés à un allongement de la période d'incubation de la maladie (Peden *et al.*, 2004 ; Quoilin, communication personnelle). Un faible nombre de cas ont été enregistrés dans d'autres pays (Irlande, France, Italie, Canada et Etats-Unis). En outre, un patient anglais a contracté le  $\nu$ CJD trois années après avoir reçu une transfusion sanguine d'un autre patient qui a également contracté le  $\nu$ CJD. Un temps de résidence cumulé au RU, égal ou supérieur à 6 mois durant la période 1980-1996, constituerait un facteur de risque (Donnelly, 2004). De nouvelles thérapies

<sup>11</sup> Chez l'homme, le gène PRNP est localisé sur le chromosome 20 (Robakis *et al.*, 1986). Dans le cas du  $\nu$ CJD, seul l'homozygote pour le codon 129 (méthionine) du gène PRNP est observé (Ironsides & Head, 2000).

sont actuellement testées telles que la thiorazine (utilisée aussi dans le traitement de la schizophrénie) ou la quinacrine (un médicament contre la malaria). Les patients ne guérissent pas mais la progression de la maladie est significativement ralentie (Prusiner, 2004).

### 3.1.1.3. La maladie chez les bovins

**Pathogénie** : En condition expérimentale, la transmission par voie orale de l'agent de l'ESB s'est avérée 10<sup>5</sup> plus efficace que la voie intracérébrale (Commission Européenne, 2000). La connaissance de la pathogénie reste très limitée en raison du faible nombre d'expériences réalisées. Les données actuelles peuvent être résumées comme suit. Lors d'une infection expérimentale, par voie orale, de veaux âgés de 4 à 6 mois avec 100 g d'un pool de 75 encéphales de bovins atteints cliniquement d'ESB, la protéine prion PrP<sup>res</sup> a été détectée après infection (Wells *et al.*, 1998 ; Terry *et al.*, 2003 ; Prince *et al.*, 2003) : (i) du 6<sup>e</sup> mois jusqu'au 18<sup>e</sup> mois au niveau de l'iléon distal et plus précisément des plaques de Peyer ; (ii) dès le 10<sup>e</sup> mois dans les amygdales ; (iii) dès le 32<sup>e</sup> mois dans les ganglions nerveux dorsaux et le système nerveux central ; (iv) dès le 36<sup>e</sup> mois dans les ganglions trijumeaux ; (v) dès le 38<sup>e</sup> mois dans le système nerveux entérique ; (vi) à l'âge de 36 à 40 mois chez des animaux qui ont présenté des signes cliniques en association avec des lésions histopathologiques caractéristiques au niveau de l'encéphale. Ces études souffrent d'un sérieux biais : en effet, le stade de neuroinvasion n'est pas connu chez les animaux entre 18 à 32 mois (Wells *et al.*, 1998).

Le site de multiplication primaire, de même que les voies de dissémination de l'agent de l'ESB dans l'organisme bovin ne sont pas déterminés avec exactitude. Les sites et le niveau de réplication dépendraient en fait de l'hôte (Wells *et al.*, 1998). L'hypothèse suivante est la plus plausible dans l'état actuel des connaissances. L'iléon distal semble être la voie d'entrée de l'agent de l'ESB. Dans un premier stade, l'agent de l'ESB se répliquerait dans les cellules du système réticulo-endothélial, mais aucune preuve n'a encore été apportée à l'infection de ces cellules par l'agent de l'ESB, contrairement à la tremblante du mouton ou à la maladie du dépérissement chronique des cervidés (Hadlow *et al.*, 1982 ; Sigurdson *et al.*, 1999). Le chemin emprunté par l'agent de l'ESB, pour atteindre le système nerveux central, serait le système nerveux périphérique autonome (Wells, 2003) ; comme cela est déjà démontré chez la souris pour la tremblante (Kimberlin and Walcker, 1980).

**Lésions** : Les modifications histologiques qui sont observées sont typiques : lésions microscopiques dans le système nerveux central qui consistent en une spongiose symétrique, bilatérale et non inflammatoire du neuropile de la substance grise, une astroglie et une vacuolisation des corps cellulaires des neurones (Wells *et al.*, 1989 ; Bradley & Wilesmith, 1991 ; Botteron, 2002).

**Signes cliniques** : La maladie affecte les bovins adultes, avec un pic de fréquence situé à 4-5 ans (Wilesmith, 1998). A ce jour, le plus jeune bovin atteint cliniquement d'ESB était âgé de 20 mois et le plus vieux était âgé de 19 ans et 9 mois (Department for Environment, Food & Rural affairs, 2002). Toutefois, l'ESB est rarement observée chez des animaux âgés de moins de 30 mois (Wilesmith, 1998). La durée de la maladie clinique, depuis les signes cliniques les plus précoces jusqu'à la mort ou la mise à mort, peut être inférieure à deux semaines (Kimberlin, 1992 ; Wells *et al.*, 1995 ; Saegerman *et al.*, 1999 ; McElroy & Weavers, 2001) ou se prolonger jusqu'à une année (Kimberlin, 1992). La durée moyenne est d'un ou deux mois environ (Kimberlin, 1992). La fréquence des signes cliniques neurologiques observés chez 164 771 bovins atteints d'ESB a été déterminée par Wilesmith (1998). Dans plus de 50 % des cas, on observe les troubles et les anomalies suivants : (i) troubles psychiques : crainte, modification du tempérament, position anormale des oreilles et comportement anormal ; (ii) troubles de la sensibilité : réponse exagérée aux stimuli, léchage excessif ; (iii) anomalie de la posture et des mouvements : ataxie et tremblements. Une grande majorité d'animaux malades présentent des signes cliniques entrant dans ces trois catégories. De plus, certains signes généraux peuvent être associés à l'ESB : altération de l'état général, amaigrissement et une diminution de la production laitière. Des variations considérables dans la présence et la gravité des signes cliniques pris individuellement ont été constatées. Si les animaux sont maintenus dans un environnement calme et familier, la gravité des signes cliniques, particulièrement l'hyperesthésie, est diminuée. Après quelques semaines, les signes cliniques conduisent progressivement à des chutes répétées, puis à un décubitus permanent et enfin à la mort (Kimberlin, 1992).

Des données expérimentales (Wells *et al.*, 1998) et cliniques suggèrent l'existence de formes sub-cliniques de maladies à prions avec un impact important en santé animale et publique (Hill *et al.*, 2000 ; Race *et al.*, 2001 ; Hill & Collinge, 2003).

**Mode de dépistage** : La détection de l'ESB repose sur l'observation des signes cliniques (Wilesmith, 1998) et/ou nécessite une surveillance active basée sur la mise en évidence de la protéine prion anormale PrP<sup>sc</sup> par des tests immunologiques rapides effectués sur des prélèvements réalisés au niveau du système nerveux central des animaux et ce, *post mortem* ou lors de leur abattage (Moynagh & Schimmel, 1999 ; Morignat *et al.*, 2002). Le diagnostic de confirmation repose sur un examen histologique du système nerveux central démontrant l'aspect spongiforme de l'encéphale, sur l'extraction et l'examen des fibrilles associées à la scrapie (scrapie associated fibrils, SAF), sur l'immunocytochimie ou sur le western-blot (Kimberlin, 1992 ; Wilesmith, 1998).

Les tests immunologiques rapides permettent de réduire les manipulations et de dépasser la limite de temps inhérente aux délais d'obtention des résultats des examens conventionnels de

confirmation. Toutefois, seule leur réalisation post-mortem est envisageable actuellement chez des bovins abattus ou délivrés au clos d'équarrissage (Commission européenne, 1999 ; 2003). Actuellement, cinq méthodes sont utilisables en tant que tests rapides *post-mortem* (Commission européenne, 2003a ; 2003b) : (i) un test basé sur la technique du western blot pour la détection de la fraction résistante aux protéases PrP<sup>Res</sup> (test Prionics-Check western) ; (ii) un test ELISA en chimioluminescence faisant appel à une méthode d'extraction et utilisant un réactif chimioluminescent renforcé (test Enfer) ; (iii) un immunodosage de la PrP<sup>Res</sup> par la méthode immunométrique à deux sites, dite méthode « en sandwich », après dénaturation et concentration (test Bio-Rad TeSeE, précédemment appelé test Bio-Rad Platelia) ; (iv) un immunodosage sur microplaques (ELISA) pour la détection de la PrP<sup>Res</sup> résistant aux protéases avec anticorps monoclonaux (test Prionics Check LIA) ; (v) un immunodosage automatisé dépendant de la conformation, qui compare la réactivité d'un anticorps de détection aux formes de PrP<sup>Sc</sup> sensibles et résistantes à la protéase (certaines fractions de la PrP<sup>Sc</sup> résistante à la protéase sont équivalentes à la PrP<sup>Res</sup>) et à la PrP<sup>Sc</sup> (test InPro – CDI-5).

**Moyens de lutte** : Une multitude de mesures de santé publique vétérinaire ont été prises par les autorités en ce qui concerne l'ESB. Ces mesures ont été coordonnées par la Commission européenne par le biais de règlements et de décisions (directement applicables par les Etats membres). Les plus importantes sont (liste non exhaustive) : l'interdiction d'utilisation des farines de viandes et d'os dans l'alimentation des ruminants (Commission européenne, 1994) ; l'application de paramètres de production dans les clos d'équarrissage (Commission européenne, 1996) ; le retrait des matériels à risque spécifiés (Commission européenne, 1997) ; l'instauration d'un réseau d'épidémiosurveillance clinique (surveillance dite « passive ») avec déclaration obligatoire des cas d'ESB (Commission européenne, 1998) ; l'interdiction totale d'utilisation de farines de viandes et d'os dans l'alimentation des mammifères (Conseil européen, 2000) et l'instauration d'un réseau d'épidémiosurveillance dite « active », avec mise en place des tests rapides de dépistage (Commission européenne, 2001).

**Situation épidémiologique** : La situation épidémiologique peut être envisagée en tenant compte de trois années critiques : la première notification de l'ESB au Royaume-Uni en 1986 (Wells *et al.*, 1987), le premier diagnostic en Europe continentale, en 1990, en Suisse (Cachin *et al.*, 1991) et la mise en œuvre des tests rapides ESB sur les carcasses à l'abattoir en 2001 dans les Etats membres classifiés dans la catégorie III après une évaluation du risque géographique d'exposition à l'agent de l'ESB (pays dans lesquels des cas d'ESB sont possibles mais non confirmés ou confirmés à un faible niveau) (Thiry *et al.*, 2004).

L'émergence de l'ESB a eu lieu au RU en 1986. Le pic d'incidence a été observé en 1992-1993 (72370 cas). Le rôle des farines de viandes et d'os a été clairement suspecté dans la

transmission de l'ESB et les premières mesures de prévention ont été mises en place en 1988 (Kimberlin, 1992). Les effets de ces mesures ont été visibles en 1994 (décroissance de l'incidence). Rétrospectivement, l'analyse de la courbe épidémique a permis d'estimer à 5 ans la moyenne de la période d'incubation de l'ESB chez le bovin. L'allure de la courbe épidémique au RU n'est pas le reflet d'une évolution naturelle de la maladie mais bien le résultat de l'application de mesures de contrôle. La règle d'exclusion des bovins abattus âgés de plus de 30 mois de la consommation humaine a été introduite en 1996 au RU (Arnold et Wilesmith, 2003). En 2003, un total de 612 nouveaux cas d'ESB ont été diagnostiqués dans le même pays. Plusieurs hypothèses ont été proposées à propos de l'origine de ces cas (liste non exhaustive) : le respect insuffisant des mesures de contrôle, la transmission maternelle ; une voie de transmission non alimentaire, ou la réussite émergente de cas sporadiques.

En 1989, les premiers cas ont été identifiés en Irlande en raison de la proximité avec le RU (échanges commerciaux) (Griffin *et al.*, 1997). D'autres cas importés du RU ont été diagnostiqués la même année dans les îles Falkland et au Sultanat d'Oman (Wilesmith, 1998). L'ESB a été diagnostiquée dans la plupart des Etats membres, pour la première fois, dans les années nonante. Certains pays européens ont déclaré des cas d'ESB seulement à partir de 2001. Une variabilité existait dans la qualité des réseaux d'épidémiologie en Europe. Celle-ci s'est amenuisée à la fin 2000 et, plus encore, en 2001, avec la mise en œuvre des tests rapides de dépistage de l'ESB (Pastoret *et al.*, 2001). Dans les pays non européens, où des cas importés sont exclus, la maladie a été identifiée plus récemment (tableau 1).

En Belgique, une diminution d'incidence a été constatée en 2002 et en 2003. La même évolution a été observée en France et dans plusieurs pays européens. Cela pourrait être le résultat des mesures de contrôle prises antérieurement. Cependant, comme l'ESB est un événement rare, distribué dans une grande population de bovins, il est difficile de savoir si cette tendance est significative.

Une situation épidémiologique difficile est observée dans les pays qui ont montré une augmentation d'incidence : Irlande, Espagne et Portugal (Thiry *et al.*, 2004). Cette caractéristique indique que les bovins ont été infectés par l'agent de l'ESB plus tardivement que les autres pays et il est, par conséquent, difficile de savoir si le contrôle des mesures prises envers l'ESB dans ces pays a été suffisant.

**Apparition de cas « atypiques »** : Des cas d'ESB subcliniques, dits « atypiques », ont été enregistrés au Japon chez deux bovins sains âgés de 21 et 23 mois (Yamakawa *et al.*, 2003). Ces cas sont atypiques en raison de profils histopathologiques et biochimiques particuliers. Des formes subcliniques et atypiques similaires ont également été enregistrées en France (Biacabe *et al.*, 2004), en Italie (Casalone *et al.*, 2004) et en Belgique (De Bosschere *et al.*,



2004) chez des bovins âgés et cliniquement sains. Trois cas atypiques, observés en France, ont présenté le même profil électrophorétique de la protéine prion PrP<sup>res</sup> mais celui-ci était différent du profil rencontré chez les cas d'ESB classique. Ce même profil a été observé chez un bovin infecté expérimentalement par voie intracérébrale, au Royaume-Uni, par l'agent de la tremblante du mouton. La séquence génomique prn-p-gen (qui code pour la protéine PrP) est identique chez les cas atypiques et typiques d'ESB (Biacabe *et al.*, 2004). En ce qui concerne les 2 cas d'ESB atypiques italiens, la présence de plaques amyloïdes dans des zones inhabituelles de l'encéphale (maladie dénommée BASE pour bovine amyloidotic spongiform encephalopathy) suggère que les bovins aient pu contracter la maladie par une voie non alimentaire (Casalone *et al.*, 2004). En ce qui concerne le cas belge, il s'agit d'un bovin âgé de 64 mois. Le profil électrophorétique est similaire au cas japonais (De Bosschere *et al.*, 2004). Les informations obtenues à propos de ces cas d'ESB dits « atypiques » pourraient être indicatives d'une souche particulière d'ESB dont la forme est sub-clinique, dont la distribution d'âge de l'hôte serait étendue et dont la voie de contamination pourrait être non alimentaire. L'identification de ces cas pourrait modifier l'épidémiologie de l'ESB s'ils étaient attribués à de nouvelles souches d'ESB (Thiry *et al.*, 2004).

### **3.1.2. Contamination environnementale par des biphényles polychlorés et des dioxines : la persistance d'un événement rare**

#### **3.1.2.1. Les incidents chimiques en général**

**Le contexte mondial** : Les situations d'urgence à caractère chimique et les incidents chimiques ainsi que les flambées de maladies pouvant être causées par des substances chimiques constituent d'importantes questions pour la santé publique de tous les pays (OMS, 2004). Certains pays ont introduit des systèmes de détection des émissions manifestes de produits chimiques en vue de prendre des mesures appropriées. Très peu de pays ont toutefois mis sur pied des systèmes permettant de détecter des émissions « silencieuses » de substances chimiques. De ce fait, la nature, la fréquence, l'ampleur et les conséquences pour la santé publique des émissions chimiques sont mal connues à travers le monde. Depuis décembre 2001, un programme international sur la sécurité chimique (IPCS) a été mis en place pour combler cette lacune. L'IPCS a lancé trois activités : (i) l'élaboration d'un réseau mondial de communication baptisé « ChemiNet » ; (ii) l'élaboration d'un système mondial d'alerte et de surveillance concernant les incidents chimiques et (iii) l'élaboration d'une base de données internationale sur les incidents chimiques revêtant une importance pour la santé publique<sup>12</sup>. Cette dernière est alimentée par l'information obtenue de différentes sources : (i) l'accès à

<sup>12</sup> tout incident intéressant la santé publique ou l'environnement qui entraîne une exposition effective ou potentielle à une substance chimique ou à des dérivés dangereux d'une substance chimique causant ou susceptible de causer des problèmes de santé à l'homme.

ProMed Mail ; (ii) l'accès à un moteur de recherche fourni par Santé Canada qui passe au crible les informations (GPHIN) ; et (iii) l'accès à des centres plus spécialisés qui utilisent à la fois des correspondants locaux et des moteurs de recherche Internet, comme le *Hazards Intelligence* et le *Chemical Incident Report Centre* (CIRC). Ainsi, par exemple, l'IPCS a recensé 119 incidents chimiques intéressant la santé publique en Europe entre août 2002 et juillet 2003 (tableau 3).

**Tableau 3. Types et lieux où surviennent les incidents chimiques intéressant la santé publique en Europe (août 2002 à juillet 2003)**

Lieux d'incidents	Nombre	Type d'incidents	Nombre
Installations industrielles	30	Explosion	24
Transports	23	Fuite	21
Installations commerciales	14	Incendie	20
Locaux affectés à l'éducation	10	Emission	16
Environnement	10	Déversement	15
Milieux résidentiels	9	Intoxication	4
Lieux ouverts	5	Entreposage	3
Exploitations agricoles	1	Autre	15
Installations de santé	1	Inconnu	1
Autres	13		
Inconnus	3		
<b>Total</b>	<b>119</b>	<b>Total</b>	<b>119</b>

**Le contexte européen** : La Commission européenne a récemment arrêté son plan d'action « Environnement et santé » couvrant la période 2004-2010 afin de mieux comprendre et de mieux aborder les risques que pose la dégradation environnementale sur la santé publique ([http://europe.eu.int/comm/environment/health/index\\_en.htm](http://europe.eu.int/comm/environment/health/index_en.htm)) (Commission européenne, 2004). Ce plan est dénommé SCALE (Science, Children, Awareness raising, Legal instruments and Evaluation). Il vise le groupe à risque des enfants puisque, selon de récentes estimations de l'OMS et de l'Agence européenne de l'environnement, un sixième des mortalités chez l'enfant est attribué à la pollution. Les contaminants environnementaux par des métaux lourds (par exemple, le plomb) ou des polluants organiques persistants (par exemple, les dioxines) induisent des effets néfastes sur le développement du système nerveux et le comportement des enfants (OMS, 2002).

**Le contexte belge** : Après la crise PCBs de 1999 (Bernard *et al.*, 1999), les autorités belges ont décidé de créer une Agence fédérale pour la Sécurité de la chaîne alimentaire (AFSCA) et un nouveau système de surveillance des contaminants a été mis en place dès le 1<sup>er</sup> janvier 2000 (COntaminant SURveillance system, CONSUM). Celui-ci doit permettre d'évaluer les risques présentés par les contaminants dans l'ensemble de la chaîne alimentaire. Il est actuellement basé sur les actions suivantes : (i) un monitoring permanent des matières

premières critiques ; (ii) un monitoring par sondage et une obligation de traçabilité de la fabrication de lots d'aliments composés ; (iii) des enquêtes multidisciplinaires ciblées dans les exploitations agricoles présentant un risque particulier et l'introduction d'un statut contaminant ; (iv) un monitoring par sondage de la première transformation et de la distribution ; (v) un système global de traçabilité dans l'industrie alimentaire ; et (vi) un scénario à appliquer en cas de constat de contamination (y compris un plan d'urgence) (Saegerman *et al.*, 2000). En 2000, le programme CONSUM concernait les PCBs/dioxines et, depuis 2001, il a été étendu aux contrôles de la présence d'une série d'autres contaminants (notamment les mycotoxines, les métaux lourds, les protéines animales transformées et les nitrates) (AFSCA, 2002). Le regroupement de toutes les analyses programmées par l'AFSCA sous un format unique rend compte du niveau d'intégration des différents services de l'AFSCA dans une structure unifiée. Les résultats globaux des programmations PCBs/dioxines sont le reflet d'une situation stable avec un taux de dépassement des normes de moins de un pour mille en ce qui concerne les PCBs et de moins de un pourcent en ce qui concerne les dioxines (tableau 4). Ceci correspond à la définition des événements rares (Toma, 1998). L'origine des dépassements fait l'objet d'investigations (AFSCA, 2002). Lorsqu'il a été possible d'en trouver la cause, il s'agissait de contaminations environnementales principalement dues à des activités industrielles et domestiques (Debongnie *et al.*, 2000 ; Debongnie *et al.*, 2002 ; AFSCA, 2002 ; Pussemier *et al.*, 2004).

Globalement, une augmentation et une réorganisation spectaculaire des contrôles des denrées alimentaires a été constatée suite à la crise PCBs de 1999, au profit de la population pour qui la chaîne alimentaire n'a jamais été aussi sécurisée en ce qui concerne les dioxines et les PCBs (Focant *et al.*, 2002).

**Tableau 4 : Résultats <sup>a</sup> des programmations PCBs/dioxines au sein de l'AFSCA (Belgique, années 2000-2002)**

Contaminant <sup>b</sup>	Année	Nombre d'échantillons		% (IC 95 %) <sup>c</sup>	
		Testés	Positifs		
Dioxines	2000	1422	29	2,049	( 1,370- 2,916)
	2001	1111	13	1,170	( 0,624- 1,993)
	2002	998	10	1,002	( 0,481- 1,835)
PCBs	2000	12918	12	0,093	( 0,048- 0,016)
	2001	11286	6	0,053	( 0,020- 0,116)
	2002	11867	8	0,067	( 0,029- 0,133)

<sup>a</sup> d'après les rapports d'activités de l'AFSCA ; <sup>b</sup> l'analyse des PCBs est basée sur le dosage de 7 congénères (numéros IUPAC 28, 52, 101, 118, 138, 153 et 180) et celle des dioxines sur le dosage de 7 congénères PCDDs et 10 congénères PCDFs possédant tous des atomes de chlore en position 2,3,7 et 8 ; <sup>c</sup> binomiale exacte.

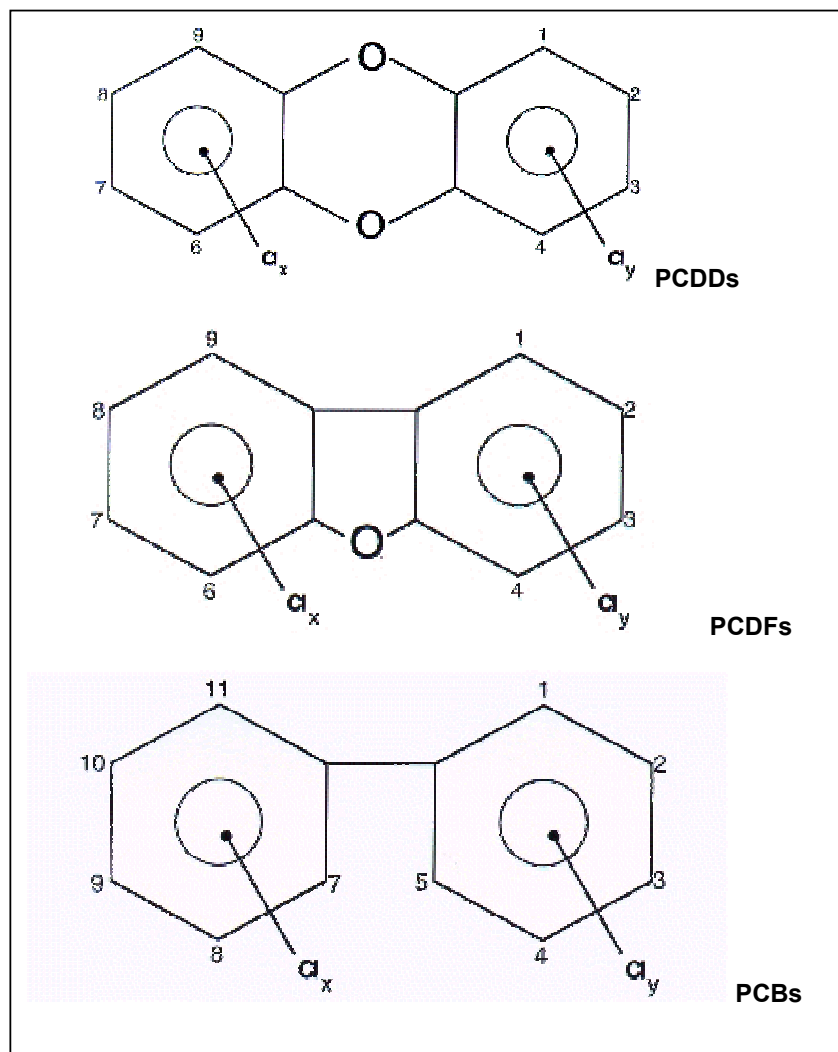
### 3.1.2.2. Les PCBs/dioxines en particulier

La contamination accidentelle de la chaîne alimentaire la plus grave qu'ait connue la Belgique ces dernières années remonte à la période comprise entre le 19 et le 26 janvier 1999 (Focant *et al.*, 2002). A l'origine de cette contamination, l'introduction d'un lot de graisse recyclée, contaminée par des huiles minérales contenant des PCBs et une quantité moindre de dioxines (huile de transformateurs Aroclor 1260/1254) (Bernard *et al.*, 2002). Cette graisse avait été livrée par une firme à plusieurs fabricants d'aliments composés pour animaux. Début février, les premiers signes cliniques furent observés dans des élevages industriels de volaille (espèce la plus sensible) : chute de production des œufs, troubles de l'éclosion, poussins présentant une nette diminution du gain pondéral et un taux inhabituel de mortalité. Ces animaux présentaient, en outre, un tableau clinique particulier associant ascite, oedème sous-cutané prédominant dans la région cervicale ainsi que de l'ataxie (Bernard *et al.*, 1999 ; Hermans *et al.*, 1999). Ce tableau clinique évoquait le syndrome de la maladie oedémateuse du poussin décrit aux Etats-Unis et au Japon (Firestone, 1973 ; Harris *et al.*, 1972 ; Kahonawa *et al.*, 1969). C'est seulement fin mai que l'affaire fut révélée au public, ce qui engendra une crise économique et politique sans précédent (Focant *et al.*, 2002). Bien que des incertitudes subsistent, plusieurs évaluations de risque ont conclu à un faible impact de cet incident sur la santé publique (Bernard *et al.*, 1999 ; 2002 ; Vrijens *et al.*, 2002). D'autres incidents chimiques intéressant la santé publique ont été relevés, ailleurs, dans le monde (liste non exhaustive) : de 1961 à 1971, des herbicides contaminés par des dioxines ont été déversés intentionnellement en grandes quantités sur les forêts sud-vietnamiennes (LaVecchio *et al.*, 1983) ; en 1976, à Seveso (Italie), une explosion dans une usine de trichlorophénol a libéré dans l'atmosphère une grande quantité de dioxines (Garattini, 1977) ; en 1969, à Yusho (Japon) et en 1979, à Yu-Cheng (Taiwan), des fluides à base de PCBs utilisés comme échangeur thermique lors du procédé de fabrication et des PCDFs issus de la dégradation thermique des PCBs, ont été incorporés à de l'huile de riz (Kohanawa *et al.*, 1969 ; Masuda, 1994 ; Yao *et al.*, 2002) ; et en 1979, dans le Montana (USA), une pollution aux PCBs a été constatée suite à une fuite d'un transformateur électrique endommagé dans un abattoir de porcs (Drotman *et al.*, 1983).

**Propriétés physico-chimiques des dioxines** : Ces molécules ont une structure chimique aromatique polycyclique et planaire (figure 2). Les deux cycles distaux sont reliés entre eux soit directement (biphényles polychlorés ; polychlorinated biphenyls, **PCBs**) ou par l'intermédiaire d'un (dibenzofuranes polychlorés ; polychlorinated-dibenzo-furans, **PCDFs**) ou de deux (dibenzodioxines polychlorés ; polychlorinated-dibenzo-*p*-dioxins, **PCDDs**) atomes d'oxygène. Les congénères (membres) de chacune de ces 3 familles diffèrent par le nombre et la position des atomes de chlore. Ainsi, la 2,3,7,8 tétrachoro-para-dibenzodioxine (TCDD), encore appelée dioxine de Seveso, possède 4 atomes de chlore aux positions 2, 3, 7 et 8. C'est le composé le

plus toxique. Il y a 75 PCDDs, 135 PCDFs et 209 PCBs dont seuls 12 composés ont une activité dioxine (PCBs coplanaires). Chaque congénère porte un numéro attribué par un organisme de normalisation (International Union of Pure and Applied Chemists, IUPAC). La comparaison de la toxicité des dioxines entre elles est basée sur le concept du facteur d'équivalence toxique (toxicity equivalent factor, TEF). Un composé qui se lie au récepteur aryl hydrocarboné, qui a des effets biologiques semblables à la TCDD et qui subit la bioaccumulation sera considéré comme « dioxin-like ». Sa toxicité est comparée à celle de la TCDD, dioxine la plus toxique, cette dernière étant dotée d'un TEF de 1. Le TEF admis par l'OMS (WHO-TEF), multiplié par la concentration mesurée dans un milieu donné, permet d'obtenir une quantité d'équivalent toxique (TEQ), utilisée dans l'évaluation du risque lié aux dioxines pour la santé humaine et pour l'environnement (voir point 3.4.). Les PCBs, PCDDs, PCDFs sont peu solubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques et dans les graisses.

**Figure 2 : Structure générale des polychlorodibenzodioxines (PCDDs), polychlorodibenzofuranes (PCDFs) et polychlorobiphényles (PCBs).**



**Sources de contamination** : Les PCBs ne sont pas retrouvés naturellement dans l'environnement. Ils ont été synthétisés en grande quantité en raison de leur propriétés physico-chimiques intéressantes (inertie chimique, tension de vapeur basse) mises à profit dans de nombreuses applications industrielles (exemples : isolants électriques, lubrifiants, liquides de refroidissement, retardateurs de flamme, agents de suspension). Depuis 1986, en raison de leur haute toxicité, leur utilisation n'est plus tolérée en Belgique que dans les condensateurs et les transformateurs électriques et ce, jusqu'en 2015, date de leur interdiction totale (Focant *et al.*, 2002). Au contraire des PCBs, les PCDDs et les PCDFs ne sont pas fabriqués intentionnellement. Les sources de dioxines sont synthétisées soit *de novo* ou à partir de précurseurs. La synthèse *de novo* se fait à partir d'atomes de carbone, d'oxygène, de chlore et d'hydrogène (volcans, incendies de forêts, orages). La synthèse à partir de précurseurs est active dans de nombreuses circonstances, notamment lors de combustion incomplète. Parmi les précurseurs, on trouve le trichlorophénol, une molécule utilisée dans la fabrication de produits industriels, d'insecticides organochlorés, de fongicides<sup>13</sup> aujourd'hui interdits (pentachlorophénol et hexachlorobenzène) et d'herbicides (2,4-D et 2,4,5-T). Il semble bien que le trichlorophénol soit la principale source de formation atmosphérique d'octachlorodibenzo-*p*-dioxine (OCDD) et, par là, de la prédominance de ce congénère dans le sol partout dans le monde (lorsqu'il n'y a pas localement d'autre source avérée de pollution) et dans de nombreuses matrices naturelles dont les aliments (Baker *et al.*, 2000). On retrouve également comme précurseurs, les PCBs. Leur combustion, voire leur chauffage en présence de métaux jouant le rôle de catalyseurs, peut libérer des quantités importantes de PCDDs et surtout de PCDFs. Les sources principales de production de dioxines sont (ordre décroissant d'importance) : l'industrie métallurgique (seconde fusion), l'incinération des déchets ménagers et industriels, les combustions domestiques (chaudières) et le trafic routier (combustion de l'essence plombée). Les dioxines sont également produites lors du blanchiment de la pâte à papier à l'aide du chlore. On les retrouve donc partout, en particulier dans les pays industrialisés. Leur émission peut être diminuée grâce à une meilleure technologie d'incinération des déchets ou en roulant à l'essence sans plomb, mais leur totale élimination est impossible. Dès lors, une évaluation des risques pour la santé publique que comporte l'existence de ces composés chimiques dans notre environnement et notre alimentation est indispensable (voir point 3.4.). En Belgique, la Vlaams Milieumaatschappij (2004) avance des chiffres de diminution des émissions (sidérurgie, incinérateurs industriels) aussi élevés que 80%. En conséquence, parmi les sources dominantes actuelles, on peut également citer le chauffage (charbon, bois) et l'incinération domestique (déchets).

<sup>13</sup> Des contaminations par le pentachlorophénol et l'hexachlorobenzène sont encore mentionnées dans la littérature scientifique (Feil *et al.*, 2000 ; Huwe *et al.*, 2004).

**Voies d'exposition** : Elles sont multiples car les dioxines sont fortement liposolubles et peuvent donc pénétrer facilement à travers les muqueuses (Maghuin-Rogister *et al.*, 1999). Cependant, la contamination par voie orale est la plus importante et la plus dangereuse. L'inhalation de dioxines ne donne lieu qu'à de faibles taux d'absorption étant donné leur faible pression de vapeur (Osweiler, 1996). Il en est de même pour la voie cutanée étant donné que les dioxines sont surtout solubles dans les triglycérides et beaucoup moins dans les phospholipides (Casarett *et al.*, 1996). Environ 90 % de l'apport total journalier en dioxines provient de l'alimentation (Maghuin-Rogister *et al.*, 1999). Les contributions relatives des trois principaux groupes de denrées alimentaires d'origine animale, à savoir la viande et dérivés, les produits de la mer, le lait et les produits laitiers, sont considérées actuellement comme équivalentes entre elles (Focant *et al.*, 2002).

**Toxicité** : Une fois absorbées et véhiculées par les lipides du sang, les dioxines s'accumulent en priorité dans le foie et bien sûr, très vite, dans les tissus gras. Les dioxines ne sont que faiblement métabolisées, car elles constituent de mauvais substrats pour les enzymes de la biotransformation. Quelques métabolites ont été identifiés (formes glucuroconjuguées) et l'élimination est principalement biliaire et fécale. La demi-vie des dioxines est d'environ 7 années chez l'homme adulte (Maghuin-Rogister, 1999). De manière générale, plus on monte dans la chaîne alimentaire, plus la demi-vie augmente (Delaunois, 1998). Le mécanisme d'action des dioxines semble à présent bien connu et peut être assimilé à celui de certaines hormones. Il s'agit d'un mécanisme d'action intracellulaire. Lorsqu'elles ont pénétré à l'intérieur des cellules, elles interagissent avec un récepteur protéique cytoplasmique, appelé récepteur « aryl hydrocarbure » (Ah), présent dans un grand nombre de tissus chez diverses espèces animales, y compris l'homme (Focant *et al.*, 2002). L'affinité du récepteur Ah humain pour les dioxines est toutefois plus faible que celle du récepteur des rongeurs, ce qui expliquerait les différences de sensibilité entre ces espèces (Okey *et al.*, 1994). Ce récepteur serait indispensable au développement du foie et du système immunitaire, qui constituent justement les deux principaux organes-cibles des dioxines. Il intervient également dans les processus homéostatiques, dans la croissance et la différenciation cellulaires. Le complexe formé avec le récepteur Ah agit comme un facteur de transcription qui, via la synthèse de diverses protéines, induit un large spectre de réponses toxiques et perturbe de multiples voies endocriniennes. Le récepteur Ah semble exercer une action anti-oestrogénique, dont les mécanismes précis ne sont qu'en partie élucidés (Maghuin-Rogister, 1999) et joue un rôle dans les effets tératogène et carcinogène des dioxines (Gonzalez & Fernandez-Salguero, 1998). L'OMS fixe une dose journalière tolérable (DJT), calculée pour les dioxines, en divisant par 10 la dose sans effet indésirable observé (DSEIO) pour le paramètre toxicologique le plus sensible chez l'espèce la plus sensible. Actuellement, elle recommande une DJT de 1 à 4 pg/kg de poids vif et par jour, 4 étant la DJT à respecter et 1, l'objectif à atteindre. Les effets des dioxines ont été décrits soit

chez l'homme, suite à des études épidémiologiques rétrospectives, soit chez les animaux de laboratoire. Elles sont hépatotoxiques (Osweiler, 1996) et immunotoxiques (Roeder *et al.*, 1998) ; elles ont des effets sur le système reproducteur (Mayani *et al.*, 1997 ; Mann, 1997 ; Wissing, 1998 ; Safe *et al.*, 1998) et sur la thyroïde (Nagayama *et al.*, 1998) ; elles ont des effets tératogènes (Bryant *et al.*, 1997 ; Abbott *et al.*, 1999), carcinogènes (Mann, 1997 ; McGregor *et al.*, 1998 ; Steenland *et al.*, 1999 ; Steenland *et al.*, 2004) ; elles induisent des effets généraux tels qu'une perte de poids (Osweiler, 1996 ; Headrick *et al.*, 1999), une chloracné (hyperkératose avec formation de comédons et alopécie) (Gianotti, 1977), une prévalence accrue de maladies cardiovasculaires (Steenland *et al.*, 1999), une incidence augmentée de diabète sucré (Henriksen *et al.*, 1997), une diminution des fonctions cognitives et psychomotrices lors de la petite enfance (Patandin *et al.*, 1999 ; MacLusky *et al.*, 1998).

**Méthodes d'analyses** : Les signes cliniques ne suffisent pas pour établir un diagnostic et le recours à une analyse de laboratoire est nécessaire pour confirmer la présence de dioxines dans les tissus (foie, graisse), dans le sang ou dans le lait. L'analyse comprend d'abord une extraction suivie de plusieurs étapes de purification et de concentration de l'échantillon. Ensuite, trois types d'analyses peuvent être effectuées : (i) un dosage physico-chimique tel que, par exemple, une chromatographie en phase gazeuse (gas chromatography, GC) couplée à une spectrométrie de masse avec ou sans haute résolution (GC-HRMS, GC-MS), ou couplé à une détection par capture d'électron (GC-ECD) ; (ii) un dosage immunologique à l'aide d'un test ELISA (Johnson & Van Emon, 1994) ; ou (iii) un dosage biologique de l'activité du récepteur Ah (culture cellulaire d'hépatocytes de souris ou de rat modifiés génétiquement où le gène rapporteur de la luciférase<sup>14</sup> est exprimé sous le contrôle d'un promoteur régulé par le récepteur Ah). Dans le dernier cas, l'activité de toutes les substances qui interagissent avec le récepteur Ah est dosée.

**Traitement, évaluation et prévention des risques** : Il n'existe pas d'antidote aux dioxines. L'idéal est donc de prévenir et de limiter l'exposition de la population aux dioxines, en réduisant les sources de contamination (limiter les émissions de dioxines à partir d'incinérateurs industriels et domestiques, rouler avec de l'essence sans plomb, imposer des procédures d'autocontrôle dans les industries, etc) et en recommandant de meilleures habitudes alimentaires, tant pour les animaux que pour les humains. Par exemple, le fait de diversifier les aliments, de consommer des viandes maigres ou du lait écrémé diminue déjà le risque d'exposition (Maghuin-Rogister, 1999). L'effet des mesures de prévention prises peut être contrôlé en procédant régulièrement à des évaluations des risques (voir point 3.4.).

---

<sup>14</sup> En présence du substrat (composés chimiques à activité dioxine), ils produisent un signal luminescent, proportionnel à l'activation du récepteur Ah. Ce signal est mesuré avec un luminomètre et converti en valeur TEQ par comparaison directe avec une courbe d'étalonnage obtenue avec la TCCD (Overmeire *et al.*, 2002).



### 3.1.3. Brucellose bovine : la disparition d'un événement devenu rare

#### 3.1.3.1. Etiologie, importance et répartition

La brucellose bovine demeure une zoonose d'importance et de répartition mondiales ; son incidence annuelle est estimée à environ 4 à 5 x 10<sup>5</sup> cas humains (Alvarez, 2001). Elle est rare en Amérique du Nord, en Europe et en Australie mais demeure un problème majeur dans le bassin méditerranéen, dans le Golfe Persique, dans l'ouest de l'Asie, dans des régions d'Afrique et d'Amérique du Sud (Corbel, 1997). Des estimations officielles ont chiffré les pertes économiques en Amérique latine à 600 millions de dollars (Acha & Szyfres, 1989). La forme la plus répandue de brucellose bovine est causée par *Brucella abortus*, un cocco-bacille Gram négatif (de 0,6 à 1,5 µm sur 0,5 à 0,7 µm), asporulé et aérobie strict. C'est un pathogène intracellulaire facultatif qu'il est possible de subdiviser en 7 biotypes (notés 1 à 6 et 9), principalement sur base de l'exigence en CO<sub>2</sub>, de la production d'H<sub>2</sub>S, de la sensibilité aux colorants (thionine et fuchsine basique) et de l'agglutination par des sera spécifiques (Alton *et al.*, 1988). *B. abortus* est sensible à la pasteurisation. Sa survie hors de l'hôte dépend des conditions environnementales ; elle est prolongée à basse température (Nicoletti, 1980). Elle peut survivre 30 jours dans l'urine, 75 jours dans un fœtus, plus de 200 jours dans des exsudats utérins, 3 mois dans les fèces, plus de 8 mois dans des fosses à purin et de 10 à 70 jours dans l'eau (Plommet M., 1972 ; OMS, 1986).

En Amérique du Sud (Brésil et Colombie), des infections de bovins par *Brucella suis* ont été décrites (Corbel, 1997). Un cas similaire a été décrit au Danemark (Andersen & Pedersen, 1995). Par contre, des infections à *Brucella melitensis*, avec une évolution similaire à *B. abortus* ont été observées dans plusieurs pays (Verger *et al.*, 1989). *B. abortus* infecte essentiellement les bovins mais d'autres espèces domestiques et sauvages peuvent être affectées (Herr & Marschall, 1981 ; Acha & Szyfres, 1989 ; Madsen & Anderson, 1995).

#### 3.1.3.2. La maladie chez l'homme

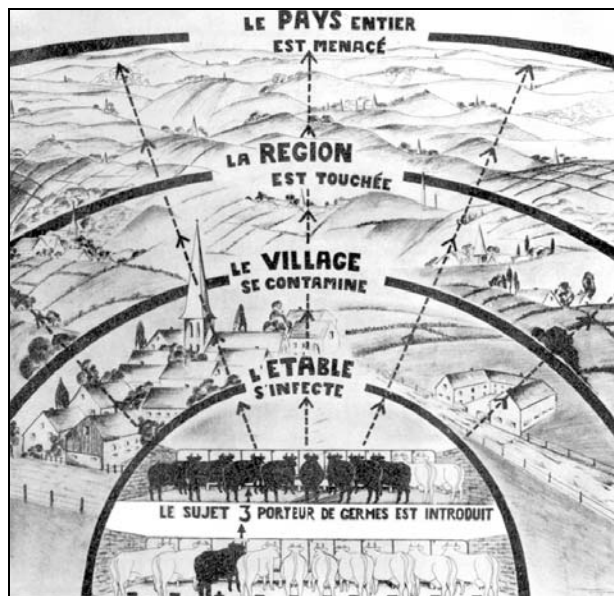
La pathogénicité de *B. abortus* pour l'homme est moyenne. Ce dernier s'infecte par ingestion de produits laitiers non pasteurisés ou par contact direct avec des matériels infectés tels que les fœtus, les placentas et les sécrétions vaginales des animaux infectés ou par inoculation accidentelle de vaccin anti-brucellique. Certains matériels biologiques, tels que des fœtus, sont encore consommés par la population de pays en développement afin de pallier une carence protéique (Ron-Roman, communication personnelle). Après une période d'incubation de 5 jours à deux mois (parfois davantage), les patients présentent typiquement une fièvre intermittente, des tremblements, des douleurs articulaires, des céphalées, une dépression et des sueurs nocturnes (OMS, 1986). Le traitement recommandé par l'Organisation mondiale de la Santé consiste en une antibiothérapie d'une durée de 6 semaines au moins (doxycycline et

rifampicine ou streptomycine) ; des rechutes sont toutefois observées dans environ 5 % des cas. La maladie peut être mortelle chez moins de 2 % des patients non traités (Benenson, 1995). A l'avenir, les cas de brucellose humaine ayant pour origine des zones de forte endémie impliqueront la mise en place d'outils de prévention spécifiques, reposant prioritairement sur l'information des populations exposées et la mise en place de campagnes de vaccination.

### 3.1.3.3. La maladie chez les bovins

La brucellose bovine est une maladie de la liste B de l'OIE<sup>15</sup> ; elle se caractérise par une contagiosité subtile et déconcertante (figure 3).

**Figure 3.** La brucellose bovine se caractérise par une contagiosité subtile et déconcertante (illustration extraite de la « Revue Vétérinaire », éditée en 1958 par la Fédération de lutte contre les maladies animales du Hainaut)



**Pathogénie :** Les étapes initiales de l'établissement de l'infection sont encore peu connues. Comme dans toute maladie infectieuse, l'initiation de l'infection dépend de facteurs liés à la bactérie (dose, virulence), à l'hôte (résistance naturelle, âge, sexe, état physiologique) et à l'environnement. On ignore par quels mécanismes *Brucella abortus* adhère aux muqueuses (orale, pharyngée, conjonctivale, génitale, intestinale, respiratoire et cutanée) et pénètre leur épithélium (Enright, 1990). Le franchissement de cette première barrière de protection de l'hôte provoque une réaction inflammatoire aiguë dans la sous-muqueuse avec infiltration de neutrophiles et de monocytes. L'efficacité de cette réaction dans le contrôle de l'infection est inconnue. Les bactéries envahissent ensuite, par voie lymphatique, les ganglions régionaux qui drainent le site d'inoculation pour y persister pendant une longue période. On ignore si les

<sup>15</sup> maladie transmissible considérée comme importante du point de vue socio-économique et/ou sanitaire au niveau national et dont les effets sur le commerce international des animaux et des produits d'origine animale ne sont pas négligeables (OIE, 2000).

bactéries se déplacent sous forme libre ou intracellulaire. Si elles ne sont pas éliminées à cette étape, elles se disséminent par le sang, très certainement, sous forme intracellulaire dans des neutrophiles et des macrophages. Il résulte de cette bactériémie une infection d'une grande variété de tissus. *Brucella* est le plus fréquemment isolée des tissus lymphoïdes (en particulier les ganglions lymphatiques rétropharyngiens et rétromammaires), de la glande mammaire et des organes reproducteurs mais d'autres localisations sont possibles (os, articulations, tissu nerveux, yeux) (Payne, 1959 ; Hornitzky & Searson, 1986 ; Corner *et al.*, 1987 ; Enright, 1990). Au cours de son cycle infectieux, *Brucella* survit et se réplique dans les cellules phagocytaires professionnelles que sont les neutrophiles et les macrophages (Meador et Deyoe, 1989) et également dans les cellules non phagocytaires professionnelles de l'épithélium trophoblastique (Canning, 1990 ; Lieutard *et al.*, 1996). On a longtemps cru que le tropisme de *Brucella* pour le tractus génital des ruminants était lié à la présence d'érythritol dans ces tissus (Sangari *et al.*, 1994) mais son rôle a été démenti par la suite (Sangari *et al.*, 1996). Plusieurs études suggèrent que le LPS de *Brucella* serait l'agent responsable de l'avortement. Chez le bovin et le mouton, l'infection du fœtus entraînerait une augmentation du taux de cortisol fœtal conduisant à un shift hormonal responsable à son tour de l'avortement ou de la mise bas prématurée (Enright, 1990).

**Mode de transmission** : La brucellose peut être transmise par des bovins présentant ou non des signes cliniques. Les animaux s'infectent généralement par ingestion de nourriture, d'eau, de colostrum ou de lait contaminé ou par léchage du placenta, de l'avorton, du veau ou de l'appareil génital d'un bovin ayant avorté ou vêlé récemment, les lochies étant particulièrement riches en germes (Nicolleti, 1980). Ces bovins peuvent également s'infecter par la voie conjonctivale (Nicolleti, 1980). La brucellose peut également être transmise *in utero* ou immédiatement après la naissance au veau nouveau-né.

**Signes cliniques** : La brucellose bovine se caractérise d'un point de vue clinique par des troubles de la reproduction : (i) avortement ou mise bas de veaux viables, rétention placentaire, métrite, mammite<sup>16</sup>, infertilité ; (ii) orchite et épidybite avec stérilité fréquente et (iii) par des atteintes articulaires (hygromas brucelliques) plus fréquemment rencontrés en régions tropicales. Tous les stades intermédiaires existent entre l'infection aiguë avec avortement et la résistance à l'infection (Qureshi *et al.*, 1996). L'infection chronique est toutefois la plus fréquente (Acha & Szyfres, 1989). Dans 75 à 90 % des cas, les vaches qui avortent ne le font qu'une seule fois (Acha & Szyfres, 1989). L'avortement provoque l'excrétion de  $10^{12}$  à  $10^{13}$  bactéries (Fensterbank, 1986) alors que  $15 \times 10^6$  de *Brucella* déposées sur la conjonctive des génisses gestantes en infectent 95 % (Plommet, 1984). Théoriquement, la quantité excrétée

---

<sup>16</sup> souvent sub-clinique, avec réduction de la production laitière (Cunningham, 1977).

lors d'un avortement brucellique pourrait infecter de 60.000 à 600.000 femelles gestantes qui à leur tour pourraient infecter d'autres animaux. C'est ce qu'on appelle le « relais-multiplication de l'infection » (Fensterbank, 1986). Il faut, de plus, évoquer l'excrétion plus discrète, mais non moins dangereuse, au moment du vêlage à terme d'une vache infectée qui n'est pas toujours dépistée par la sérologie. Enfin, un pourcentage de génisses nées de mères brucelliques peut, après une phase souvent prolongée de sérologie négative, se révéler être infecté au moment de leur premier vêlage. Sur base d'infections expérimentales, standardisées, de bovins non vaccinés (Philippon *et al.*, 1971 ; Plommet *et al.*, 1973 ; Fensterbank et Plommet, 1979 ; Fensterbank, 1986 ; Saegerman *et al.*, 1994), ce pourcentage a été estimé à 3,5 % (intervalle de confiance 95 % : 0,76 – 10,32 %).

**Lésions** : Des altérations histopathologiques spécifiques, mais variables et inconstantes, peuvent être rencontrées dans les sites d'élection (utérus, placenta, avorton, pis, testicules, hygromas, ganglions lymphatiques) d'animaux brucelliques (Jubb *et al.*, 1993).

**Modes de dépistage** : Le diagnostic clinique des brucelloses est toujours difficile et insuffisant. Le recours au laboratoire s'avère donc indispensable (OMS, 1986). Il a pour but de rechercher l'infection brucellique, d'en connaître la prévalence et sa distribution dans l'espace et dans le temps et, pour les pays où l'éradication est acquise, de surveiller l'absence de recontamination du cheptel. Il met en jeu des épreuves sur le lait, sur le sang et des tests allergiques (voir point 3.2.2.2.), ainsi que de la recherche de l'agent par la bactériologie. Le choix d'une stratégie de testage dépend de la situation épidémiologique de la brucellose bovine dans le pays ou la région considéré. L'isolement des *B. abortus* permet de poser un diagnostic de certitude et le biotypage fournit une précieuse information épidémiologique qui permet de tracer les sources de l'infection, en particulier dans les pays où plusieurs biotypes sont rencontrés (Crawford *et al.*, 1979 ; Fensterbank, 1986).

La description des méthodes de coloration et des milieux de culture pour l'isolement de *B. abortus* ainsi que la description des tests de diagnostic de la brucellose bovine sont disponibles sur le site web de l'OIE à l'adresse suivante : <http://www.oie.int> en consultant le « Manuel des normes pour les tests de diagnostic et les vaccins » (OIE, 2000).

**Moyens de lutte** : La réussite d'un programme de lutte est conditionnée par un consensus des acteurs à propos des critères suivants : l'impact de la maladie sur la santé publique, sur la santé animale et sur l'économie ; le financement ; le changement d'attitude vis-à-vis de la maladie, l'adaptation de la stratégie à la phase du programme et l'évolution des connaissances scientifiques. Il faut reconnaître qu'il s'agit d'une entreprise difficile à cause des incertitudes liées au dépistage, longue du fait des recontaminations, et coûteuse en raison des moyens mis en œuvre et des abattages qu'elle entraîne.

Tout programme de lutte repose, d'abord, sur un recensement des cheptels et des animaux et sur la mise en place d'un réseau d'épidémiosurveillance dont les principaux acteurs sont les éleveurs, les vétérinaires et le personnel des laboratoires. Il consiste en la mise en œuvre de mesures générales (applicables à tout le pays ; par exemple, les contrôles à l'introduction) et de mesures locales (applicables à certaines régions ; par exemple, l'intensification du dépistage). Tout programme de lutte (épidémiosurveillance) doit faire l'objet d'une évaluation régulière et des indicateurs de performance doivent être fixés. Trois modes d'intervention peuvent être envisagés : la prophylaxie médicale, la prophylaxie sanitaire et la prophylaxie médico-sanitaire.

Prophylaxie médicale : Compte tenu de l'incertitude quant au statut infectieux de l'animal traité aux antibiotiques, les programmes d'éradication interdisent leur usage. Cette disposition constitue une protection de la Santé publique, dans la mesure où elle contribue à limiter les risques d'antibiorésistance. Avant la phase finale d'un plan d'éradication, la prophylaxie médicale consiste en la vaccination de groupe du cheptel bovin. Outre les critères d'efficacité et d'innocuité à respecter dans le cadre de la directive européenne 2001/82 (Anom., 2001), un vaccin idéal devrait : (i) conférer une immunité rapide et de longue durée, sous diverses conditions pratiques ; (ii) être sans restriction d'emploi, en particulier à l'égard de vaccinations antérieures ; (iii) être sans interférence à l'égard des épreuves usuelles de diagnostic ; (iv) être de production, de stockage et de contrôle faciles et peu coûteux, et (v) ne pas créer d'état d'infection vaccinale persistant (Plommet, 1984). La vaccination permet de réduire la circulation de *B. abortus* (rupture du « relais-multiplication ») pour autant que tous les animaux soient vaccinés (Plommet, 1993). Elle réduit les risques de contamination des troupeaux menacés et limite les risques de dissémination dans et en dehors des troupeaux infectés.

Les vaccins qui ont été utilisés pour lutter contre la brucellose sont de deux types : les vaccins atténués et les vaccins inactivés. Les vaccins inactivés sont constitués de *B. abortus*, soit en phase lisse (vaccin H38), soit en phase rugueuse (vaccin 45-20). Ces vaccins sont tombés en désuétude. Trois vaccins atténués sont utilisés actuellement (ordre croissant de virulence résiduelle) : les vaccins S2, RB51 et B19 (Becket & McDiarmid, 1985 ; Xie Xin, 1986 ; Samartino *et al.*, 2000). Le vaccin S2 a été obtenu, à partir d'une souche de *B. suis* biotype 1 (lisse), par passages multiples dans des milieux de culture. Bien qu'il interfère avec le diagnostic sérologique et les tests de mesure de l'immunité cellulaire, son triple avantage réside dans le fait : (i) qu'il n'induit pas d'avortement, (ii) qu'il est administré par voie orale, et (iii) qu'il est efficace chez les ruminants domestiques et chez le porc. L'utilisation de ce vaccin n'est toutefois pas recommandée par l'OIE (OIE, 2000). Le RB 51 est un mutant stable de *B. abortus* 2308, rugueux et résistant à la rifampicine. Son intérêt réside dans le fait que ce mutant n'exprime pas une grande partie de la chaîne O du LPS, ce qui constitue un avantage

pour la détection sérologique ultérieure des animaux infectés. Il est utilisé aux Etats-Unis depuis 1996 et en Amérique latine depuis 2000. Bien que des études de terrain aient montré son utilité (Lord *et al.*, 1998 ; Samartino *et al.*, 2000), son efficacité reste controversée (Godfroid *et al.*, 2003 ; Moriyon *et al.*, 2004). De plus, en conditions contrôlées, il est moins efficace que le vaccin B19 suite à une inoculation d'épreuve sévère (Moriyon *et al.*, 2004). Le vaccin B19 a été obtenu à partir d'une souche de *B. abortus* biotype 1 dont la virulence a été atténuée par vieillissement. L'efficacité du vaccin B19 est unanimement reconnue (Plommet, 1993). Tenant compte de son interférence sur les diagnostics sérologique et allergique (Garin-Bastuji, 1993 ; Saegerman *et al.*, 1994), son effet abortif (Becket & McDiarmid, 1985), son excrétion possible dans le lait (Nicoletti, 1980 ; Wijffels & Dekeyser, 1987), ou dans le sperme (Lambert *et al.*, 1964), l'utilisation à dose réduite par voie sous-cutanée chez les veaux génisses ou par voie conjonctivale avec rappel chez les bovins femelles a été préconisée (Plommet, 1993). En Belgique, la vaccination à l'aide du B19 fut utilisée. Un test d'agglutination en présence du facteur rhumatoïde après traitement du sérum par le dithiothréitol (SAW-DTT) a été mis au point pour aider à la différenciation des animaux vaccinés et infectés (Thiange *et al.*, 1992). L'arrêt des dérogations pour vacciner a été ordonné le 23 juillet 1992.

En réalité, la prophylaxie médicale ne peut conduire à elle seule à l'éradication de la brucellose. Il s'agit d'une méthode d'appoint nécessaire en milieu largement infecté pour réduire les pertes économiques et limiter le développement des foyers, mais qui doit permettre la mise en place progressive d'une prophylaxie purement sanitaire. La vaccination restera une arme de choix dans le contrôle de la circulation de *Brucella* spp. au sein des espèces sauvages mais de nouveaux développements sont nécessaires pour cette application spécifique.

Prophylaxie sanitaire : Elle vise à assainir rapidement les troupeaux infectés (mesures offensives) et à protéger les troupeaux indemnes (mesures défensives). Lorsque la prévalence est inférieure à 1 %, elle constitue généralement le seul moyen de lutte. Elle associe un dépistage des animaux infectés, l'élaboration d'un plan d'assainissement, basé sur une évaluation épidémiologique, qui comprend les animaux infectés et/ou exposés, la désinfection<sup>17</sup> des locaux et du matériel d'élevage, de traite ou d'insémination artificielle (Moreau et Saegerman, 1990) et l'application de mesures hygiéniques au sein des troupeaux telles que des mesures de biosécurité (Merveille *et al.*, 1988). Le repeuplement est toujours une opération délicate qu'il convient de bien préparer.

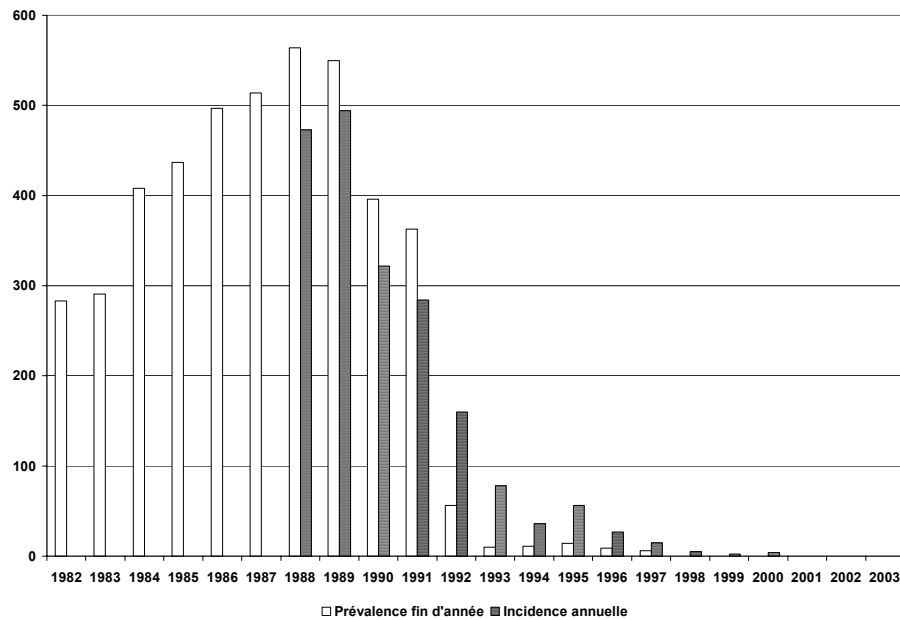
Prophylaxie médico-sanitaire : Elle associe successivement ou simultanément les modes précédents.

<sup>17</sup> De façon générale, les risques d'infection ne sont plus présents dans les étables et le matériel d'élevage après qu'une désinfection correcte ait été pratiquée (déblayage, trempage, décapage, désinfection proprement dite et vide sanitaire de 10-15 jours) (Moreau & Saegerman, 1990).

**Situation épidémiologique en Belgique :**

*Historique* : Le diagnostic de la brucellose bovine a reposé sur le dépistage sérologique (SAW-EDTA) des bovins âgés de plus de 1 an (jusqu'en 1998), puis des bovins âgés de plus de 2 ans (troupeaux allaitants) ou le dépistage par ring test sur le lait de mélange (troupeaux laitiers) ainsi que sur la recherche des causes d'avortement, les examens à l'achat et les bilans sérologiques de contrôle dans les troupeaux soumis à un risque d'infection au départ d'exploitations infectées. Les résultats d'une enquête rétrospective, concernant les années 1993-2003, indiquent que la prévalence intra-troupeaux était, en moyenne, de 3,74 % et les trois modes principaux de détection des foyers étaient les suivants (ordre décroissant d'importance) : le dépistage sérologique (32 %), le contrôle des avortements (27 %) et le dépistage par ring test (17 %) (Saegerman, données non publiées). En Belgique, seuls les biotypes 1, 2, 3, 4 et 9 de *B. abortus* ont été identifiés ; le biotype 3 représentait plus de 85 % des isolats tandis que les biotypes 2 et 4 ont été trouvés sporadiquement (Wijffels et Dekeyser, 1987). Depuis 1988, un plan de lutte renforcé contre la brucellose a été mis en place dans notre pays et, depuis 1993, la politique d'assainissement consistait en l'abattage de tous les animaux du troupeau après une indemnisation correcte des éleveurs, tenant compte de la valeur de remplacement des animaux. Les locaux où avaient séjourné les animaux, le matériel d'élevage, de traite ou d'insémination artificielle ayant été en contact avec les animaux infectés étaient nettoyés et désinfectés. La prévalence annuelle de troupeau (nombre de troupeaux infectés recensés en fin d'année) qui était de 1,13 % en 1988 est passée sous le seuil de 0,01% en 1998 et est restée nulle depuis 2000 (figure 4). La prévalence dépend, entre autre, de la vitesse d'assainissement des foyers. Une meilleure connaissance du risque d'infection est donnée par l'incidence annuelle (nombre de nouveaux foyers dépistés annuellement). Ainsi, alors qu'au 31 décembre 1995, la prévalence était de 14 foyers, l'incidence en 1995 était encore de 56 foyers (figure 1). Par la suite, l'incidence (le risque) a graduellement diminué. En 2000, les 4 derniers foyers ont été identifiés : 2 d'origine autochtone (*B. abortus* biotype 3) et 2 d'origine portugaise (*B. abortus* biotype 1). Le dernier foyer de brucellose bovine a été confirmé le 27 mars 2000.

Figure 4 : Prévalence et incidence\* de la brucellose bovine en Belgique (année 1982-2003).



\* statistiques disponibles à partir de 1988 (mise en place du plan de lutte renforcé contre la brucellose bovine).

Apparition des réactions sérologiques faussement positives (d'après Saegerman et Pelzer, 1992 ; Saegerman et al., 1997) : Au début des années 1990, le taux de prévalence de la brucellose bovine était de 0,78 % en Belgique. Dès novembre 1990, un nombre anormalement élevé de résultats sérologiques positifs (SAW-EDTA) a été constaté lors du dépistage dans le Sud de la province de Namur. Suite à l'absence de tout isolement de *B. abortus* après mise en culture de prélèvements appropriés, suite aux résultats des examens sérologiques et allergiques complémentaires et suite aux résultats des enquêtes épidémiologiques ayant permis d'exclure tout lien avec une source d'infection brucellique, ces réactions ont été dénommées « réactions sérologiques faussement positives » (RSFP). Elles ont été subdivisées en deux classes : une classe I dont le profil sérologique est plus éloigné de l'image brucellique classique (SAW-DTT négative, absence d'IgG détectables) et une classe II, plus proche de l'image brucellique classique (SAW-DTT positive, présence d'IgG détectables). Durant la période 1990-1996, la prévalence de troupeau (1 à 2 %) et individuelle (2 à 4 bovins pour 10.000) n'ont guère évolué au cours du temps en classe I. Par contre en classe II, les prévalences de troupeau et individuelle ont augmenté graduellement pour atteindre des valeurs de 4 % et plus de 10 bovins pour 10.000 en 1993. Par la suite, une diminution graduelle a été constatée. Trois facteurs de risque ont été identifiés : (i) une sensibilité particulière des jeunes animaux qui concerne la classe II uniquement ; (ii) un effet saisonnier important qui concerne les 2 classes (réactions plus nombreuses en début de stabulation hivernale) et (iii) un effet



taille du troupeau qui concerne les 2 classes. Suite aux prélèvements systématiques de fèces pratiqués sur les animaux présentant des RSFP et des cohabitants, *Yersinia enterocolitica* O:9 a été isolée<sup>18</sup> d'environ 20 % des troupeaux présentant une RSFP de classe II. Le temps nécessaire pour qu'un bovin redevienne seronégatif après avoir présenté une RSFP était plus rapide en classe I (97 % endéans les 65 jours) qu'en classe II (86 % endéans les 65 jours).

Le problème des RSFP est toujours d'actualité en Belgique puisqu'en 2002, des séroconversions ont été constatées pour 3450 sera (titre proche du seuil de séropositivité au test SAW-EDTA fixé à 30 UI/ml), ceci représente 0,39 % des sera testés (tableau 5). La plupart du temps, seul un bovin par troupeau était concerné. Dès lors, le pourcentage de troupeaux concernés par le problème des RSFP est élevé (près de 9 %). Parmi les 3450 sera trouvés positifs, seulement 1,4 bovins pour 10000 sont trouvés positifs également au test de fixation du complément (également proche du seuil de positivité, fixé à 20 U.CEE/ml de sérum). Aucun cas de brucellose n'a été confirmé suite aux examens de contrôle mis en œuvre (test i-ELISA et test cutané), en l'application du protocole national de gestion de toutes réactions sérologiques positives (AFSCA, 2002). Durant l'année 2002, 85 bovins ont été abattus et les résultats d'examen bactériologiques, réalisés sur les carcasses, étaient tous négatifs.

**Tableau 5 : Résultats du dépistage sérologique\* de la brucellose (Belgique, année 2002)**

Région	Nombre de bovins testés	SAW+		SAW+, FC-		SAW+, FC+	
		nombre	%	Nombre	%	nombre	%
Nombre de sera							
Flandre	356009	2095	0,588	2071	0,582	24	0,007
Wallonie	529542	1346	0,254	1248	0,236	98	0,019
Non déterminé	2045	9	0,440	8	0,391	1	0,049
Belgique	887596	3450	0,389	3327	0,375	123	0,014
Nombre de troupeaux							
Flandre	21694	1683	7,76	1659	7,65	24	0,11
Wallonie	11590	1290	11,13	1196	10,32	94	0,81
Non déterminé	56	1	1,79	0	0,00	1	1,79
Belgique	33340	2974	8,92	2855	8,56	119	0,36

\* SAW : séroagglutination avec EDTA (seuil de positivité de 30 UI/ml) ; FC : fixation du complément (seuil de positivité de 20 UCEE/ml)

La reconnaissance du statut « officiellement indemne de brucellose bovine » : Faisant suite au dépôt, par l'Agence fédérale pour la Sécurité de la chaîne alimentaire, d'un dossier technique auprès de la Commission européenne, la Belgique a été reconnue officiellement indemne de brucellose bovine le 29 juin 2003 (décision 2003/467/CE ; Anonyme, 2003). Cette situation a été obtenue après de très longues années d'effort et le maintien de ce statut est conditionné, entre autre, par la déclaration et l'analyse de tous les cas d'avortements suspects d'être dus à

<sup>18</sup> Une parenté structurale existe entre le lipopolysaccharide de la paroi de *Y. enterocolitica* O:9 et celui de *B. abortus*.

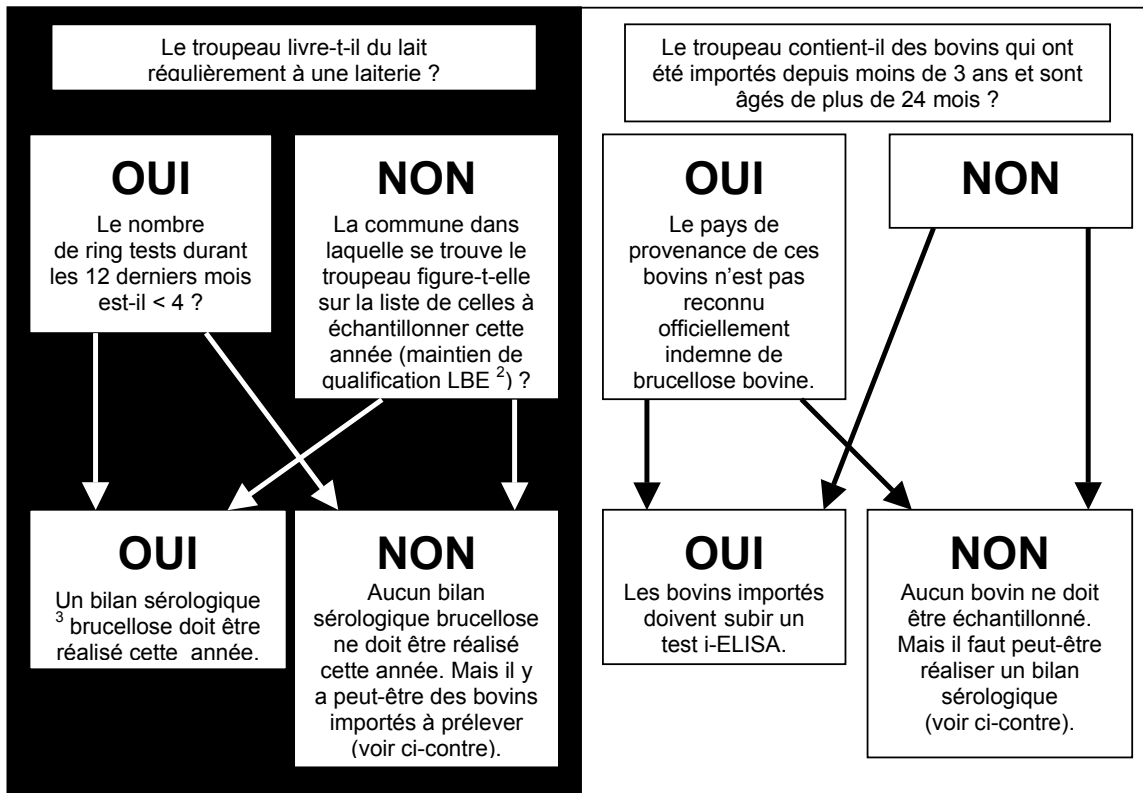
la brucellose et au maintien de la surveillance sur minimum 20 % des troupeaux pendant 5 ans. Actuellement, suite à l'avis d'experts, l'AFSCA base le maintien de qualification des troupeaux livrant du lait en laiterie (spéculations purement laitière ou laitière/allaitante) sur des examens de lait de tank (minimum 4 ring tests annuels) et pour les troupeaux ne livrant pas de lait (troupeaux allaitants, unités d'engraissement) sur le dépistage sérologique<sup>19</sup> réalisé tous les trois ans à l'instar de ce qui est fait lors du maintien de qualification pour la leucose bovine enzootique. Le statut officiellement indemne signifie en fait que le risque de propagation de la brucellose est devenu faible, que se soit par contacts entre troupeaux ou lors d'échanges commerciaux internes au pays. Par mesure de prudence et tenant compte de la nécessité de maintenir la vigilance des détenteurs (également vis-à-vis d'autres maladies restant à éradiquer), les examens à l'achat resteront d'application. Par contre, dans le cadre des importations, le risque de transmission de la brucellose dépend de la situation sanitaire du pays de provenance. Un test i-ELISA sera effectué sur les bovins importés durant les trois dernières années provenant des pays non reconnus officiellement indemnes de brucellose (figure 5). Des outils d'évaluation quantitative des risques, qui tiennent compte du statut sanitaire et de la stratégie de testage appliquée dans les pays de provenance, restent à développer. Ils nécessitent la mise à disposition, par la Commission européenne, d'une définition claire d'un « avortement suspect d'être dû à la brucellose » et d'un « accident isolé » (foyer). En effet, ce dernier n'impliquerait pas automatiquement la perte du statut officiellement indemne du pays. Il convient également de stimuler la déclaration des avortements (Houtain et Saegerman, 2004) et d'assurer une épidémiosurveillance de la faune sauvage. En effet, en Europe, *B. suis* biotype 2 est régulièrement isolé chez les suidés sauvages (Godfroid *et al.*, 1994 ; Garin *et al.*, 1999 ; Hars *et al.*, 2000) et chez le lièvre (Duee & Gaumont, 1974 ; Brglez & Batis, 1981 ; Kovačić & Karlović, 1982 ; Szulowski *et al.*, 1999).

Enfin, dans le contexte actuel, l'AFSCA a jugé opportun la transmission de la surveillance de la brucellose aux associations régionales d'identification et de santé animale (DGZ-Flandre et ARSIA-Wallonie).

---

<sup>19</sup> Le test de dépistage est la séroagglutination lente (avec EDTA). Tout résultat positif est contrôlé par un test i-ELISA. Si le test de contrôle est positif, un test cutané au brucellergène est effectué sur le lot de bovins d'appartenance.

Figure 5. Représentation schématique de la nouvelle stratégie de surveillance<sup>1</sup> de la brucellose en Belgique (campagne de prophylaxie 2003-2004).



<sup>1</sup> indépendamment de ces critères, un bilan sérologique de contrôle peut toujours être prescrit directement par l'AFSCA (troupeaux exposés à un risque particulier) ; <sup>2</sup> leucose bovine enzootique ; <sup>3</sup> SAW-EDTA.

### 3.2. La réponse immunitaire impliquée

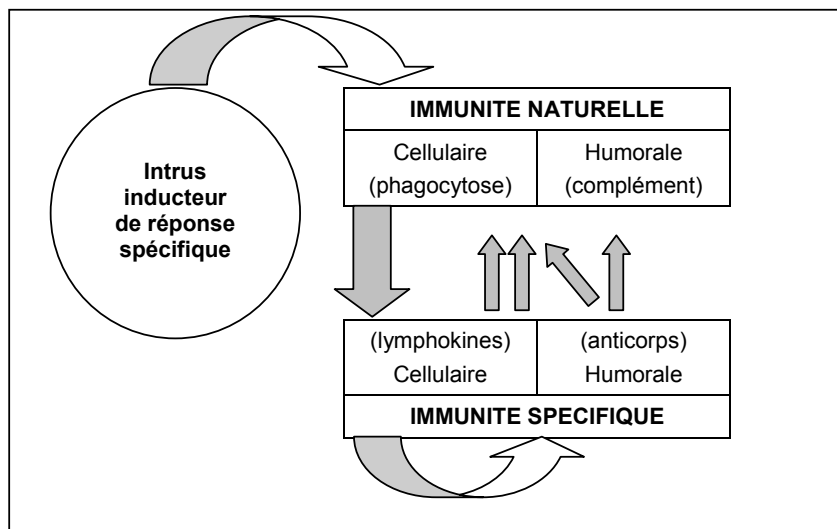
(d'après Depelchin, 1990 ; Letesson, 1996)

La réponse immunitaire est l'ensemble régulé des interactions cellulaires et humorales dont le but est d'éliminer la source de « danger » qui perturbe l'intégrité de l'organisme. Elle peut être non spécifique (mise en œuvre contre tout intrus) ou spécifique (dirigée vis-à-vis d'un agent donné). Sa compréhension est fragmentaire car la relation hôte-pathogène est d'une extrême complexité qui est amplifiée par l'existence de variations individuelles et environnementales (stress, état physiologique et/ou sanitaire). C'est d'autant plus vrai au niveau de nos espèces animales domestiques où les outils d'investigation de la réponse immunitaire sont moins développés que ceux disponibles chez la souris ou l'homme. Cette compréhension est cruciale pour le clinicien ou l'épidémiologiste qui doivent pouvoir interpréter avec justesse les résultats des tests de diagnostic qui leur sont transmis en vue de prendre des mesures de lutte appropriées. En santé publique vétérinaire, l'amélioration de la détection d'événements rares nécessite de considérer la réponse immunitaire dans sa globalité et sa complexité (élargissement du champ de vision).

### 3.2.1. L'immunité non-spécifique : première arme de défense naturelle

Si l'organisme ne disposait que de moyens de défense spécifiques, la latence nécessaire pour leur mise en place en cas de primo-infection parasitaire, bactérienne ou virale serait mise à profit par l'agent infectieux pour se multiplier et créer des lésions qui auraient atteint une ampleur irréversible au moment où la défense spécifique deviendrait efficace. On qualifie de défense non spécifique ou naturelle celle dont l'efficacité n'est ni induite par l'agent infectieux ni spécifiquement orientée vers lui seul. Ses mécanismes sont multiformes et précocement efficaces après l'introduction d'un agent infectieux. On peut y inclure les revêtements cutanéomuqueux qui s'opposent à la pénétration d'intrus tant par leur texture que par des processus mécaniques (péristaltisme de la muqueuse intestinale, cils vibratiles de la muqueuse respiratoire, lavage des voies urinaires) et chimiques (pH, plus ou moins acide selon les espèces, de la peau, de l'estomac, du duodénum, des urines). En outre, les moyens de défense interne de l'organisme pour éliminer des agents infectieux qui y ont pénétrés sont complexes : il s'agit surtout d'une défense de nature cellulaire (phagocytes : polymorphonucléaire neutrophiles et macrophages), mais aussi humorale (anticorps naturels, complément, bactéricidines, interférons, protéines de phase aiguë<sup>20</sup> etc.) et même métabolique (fièvre). Lorsque l'immunité naturelle est débordée, les défenses spécifiques entrent en jeu. Les moyens apportés par ces défenses spécifiques ont souvent pour objet de renforcer purement et simplement l'efficacité de l'immunité naturelle non spécifique. Les médiateurs spécifiques de ce surcroît d'efficacité sont les anticorps et les lymphokines (figure 6).

Figure 6. Effets rétroactifs de l'immunité spécifique sur les principaux moyens de défense non spécifiques (d'après Depelchin, 1990)



Par la production de lymphokines, les lymphocytes activent les macrophages, tandis que les anticorps sont opsonisants pour les proies (intrus) et activateurs du complément par la voie classique.

<sup>20</sup> chez le bovin, leur concentration augmente d'un facteur 1000 endéans les 24 heures après l'infection.

### **3.2.2. La réponse immunitaire spécifique ou la recherche de marqueurs spécifiques de l'infection**

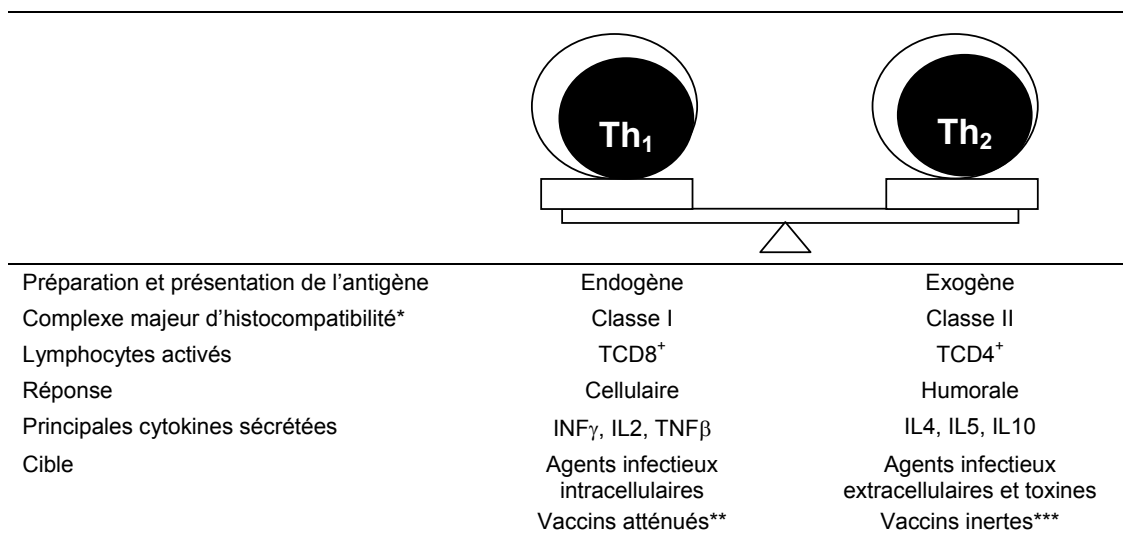
#### **3.2.2.1. La dualité de la réponse immunitaire spécifique** (d'après Letesson, 1996)

La conception traditionnelle de la réponse immunitaire spécifique est trop axée sur l'importance des anticorps synthétisés par les lymphocytes B (Lostrie-Trussart et al., 1989). Elle sous-estime les récents acquis de l'immunologie cellulaire, qui attribuent une place centrale aux lymphocytes T (d'origine thymique) tant par leur rôle auxiliaire dans la production d'anticorps que pour l'efficacité immédiate de certaines sous-populations de cellules T elles-mêmes. En réalité, la latence entre l'invasion d'un agent pathogène et la présence humorale d'un taux suffisant d'anticorps est d'ordinaire telle que l'infection atteindrait souvent une gravité dommageable si elle n'était auparavant régulée par d'autres moyens de défense naturelle et/ou cellulaire.

La réponse immunitaire spécifique est initiée presque immédiatement suite à l'introduction d'un agent infectieux au sein d'un organisme. Elle ne devient détectable et par là même efficace que plusieurs jours après le contact infectieux. Ce temps de latence est imputable à la nécessité d'une prolifération, d'une collaboration et d'une différenciation des lymphocytes B et T spécifiques de l'agent pathogène. Au fur et à mesure que progresse l'infection et que la masse antigénique s'accroît, une réponse immunitaire à médiation cellulaire significative systémique devient démontrable; elle est suivie peu de temps après par l'apparition d'anticorps qui, dans un premier temps, se complexent à l'agent pathogène et concourent à son élimination, puis sont présents sous-forme libre dans les liquides physiologiques. Les deux branches de la réponse immune (immunité à médiation cellulaire : IMC et immunité à médiation humorale: IMH) sont induites lors de tout processus infectieux; néanmoins, l'intensité, la qualité de ces deux composantes ainsi que leur rapport respectif varient fortement suivant l'agent infectieux. Au-delà des interactions cellulaires directes via des structures de reconnaissances génétiquement déterminées (immunoglobulines, récepteurs des lymphocytes T), les réponses immunes humorale et cellulaire sont contrôlées par de nombreux facteurs solubles collectivement dénommés cytokines. Ces médiateurs sont majoritairement produits par un type cellulaire particulier, le lymphocyte T auxiliaire (T helper ou Th). Cette cellule constitue la clé de voûte de la réponse immunitaire. Son activation spécifique et sa différenciation en cellule sécrétant des cytokines influencent de manière précoce et importante les aspects humoraux et cellulaires de cette réponse immune. Définis initialement chez la souris puis chez l'homme (Fitch *et al.*, 1993), des sous-types correspondants aux Th1 et Th2 murins et humains sont également retrouvés chez le bovin. (Brown *et al.*, 1993, Brown *et al.*, 1994). Cette subdivision est basée sur la gamme de cytokines que ces lymphocytes auxiliaires

sont capables de sécréter et par là même sur le type de réponse immune qu'ils favorisent (figure 7). Ainsi, les cellules de type Th1 (aussi appelées TCD8), après activation, produisent surtout de l'interleukine 2 (IL-2), de l'interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) et du Tumor Necrosis Factor bêta (TNF- $\beta$ ) qui influencent de manière prépondérante les aspects de la réponse immune liés aux macrophages et aux lymphocytes T cytotoxiques. Ceux-ci sont principalement impliqués dans la lutte contre les pathogènes intracellulaires (virus, bactéries intracellulaires telles que, par exemple, *Mycobacterium bovis* ou *Brucella abortus*) ou dans la réaction aux vaccins atténués. A l'opposé, les cellules de type Th2 (aussi appelées TCD4), après activation, secrètent surtout de l'interleukine 4 (IL-4), de l'interleukine 5 (IL-5) et de l'interleukine 10 (IL-10) qui régulent principalement les aspects humoraux de l'immunité (lymphocytes B) et contribuent majoritairement à la défense contre les agents infectieux extracellulaires et les toxines ainsi qu'à la réaction aux vaccins inertes (vaccins inactivés et vaccins sous-unitaires) (Letesson, 1996 ; Pastoret, 2004). La balance entre la réponse cellulaire de type Th1 ou Th2 est modulée par une série de facteurs (O'Garra *et al.*, 1994): imprégnation cytokinique préexistante, nature de la cellule présentatrice d'antigène, l'individu, l'antigène (nature, dose, composition, voie) et l'environnement au sens large (stress). La résultante de ces influences conditionne l'équilibre atteint par la balance Th1 et Th2. La production de ces cytokines finement ajustée en quantité et en qualité conditionne le déroulement adéquat de toute réponse immunitaire et leur mesure constitue un indice précoce de l'introduction d'un agent infectieux et de la réponse à médiation cellulaire et/ou humorale qu'il engendre.

**Figure 7. Dualité de la réponse immunitaire spécifique (d'après Letesson, 1996 et Pastoret, 2004).**



\* capte et expose en membrane les peptides représentatifs de l'univers peptidique qui sont soit d'origine endogène (CMH de classe I qui est présent dans toutes cellules nucléées) ou soit d'origine exogène (CMH de classe II qui est présent dans les macrophages et les lymphocytes B) ; \*\* pour autant qu'ils soient préparés à partir d'agents infectieux intracellulaires ; \*\*\* leurs antigènes ne sont pas présentés à la surface des cellules par l'intermédiaire du CMH de classe I et n'induisent pas une réponse immune cytotoxique. Toutefois, lorsque l'antigène est complexé à des structures lipidiques particulières, comme des liposomes, des lipopeptides et des ISCOM (immune stimulating complexes), une réponse TH1 peut être stimulée (Thiry, 2004).

### 3.2.2.2. Utilisation de l'immunité spécifique à des fins diagnostiques

Les tests utilisables en vue du diagnostic d'une maladie ressortent des acquis de la compréhension de la réponse immunitaire spécifique. Ils doivent répondre à un certain nombre de critères qui peuvent être hiérarchisés de la façon suivante : être sensibles (dépister le maximum d'animaux infectés), être spécifiques (dépister seulement les animaux infectés) et être d'un prix de revient tel qu'ils soient compatibles avec les nécessités d'une intervention massive et répétée dans le temps (adapté de Lucas et Gayot, 1967).

**Utilisation de l'immunité humorale à des fins diagnostiques** : Les anticorps spécifiques produits par les lymphocytes B ont été les premiers à être utilisés pour le diagnostic indirect d'un processus infectieux. Ce choix est essentiellement basé sur la facilité de récolte d'une quantité appréciable d'anticorps dans le sérum et divers liquides biologiques ainsi que sur la disponibilité d'un grand nombre de techniques permettant leur dosage. Dans le cadre du dépistage de la brucellose, la plupart des épreuves sérologiques et sur lait sont dirigées contre l'antigène majeur de *Brucella* en phase lisse, à savoir le lipopolysaccharide de la paroi (smooth lipopolysaccharide, S-LPS) et, plus particulièrement, sa chaîne O (tableau 6). Une parenté antigénique structurale au niveau de la chaîne O du S-LPS d'autres bactéries, qui interfère dans le diagnostic sérologique, a été décrite pour *Yersinia enterocolitica* O:9, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* O:157, *Salmonella urbana* et *Xanthomonas maltophilia* (Corbel, 1985). La production d'anticorps dirigés contre des protéines de la membrane externe, du périplasme et du cytoplasme de *Brucella* a également été décrite mais elle est plus tardive et plus hétérogène (Saegerman *et al.*, 1994 ; Letesson *et al.*, 1997). Aucun test ne permet, à lui seul, de détecter tous les animaux infectés (Garin-Bastujii, 1993).

**Tableau 6 : Effecteurs de la réponse humorale en brucellose bovine**

Matrice	Test*	IgM	IgA	IgG1	IgG2	Référence
Sang	SAW(-EDTA)	+	±	-	+	Levieux, 1974,
	SAW-DTT	-	-	+	-	Thiange <i>et al.</i> , 1992
	RBPT	±	-	+	-	Diaz & Levieux, 1972; Corbel, 1973, Levieux, 1974
	CFT	±	-	+	-	Diaz & Levieux, 1972; Levieux, 1974 ; Patterson, 1976
	i-ELISA	-	-	+	+	Limet <i>et al.</i> , 1988
Lait	RT	+	+	±	±	Plommet, 1984 ; Fensterbank, 1986 ; Sutra <i>et al.</i> , 1986
	i-ELISA	-	-	+	+	Kerkhofs <i>et al.</i> , 1990

\* SAW(-EDTA) : séroagglutination lente (avec EDTA) ; SAW-DTT : séroagglutination lente en présence de facteur rhumatoïde après traitement du sérum par le dithiothreitol ; RBPT : séroagglutination rapide sur lame ; CFT : fixation du complément ; i-ELISA : test ELISA indirect (la détection d'isotypes IgG1 et/ou IgG2 dépend du conjugué utilisé) ; RT : ring test ; -/±/+ : intensité de la réaction.

**Utilisation de l'immunité cellulaire à des fins diagnostiques** : La précocité attendue de ce type de réponse et sa spécificité rendent sa mesure attrayante.

Approche *in vivo* : Jusqu'il y a peu de temps, la mesure de l'IMC reposait essentiellement sur la mise en évidence, *in vivo*, d'une réaction d'hypersensibilité retardée (HSR) sur l'hôte infecté suite à l'injection intradermique d'un extrait protéique de l'agent infectieux. Le diagnostic cellulaire basé sur l'HSR n'a été utilisé en clinique, chez l'homme et l'animal, que dans un nombre limité de processus infectieux. Chez l'animal, la mesure *in vivo*, par intradermoréaction (IDR), de la réponse immunitaire à médiation cellulaire présente des avantages (aucune infrastructure de laboratoire n'est nécessaire, elle est visible sur l'animal, convainquante pour l'éleveur) et des inconvénients (animaux manipulés deux fois, résultat obtenu seulement après 2 à 3 jours, réalisation et interprétation ne sont pas toujours aisées, la répétition du test peut modifier le statut immun de l'animal) (Wood *et al.*, 1990 ; Thiry *et al.*, 1992). En tuberculose bovine, un délai de 42 jours est nécessaire avant de pouvoir contrôler à nouveau l'animal (directive 64/432/CE) mais les études sur lesquelles cette décision se fonde ne sont pas unanimes quant à ce délai (14 à 42 jours) (Lucas & Gayot, 1967).

Le diagnostic allergique de la brucellose s'est développé début du siècle dernier (M'Fadyean et Stockman, 1909 ; Brunet, 1932). Les allergènes étaient préparés à partir de bouillons de culture et de corps microbiens tués de *Brucella*. Ces allergènes de première génération, destinés à la médecine humaine, avaient l'inconvénient de contenir beaucoup de LPS qui occasionnaient aussi une hypersensibilité immédiate et sensibilisait l'organisme. Les travaux de Live et Stubbs (1947), de Ottosen et Plum (1949) et de Bonghibhat et coll. (1970) ont eu pour but de préparer un allergène de deuxième génération capable d'induire une HSR sans amener d'élévation des titres en anticorps (révélés par des tests classiques). Jones et coll. (1973) simplifient le procédé d'extraction de l'allergène proposé antérieurement par Bonghibhat et coll. (1970) en partant de *Brucella* en phase rugueuse afin de se débarrasser du S-LPS responsable de la formation des anticorps détectables. La brucelline I.N.R.A. produite par Dubray et coll. (1973) a été préparée selon la méthode de Jones et coll. (1973) à partir d'une souche de *Brucella melitensis* B115 en phase rugueuse. Le brucellergène OCC<sup>®</sup> (OCB pour Ovins, Caprins et Bovins) de Rhône-Mérieux est la forme commerciale de la brucelline. La brucelline et le brucellergène<sup>®</sup> sont principalement constitués d'un ensemble de protéines cytoplasmiques. Le test cutané, qui met en évidence une réaction HSR, a été proposé pour le dépistage de routine de la brucellose chez les petits ruminants et comme test supplémentaire dans les troupeaux de bovins à problème (Fensterbank, 1977). Plusieurs pays l'utilisent actuellement chez les bovins (Nouvelle-Zélande, anciens pays du bloc de l'Est). La Nouvelle-Zélande lui reconnaît une spécificité de 100% et une sensibilité de 60 à 68%



(McDiarmid, 1987). Une utilisation pour le diagnostic simultané de la tuberculose et de la brucellose a été envisagée (Fensterbank, 1989).

Approche *in vitro* : Les techniques *in vitro* de mesure de l'IMC sont dépourvues des inconvénients liés aux tests *in vivo*. Néanmoins certaines d'entre-elles, comme le test de prolifération des lymphocytes T en réponse à l'antigène (TTL) nécessitent une préparation stérile des cellules mononuclées sanguines, l'utilisation d'un isotope radioactif et d'un appareillage de détection sophistiqué et prennent plusieurs jours avant d'obtenir les résultats (Weynants *et al.*, 1994, 1995). Le dosage de cytokines produites *in vitro*, en réponse à une stimulation antigéno-spécifique, ne souffre d'aucune de ces limitations si ce n'est que les lymphocytes doivent être stimulés endéans les 12 heures (cela peut être une contrainte pour les pays en développement) (Rothel *et al.*, 1992) et que le stress (par exemple, le testage d'animaux après un long transport) induit une perte de sensibilité (Godfroid & Saegerman, résultats non publiés). Ce type d'approche permet de travailler sur du sang complet sans devoir isoler les cellules mononuclées, les résultats sont disponibles en un jour et nécessitent une infrastructure et du matériel disponibles dans les centres de prévention et de guidance vétérinaire (étuve à CO<sub>2</sub> et lecteur ELISA). L'identification et/ou le dosage des cytokines de type Th1 semblent être en excellente corrélation avec la mesure *in vivo* de l'hypersensibilité retardée (Kapsenberg *et al.*, 1991) ; un très faible pourcentage de résultats restent toutefois non interprétables. Cette approche a été suivie avec succès par une équipe australienne pour le diagnostic de la tuberculose bovine (Wood *et al.*, 1990, Rothel *et al.*, 1990). Utilisé à grande échelle pour le dépistage de la tuberculose bovine en Australie, ce test a démontré, pour une spécificité de même ordre, une sensibilité nettement augmentée par rapport au test intradermique (Wood *et al.*, 1991). Cette technique est non seulement plus rapide et plus simple que l>IDR et le TTL mais également plus sensible.

Pour le dépistage de la brucellose bovine, un test comparable à l'intradermo-réaction est réalisé *in vitro* sur sang complet hépariné : en présence de brucelline I.N.R.A. ou de brucellergène® (Rhône-Mérieux), les lymphocytes T spécifiques produisent de l'interféron gamma qui est ensuite dosé par ELISA (Weynants *et al.*, 1994, 1995 ; Godfroid *et al.*, 2002). Ce test détecte des animaux infectés par *Brucella* plus précocement et plus longtemps que les tests sérologiques classiques. La spécificité du test se marque au niveau de l'antigène et non pas au niveau des cytokines sécrétées. Des problèmes de spécificité ont toutefois été décrits (Kittelberger *et al.*, 1997 ; Godfroid *et al.*, 2002). L'utilisation d'un meilleur antigène et/ou contrôle plus poussé de celui-ci est nécessaire, afin d'augmenter la spécificité du test. La présence non désirée d'une faible quantité de LPS (Cloeckaert *et al.*, 1992) ou d'autres facteurs non identifiés à ce jour, pourraient être une cause possible de ce manque de spécificité.

### 3.3. Les principes épidémiologiques et statistiques utilisés

Les principes épidémiologiques et statistiques qui ont été utilisés pour l'étude des événements rares sont décrits ci-dessous et concernent l'interprétation des résultats des tests de diagnostic, l'utilisation de ceux-ci comme outil d'analyse, outil d'aide à la décision ou outil de prédiction.

La valeur prédictive d'un résultat positif (probabilité qu'une réponse positive à un test de diagnostic corresponde à un sujet infecté) est faible lors de la survenue d'événements rares (Pastoret, 2001). A l'extrême, en absence de maladie, toutes les réactions positives enregistrées correspondent à des sujets indemnes faux positifs. En santé publique et en santé publique vétérinaire, elle conduit à privilégier l'échantillonnage ciblé en fonction de la présence de facteurs de risque, et/ou l'application de tests de dépistage à des mélanges de prélèvements (lait de mélange, pool de sera), et/ou la vérification des résultats positifs à l'aide d'examens complémentaires de grande spécificité (Toma, 1998). Dans les deux dernières situations, les tests utilisés doivent être suffisamment sensibles sinon la stratégie mise en place est purement inutile.

La confiance que l'on peut accorder dans le résultat d'un test de diagnostic est cruciale et dépend de la prévalence réelle de la maladie dans la population ou la sous-population considérée ainsi que des caractéristiques du test (sensibilité et spécificité). Ces dernières résultent de la disponibilité et de la qualité d'un test de référence qui font parfois défaut (Enøe *et al.*, 2000).

Un besoin de trouver des alternatives se fait sentir et les épidémiologistes emploient de plus en plus l'approche Bayésienne pour pallier l'absence ou l'imperfection d'un test de référence (Enøe *et al.*, 2000). Elle offre la possibilité de combiner des opinions experts (*a priori*) avec des données expérimentales afin d'estimer, avec plus de précision, *a posteriori*, la prévalence réelle et les caractéristiques des tests (Dorny *et al.*, 2004). La qualité des informations *a priori* améliore cette précision (Ouedraogo, 2001).

#### 3.3.1. Sensibilité

La sensibilité est l'aptitude d'un test à fournir une réponse positive chez un animal malade ou infecté. Elle représente la probabilité conditionnelle d'obtenir un résultat positif par un test de diagnostic chez un animal réellement infecté (Toma *et al.*, 1991 ; Dohoo *et al.*, 2003). Elle se définit comme suit :

$$Se = \frac{\text{Nombre d'animaux positifs au test}}{\text{Nombre total d'animaux infectés testés}} = \frac{VP}{VP + FN}$$

où *VP* sont les animaux vrais positifs et *FN* sont les animaux faux négatifs.

Pour la déterminer, on utilise fréquemment un échantillon d'animaux exclusivement infectés qui doit être représentatif de la population dans laquelle le test sera utilisé. La constitution d'un tel échantillon peut poser des problèmes lors d'événements rares ou dans les pays en développement ; des collaborations entre pays sont possibles mais ne permettent pas de lever la contrainte de la représentativité. La sensibilité ne varie pas en fonction de la fréquence de la maladie mais peut néanmoins varier au cours du temps (cinétique de la réponse immunitaire spécifique). La détection d'un événement rare nécessite une sensibilité élevée du test utilisé.

### 3.3.2. Spécificité

La spécificité est l'aptitude d'un test à fournir une réponse négative chez un animal réellement sain. Elle représente la probabilité conditionnelle d'obtenir un résultat négatif par un test de diagnostic chez un animal réellement indemne (Toma *et al.*, 1991 ; Dohoo *et al.* 2003). Elle se définit comme suit :

$$Sp = \frac{\text{nombre d'animaux négatifs au test}}{\text{nombre total d'animaux indemnes testés}} = \frac{VN}{VN + FP}$$

où *VN* sont les animaux vrais négatifs et *FP* sont les animaux faux positifs.

Pour la déterminer, on utilise un échantillon d'animaux exclusivement indemnes qui doit être représentatif de la population dans laquelle le test sera utilisé. La spécificité ne varie pas en fonction de la fréquence de la maladie mais peut, néanmoins, varier dans l'espace (présence variable des agents responsables de réactions non spécifiques) et dans le temps (modification possible du microbisme ambiant au cours du temps). En matière de dépistage des événements rares, les difficultés sont fréquemment liées au manque de spécificité (Toma, 1998).

### 3.3.3. Gold standard et test de référence

Pour estimer la sensibilité et la spécificité d'un nouveau test, celui-ci est comparé à un test de référence parfait (gold standard) dont les paramètres de sensibilité et de spécificité sont de 100 %. Il ne génère aucun faux positif et aucun faux négatif. En pratique, il existe très peu de vrais « gold standard ». Le test de référence est souvent le test qui s'en rapproche le plus.

### 3.3.4. Valeurs prédictives d'un test

Ces valeurs reviennent à apprécier la confiance que l'on peut accorder dans un résultat positif ou négatif à un test de diagnostic. Elles dépendent des caractéristiques du test de diagnostic (sensibilité et spécificité) et de la prévalence réelle de la maladie ou de l'affection considérée dans la population (André-Fontaine, 1990). Elles ne sont donc pas des valeurs intrinsèques.

### 3.3.4.1. Valeur prédictive d'un résultat positif

C'est la probabilité qu'un résultat positif corresponde à un individu réellement atteint par la maladie ou l'affection recherchée par le test mis en œuvre sur cet individu (Toma *et al.*, 1991 ; Dohoo *et al.*, 2003). Elle se définit comme suit :

$$VP^+ = \frac{VP}{VP + FP} = \frac{p \cdot Se}{p \cdot Se + (1-p) \cdot (1-Sp)}$$

où  $VP$  sont les animaux vrais positifs,  $FP$  sont les animaux faux positifs,  $Se$  est la sensibilité,  $Sp$  est la spécificité et  $p$  est la prévalence réelle.

La capacité de conclure à tort qu'un animal est infecté est définie par :  $1 - VP^+$  (André-Fontaine, 1990) ; elle est élevée en situation de faible prévalence (événements rares) et engendre un coût économique non négligeable (blocage de l'exploitation, nouveaux examens).

### 3.3.4.2. Valeur prédictive d'un résultat négatif

C'est la probabilité qu'un résultat négatif corresponde à un individu réellement indemne de la maladie ou de l'affection recherchée par le test mis en œuvre sur cet individu (Toma *et al.*, 1991). Elle se définit comme suit :

$$VP^- = \frac{VN}{VN + FN} = \frac{(1-p) \cdot Sp}{(1-p) \cdot Sp + p \cdot (1-Se)}$$

où  $VN$  sont les animaux vrais négatifs,  $FN$  sont les animaux faux négatifs,  $Se$  est la sensibilité,  $Sp$  est la spécificité et  $p$  est la prévalence réelle.

La capacité de conclure à tort qu'un animal est indemne est définie par :  $1 - VP^-$  (André-Fontaine, 1990) ; elle est faible en présence d'événements rares (Pastoret *et al.*, 2001).

### 3.3.5. Combinaison de plusieurs tests

Les tests de diagnostic sont couramment combinés en pratique et dans la recherche épidémiologique (stratégie de testage en série ou en parallèle) afin de : (i) estimer la fiabilité d'un test et l'exactitude des résultats générés ; (ii) augmenter la sensibilité et la spécificité de la combinaison de tests, pour créer un test de référence et (iii) remédier aux biais dus à des erreurs de classification (Dohoo *et al.*, 1986 ; Smith, 1995 ; Brenner, 1992). Néanmoins, une telle combinaison peut aboutir à une amélioration moindre que celle escomptée, du fait d'une dépendance conditionnelle entre les sensibilités<sup>21</sup> et les spécificités des différents tests (Smith & Slenning, 2000 ; Gardner *et al.*, 2000). L'explication biologique la plus plausible de cette

<sup>21</sup> Dans ce cas, la probabilité d'être positif à un deuxième test si l'animal est infecté et qu'il est positif à un premier test est différente de la sensibilité du deuxième test.

dépendance réside dans la complexité et la dualité de la réponse immunitaire spécifique. Les effecteurs immunologiques induits lors de cette réponse n'étant pas tous indépendants entre eux. En brucellose bovine, la stratégie de testage n'affiche pas un impact aussi important sur la sensibilité que sur la spécificité (Dohoo *et al.*, 1986).

Pour des signes cliniques, la technique des scores peut être utilisée (Grenier, 1989). Elle consiste à attribuer une valeur numérique à chaque signe lorsque celui-ci est présent et à sommer ces valeurs.

#### **3.3.5.1. Tests en parallèle**

Le sujet qui est trouvé positif à, au moins, un des tests est automatiquement considéré comme positif ; cette stratégie de testage permet d'augmenter la sensibilité et donc la valeur prédictive d'un résultat négatif.

#### **3.3.5.2. Tests en série**

Le sujet doit être trouvé positif à tous les tests pour être considéré comme positif, sinon il est considéré comme négatif ; cette stratégie de testage permet d'augmenter la spécificité et donc la valeur prédictive d'un résultat positif.

#### **3.3.6. Détermination de la valeur seuil d'un test (cut-off)**

Depuis son introduction à la fin des années 60 dans le domaine des sciences médicales, la courbe ROC (Receiver Operating Characteristic) est un outil fréquemment utilisé pour évaluer un test de diagnostic (Greiner *et al.*, 2000). Cette technique est recommandée par le manuel des normes pour les tests de diagnostic et les vaccins de l'OIE (Office international des Epizooties, 2002). Pour appliquer cette méthode, il est indispensable que le statut sanitaire de l'animal soit connu. On se réfère à un gold standard ou, plus fréquemment, à un test de référence qui s'en rapproche le plus. Pour chaque cut-off possible d'un test quantitatif correspond un tableau de contingence classant, en fonction du statut de référence, les animaux en 4 catégories : vrais-positifs, faux-positifs, vrais-négatifs et faux-négatifs. L'estimation des paramètres de sensibilité et de spécificité d'un test quantitatif (exemple : valeurs de densité optique ou nombre de signes cliniques observés) dépendra ainsi du cut-off retenu (Grenier *et al.*, 1989). L'utilisation de l'analyse ROC permet de représenter graphiquement les différents couples de sensibilité et de spécificité calculés pour chaque cut-off. Le graphique obtenu a pour abscisse (1-spécificité), c'est à dire la fraction de faux-positifs et en ordonnée la sensibilité, c'est à dire la fraction de vrais positifs. En considérant que les « coûts » d'un faux-positif et d'un faux-négatif sont égaux, la valeur seuil donnant le meilleur couple de sensibilité et de spécificité est le point de la courbe ROC le plus en haut à gauche (Biteau-Coroller *et al.*, 2003). La courbe ROC permet également de visualiser

l'interdépendance entre la sensibilité et la spécificité d'un test de diagnostic. Le propos est illustré à la figure 5, de l'article 3, du chapitre 3.

### 3.3.7. Jugements catégoriels appariés

Le coefficient kappa est un indice permettant de mesurer l'intensité ou la qualité de la concordance réelle entre deux jugements catégoriels appariés (Toma *et al.*, 1991 ; Dohoo *et al.*, 2003). C'est le rapport entre, d'une part, la concordance observée moins la concordance aléatoire et, d'autre part, la concordance qui reste disponible au delà de la concordance aléatoire. Il constitue un outil pratique et simple pour mesurer la concordance entre les jugements catégoriels de deux tests ou de deux opérateurs. Néanmoins, il dépend de la prévalence et doit donc être utilisé avec beaucoup de prudence. Il se définit comme suit :

$$K = \frac{(p_o - p_c)}{1 - p_c}$$

où  $K$  est le coefficient kappa ;  $p_c$  est la concordance aléatoire ;  $p_o$  est la concordance observée ;  $(p_o - p_c)$  est la différence entre la concordance observée et la concordance aléatoire ;  $(1 - p_c)$  est la concordance qui reste disponible au-delà de la concordance aléatoire.

### 3.3.8. Estimation de la prévalence réelle

La prévalence apparente est la valeur de prévalence qui résulte de l'utilisation des moyens d'identification de la maladie mis en œuvre. La prévalence réelle peut être calculée en tenant compte de la prévalence apparente, de la sensibilité et de la spécificité du test de diagnostic utilisé (Toma *et al.*, 1991 ; Dohoo *et al.*, 2003). Elle se définit comme suit :

$$p' = Se.p + (1 - Sp).(1 - p) = VP + FP$$

$$p = \frac{p' + Sp - 1}{Se + Sp - 1}$$

où  $p'$  est la prévalence apparente,  $p$  est la prévalence réelle,  $Se$  est la sensibilité,  $Sp$  est la spécificité,  $VP$  sont les animaux vrais positifs,  $FP$  sont les animaux faux positifs.

La prévalence apparente peut être inférieure à la prévalence réelle en cas d'utilisation exclusive d'un test à médiation humorale pour un pathogène intracellulaire tel que *Brucella abortus* ou par manque de moyens d'identification de la maladie comme ce fût le cas pour l'encéphalopathie spongiforme bovine avant l'utilisation des tests rapides. La prévalence apparente peut également être supérieure à la prévalence réelle lors de l'utilisation d'un test peu spécifique (par exemple, la prévalence réelle des RSFP est inférieure à la prévalence apparente).

### 3.3.9. Odds ratio

L'odds ratio est le rapport entre de l'odds chez les animaux infectés (rapport de probabilité d'un événement à son complémentaire) et l'odds chez les animaux indemnes. Dans une table de contingence, c'est le rapport du produit des effectifs de la diagonale concordante sur le produit de la diagonale discordante (Toma *et al.*, 1991). Il mesure la qualité propre d'un test de diagnostic (exemple : rapport de chance d'observer un signe clinique chez des animaux infectés par rapport à la chance d'observer ce même signe clinique chez des animaux indemnes). Son utilisation est bien adaptée à l'approche des événements rares étant donné qu'il est indépendant à la fois de la taille de l'échantillon et de la prévalence réelle de la maladie mais nécessite de recourir à un gold standard. Il peut être estimé aussi bien dans les enquêtes cas/témoins, les enquêtes exposés/non exposés que les enquêtes de prévalence. Dans le cas des événements rares, on peut démontrer que sa valeur se rapproche beaucoup de celle du risque relatif qui est le rapport d'incidence de la maladie ou de l'affection dans le groupe des exposés à un facteur de risque, sur l'incidence dans le groupe des non exposés (relative risk, risk ratio, RR). L'odds ratio et le risque relatif peuvent prendre des valeurs comprises entre zéro et l'infini. Plus l'odds ratio s'écarte de la valeur de 1, plus l'association entre la maladie et le facteur d'exposition est forte (l'association est positive ou négative lorsque l'odds ratio est respectivement  $> 1$  ou  $< 1$ ). Un odds ratio de 1 correspond à une absence d'association entre le facteur d'exposition et la maladie.

### 3.3.10. Arbre de décision (classification and regression trees, CART®)

Un arbre de décision est une représentation graphique d'une démarche décisionnelle (Grenier, 1990). Cette représentation comporte des branches (chemins), des nœuds (embranchements) et des feuilles (Toma *et al.*, 2002). CART® est une méthode basée sur le logarithme de l'odds de la probabilité de survenue de l'événement étudié, c'est à dire le « logit » (Breiman *et al.*, 1984 ; Clark & Pregibon, 1992). Les variables introduites peuvent être continues et/ou discrètes (exemples : présence d'un signe clinique, résultat positif à un test diagnostic, âge des animaux). C'est une méthode non paramétrique (ne dépendant pas de la forme de la distribution de la variable dépendante) adaptée aux problèmes complexes avec un grand nombre de variables indépendantes. CART® compare toutes les répartitions possibles des données afin de ne retenir que l'arbre qui possède le moins de mauvaises classifications des sujets. Trois types de nœuds sont considérés dans CART®: le nœud original ; un ou plusieurs nœuds internes et un ou plusieurs nœuds terminaux. La construction d'un arbre de décision implique quatre étapes : (i) la construction initiale d'un arbre ; (ii) la décision d'arrêter la construction ; (iii) l'élagage optimal de l'arbre donnant le meilleur compromis entre la qualité et la complexité (une pénalité pour la mauvaise classification peut être ajoutée) et (iv) la sélection

de l'arbre optimal après sa validation croisée utilisant différents groupes de données prises aléatoirement.

### 3.3.11. La régression linéaire

L'analyse de régression linéaire permet, entre autre, d'obtenir des estimations (prédictions) des valeurs individuelles d'une variable à partir de valeurs d'une ou plusieurs autres variables. La variable à expliquer est la variable dépendante (reprise en ordonnée et traditionnellement notée  $Y$ ). Les autres variables sont dites indépendantes ou explicatives (reprise en abscisses et traditionnellement notées  $X$ ).

$$Y_i = \beta_0 + \beta_j X_{ij} + \varepsilon_i$$

où  $Y_i$  est la valeur de la variable dépendante (à expliquer) pour l'individu  $i$ ;  $\beta_0$  est le premier paramètre du modèle de régression (la constante ou l'ordonnée à l'origine);  $\beta_j$  est le coefficient de régression de la variable indépendante  $j$  (la pente);  $X_{ij}$  est la valeur de la variable indépendante  $j$  (explicative) pour l'individu  $i$ ;  $\beta_0 + \beta_j X_{ij}$  est la composante non aléatoire du modèle, attribuée à la valeur prise par les variables indépendantes (droite de régression);  $\varepsilon_i$  est la composante aléatoire qui représente la fluctuation aléatoire des valeurs individuelles de  $Y_i$  autour de la valeur  $\beta_0 + \beta_j X_{ij}$ , dont le comportement est géré par des facteurs incontrôlables ou par l'influence d'autres variables explicatives non prises en considération dans le modèle (valeurs résiduelles ou erreurs). Cette composante doit être distribuée selon une loi normale avec la même variance  $\sigma^2$  et les différents  $\varepsilon_i$  doivent être indépendants entre eux.

La méthode des moindres carrés pour tester les hypothèses concernant les coefficients de régression est basée sur une distribution normale des erreurs (Toma *et al.*, 1991). Elle consiste à trouver les valeurs des paramètres de régression qui minimisent la somme des carrés des écarts entre les observations et leurs espérances.

### 3.3.12. Les modèles linéaires généralisés

#### 3.3.12.1. Principes

Les modèles linéaires généralisés (GMLs, generalised linear models) ont été développés dans les années 1970 pour donner une structure commune à une large gamme de modèles statistiques (variables continues et discrètes) qui soit comparable à celle d'un modèle linéaire basé sur une distribution normale (McCullagh & Nelder, 1989). La pierre angulaire des modèles linéaires généralisés consiste en deux fonctions : la fonction « lien » (link function) qui permet une transformation spécifique pour chaque distribution de variable dépendante et la fonction « erreur » (error function) qui va utiliser une distribution appropriée pour les erreurs.



Pour tester les hypothèses concernant les coefficients de régression, la technique des moindres carrés ne peut pas être utilisée puisque la distribution des erreurs ne suit pas une loi normale. Les méthodes les plus courantes sont le maximum de vraisemblance (maximum likelihood estimation) et la déviance (Dohoo *et al.*, 2003). La méthode du maximum de vraisemblance consiste en l'estimation de la valeur d'un ou de plusieurs coefficients tenant compte des observations effectuées tandis que la déviance est une mesure d'ajustement du modèle qui dépend du modèle investigué (formule spécifique à chaque modèle).

### 3.3.12.2. Application à l'épidémiologie des événements rares

Trois statistiques ont été principalement utilisées dans l'étude des événements rares : la régression logistique, la régression de Poisson et la régression binomiale négative.

**La régression logistique** : Elle a pour variable dépendante une variable binomiale. Les variables indépendantes peuvent être des variables continues, catégorielles ou binaires. Une variable binomiale est une variable avec deux modalités et est le résultat d'une série d'expériences de Bernoulli (essais binaires) indépendantes et identiques. La condition primordiale pour entamer une analyse logistique est la connaissance exacte du nombre de chaque modalité (autrement, une régression de Poisson doit être envisagée) ; on doit pouvoir calculer le nombre d'observations pour chaque modalité et le nombre total d'observations (exemple : nombres d'animaux protégés et non-protégés dans un lot d'animaux vaccinés et un lot d'animaux non vaccinés, de taille connue). Les paramètres d'une distribution binomiale sont  $n$ , la taille de l'échantillon ;  $p$ , la probabilité de succès dans la population et  $k$ , le nombre de succès observés. La régression logistique est un modèle généralisé qui a une fonction de lien qui est le logit<sup>22</sup> et une distribution binomiale comme distribution d'erreur.

**La régression de Poisson** : La régression de Poisson *sensu stricto* est traditionnellement employée pour les variables de comptage. C'est un modèle généralisé qui a une fonction de lien logarithmique et une distribution de Poisson comme distribution d'erreur. La distribution de Poisson a comme paramètre la moyenne  $\lambda$  qui est le nombre d'événements par unité de temps, d'espace ou de volume. Deux conditions d'application doivent être vérifiées : (i) la probabilité d'occurrence d'un événement doit être constante lors de tout processus et (ii) les événements doivent être strictement indépendants (Pouillot, 2002).

**La régression binomiale négative** : Dans le cas où la condition des essais de Bernoulli indépendants et identiques n'est pas remplie, on doit recourir à des lois de probabilités composées, c'est à dire à des lois qui permettent de décrire des distributions complexes où la probabilité de succès n'est pas nécessairement égale pour chaque sujet dans la population. Un

<sup>22</sup> Le logit est le logarithme népérien de l'ODDS d'une probabilité ( $\pi$ ).

exemple d'une loi de probabilité composée est la distribution binomiale négative, qui peut dériver de la loi de Poisson (Schukken *et al.*, 1991). En effet, lorsque la « déviance » est trop grande après une régression de Poisson, l'ajustement du modèle n'est pas correct et on doit arrêter l'analyse. En pratique, dans ce cas, on recourt à la régression binomiale négative qui permet l'addition d'un paramètre dans la distribution d'erreur. Ce paramètre additionnel a pour effet de soustraire la variabilité inexpliquée par les variables indépendantes.

**Effet aléatoire** : Lorsqu'il était nécessaire de tenir compte à la fois de l'hétérogénéité entre troupeaux et de la répétition des mesures au cours du temps sur les groupes d'animaux au sein des troupeaux, une variable identifiant les troupeaux a été incluse dans les modèles respectifs en tant qu'effet aléatoire (random-effect) (Curtis *et al.*, 1988).

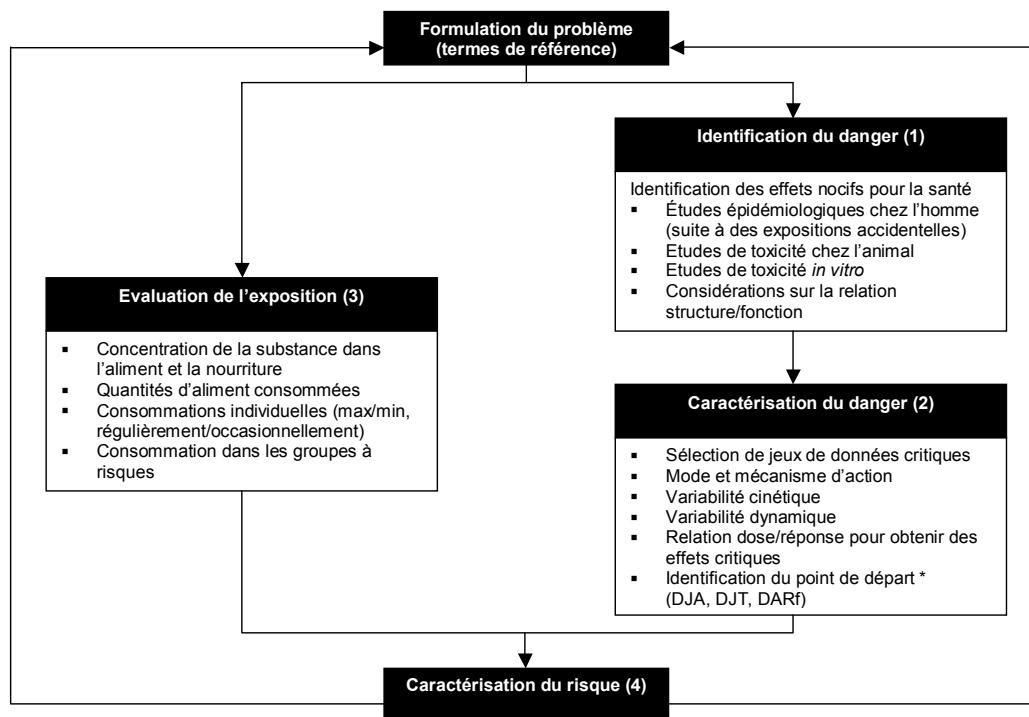
### 3.4. Les principes de base de l'évaluation des risques chimiques

Face à un danger chimique, la première question qui vient à l'esprit est de savoir si ce danger comporte un risque pour la santé publique. Pour répondre de manière appropriée, une évaluation de risque est mise en oeuvre.

#### 3.4.1. Définitions et principes

Une évaluation des risques est fondée sur des preuves scientifiques disponibles et elle est menée de manière indépendante, objective, et transparente (directive 178/2002/CE ; Anonyme, 2002). Elle comprend 4 étapes : (i) l'identification des dangers ; (ii) leur caractérisation ; (iii) l'évaluation de l'exposition et (iv) la caractérisation des risques (figure 8) (OMS, 1997 ; 2000 ; 2003). L'évaluation des risques chimiques concerne généralement les effets à long terme et, lorsque les composés présentent un potentiel de toxicité aiguë, les effets à court terme (Commission du Codex alimentarius, 2000).

Figure 8 : Le paradigme de l'évaluation des risques (d'après Renwick *et al.*, 2003)



\* DJA : dose journalière admissible ; DJT : dose journalière tolérable ; DARf : dose aiguë de référence

##### 3.4.1.1. Identification des dangers

Elle consiste à réaliser l'inventaire des agents chimiques pouvant avoir un effet néfaste sur la santé (carcinogène, mutagène, génotoxique, neurotoxique, immunotoxique, tératogène, etc). Il

s'agit d'une démarche purement qualitative. La recherche et la veille scientifique contribuent à identifier les nouveaux dangers.

### 3.4.1.2. Caractérisation des dangers

Elle consiste à évaluer qualitativement et/ou quantitativement la nature des effets nocifs pour la santé associés aux agents chimiques, y inclus la relation dose/effet. Il s'agit de réaliser un examen complet des informations disponibles sur les propriétés biochimiques, métaboliques, pharmacologiques<sup>23</sup> et toxicologiques du composé chimique fournies, par des études effectuées sur des animaux d'expérience, sur des cultures cellulaires, par le biais d'études épidémiologiques chez l'homme suite à des expositions accidentelles, et en tenant compte également de la structure du composé chimique (relation structure/fonction). L'objectif est de déterminer la dose sans effet indésirable observé pour le paramètre toxicologique le plus sensible (DSEIO ; no-observed-adverse-effect level, **NOAEL**), déterminée sur les espèces animales les plus sensibles (exprimée généralement en µg ou ng/kg poids corporel et par jour). En divisant la DSEIO par un facteur de sécurité qui tient compte de la variabilité interspécifique (généralement un facteur 10) et intraspécifique (généralement un facteur 10), on obtient la dose journalière admissible<sup>24</sup> (DJA ; admissible daily intake, **ADI**) ou la dose journalière tolérable<sup>2</sup> (DJT ; tolerable daily intake, **TDI**). La DJA ou DJT est l'estimation de la dose présente dans les aliments ou l'eau de boisson, exprimée en fonction du poids corporel, qui peut être ingérée tous les jours, pendant toute la vie, sans risque appréciable pour la santé du consommateur, compte tenu de tous les facteurs connus au moment de l'évaluation. Les facteurs de sécurité utilisés devraient être suffisants pour fournir une marge de sécurité suffisante en cas d'effets synergiques de plusieurs composés chimiques présents dans l'alimentation (WHO, 1997). Pour certains composés chimiques (par exemple les dioxines), une dose hebdomadaire tolérable est parfois calculée (DHT ; tolerable weekly intake, **TWI**). Pour les composés médicaments vétérinaires autorisés, une limite maximale de résidu (LMR) est calculée sur base de la DJA et en tenant compte des valeurs quotidiennes de consommation humaine de nourriture reprise au point 4.3.2., chapitre IV, de la directive 2001/79/CE (Anonyme, 2001). Elle est exprimée en mg/kg de résidu marqueur par kg de tissu ou produit comestibles à l'état frais.

Une exposition de courte durée à une dose supérieure à la DJA ne doit pas nécessairement être considérée comme un danger pour la santé (WHO, 1997). Toutefois pour des composés exerçant une toxicité aiguë élevée (induisant, par exemple, des effets sur le développement ou des effets neurotoxiques), une dose aiguë de référence (DARf ; acute reference dosis, **ArfD**) doit être calculée selon les mêmes principes que la DJA. En outre, la consommation de

<sup>23</sup> propriétés pharmacodynamiques (effets sur l'organisme) et pharmacocinétiques (devenir dans l'organisme).

<sup>24</sup> la DJA ou le DJT représente la même chose ; la DJA est utilisée pour les substances autorisées (pesticide, additifs alimentaires, médicaments) alors que la DJT est utilisée pour les contaminants.

certains aliments contaminés par ce type de composés donne lieu à une exposition brève dans le temps (en un repas ou au cours d'une journée) mais importante quantitativement. Lorsque l'exposition est fractionnée au cours de la journée par exemple, la rapidité de la réversibilité de l'effet (quand il y a réversibilité) est un facteur qui peut modérer l'impact sur le consommateur.

#### 3.4.1.3. Evaluation de l'exposition

Elle consiste à qualifier et/ou quantifier l'ingestion probable d'un agent chimique et, le cas échéant, le contact par d'autres voies d'exposition (inhalation, contact cutané, etc). L'évaluation des quantités de résidus apportés par l'alimentation nécessite d'obtenir des informations représentatives concernant : (i) les résultats de programmation permettant d'estimer la concentration du composé chimique étudié dans les aliments et dans la nourriture ; (ii) la quantité d'aliments consommés dans la population en général ; (iii) la même quantité pour des consommateurs extrêmes ; et (iv) la même quantité pour des groupes à risques (enfants, femmes enceintes, immunodéprimés, etc). L'idéal est de pouvoir construire des fonctions de distributions, correspondantes aux données introduites, qui tiennent compte de la variabilité observée. *In fine*, une dose journalière estimée est déterminée pour le composé chimique étudié, exprimée par kilogramme de poids corporel (DJE ; estimated daily intake, **EDI**). Pour certains contaminants chimiques, une dose hebdomadaire estimée (DHE ; estimated weekly intake, **EWI**) est calculée, selon les mêmes principes. Dans le cadre de l'évaluation des risques en vue de l'autorisation d'un pesticide ou d'un médicament vétérinaire, on suppose en première approche que les aliments pourraient contenir une quantité de résidus égale au maximum autorisé (LMR) et que la consommation de ces aliments pourrait être extrême (par exemple, le 97,5<sup>ème</sup> percentile obtenu après une étude de la consommation alimentaire). Il s'agit dans ce cas d'un scénario du pire, non représentatif de la réalité. Des quantités de résidus plus plausibles et l'éventuel effet du traitement et de la transformation des aliments peuvent être également pris en compte en deuxième approche pour estimer l'exposition potentielle de façon plus réaliste (par exemple la cuisson peut avoir pour effet de diminuer la concentration d'une substance chimique dans l'aliment). En Belgique, les données de consommation sont très limitées.

#### 3.4.1.4. Caractérisation des risques

Le risque est la probabilité de la survenue d'un danger, combinée à l'importance de ses conséquences indésirables (en quelque sorte, le produit suivant : danger x occurrence x conséquences). La caractérisation du risque est basée sur un adulte pesant approximativement 60 kg. Deux situations sont à envisager : (i) si une DSEOI peut être fixée, alors l'ingestion journalière estimée peut être comparée à la DJA ou la DJT et l'ingestion hebdomadaire estimée à la DHT ; et (ii) si une DSEIO ne peut pas être fixée, alors l'effet sur la population peut être estimé sur base d'études épidémiologiques, lorsque celles-ci sont

disponibles. Le risque estimé peut être exprimé, en pourcentage de la DJA, DJT ou DHT ; par exemple, le pourcentage de la dose hebdomadaire admissible (PDHT ; percentage of tolerable weekly intake, **PTWI**). Deux approches sont à considérer dans l'estimation du risque : (i) une approche « déterministe » qui donne une estimation ponctuelle du risque (une contamination et une quantité consommée fixes, par exemple, la moyenne ou la médiane ou le 97,5<sup>ème</sup> percentile) ; et (ii) une approche « probabiliste » qui donne une estimation du risque qui tient compte des fonctions de distribution de l'ensemble des observations concernant la contamination et la consommation. Dans les deux cas, si le risque estimé est inférieur au risque jugé acceptable, l'analyse de risque peut être arrêtée à ce stade là. Dans le cas contraire, le décideur choisit d'arrêter l'analyse de risque et de fournir une réponse négative s'il s'agit d'une substance soumise à autorisation, ou de passer à la phase de gestion du risque en cas de contamination avérée (Toma *et al.*, 2002).

#### **3.4.1.5. Options de réduction du risque**

La définition des options de réduction du risque consiste à établir la liste de toutes les méthodes permettant de contrôler le risque. La démarche d'évaluation du risque est donc également un outil pour le choix des mesures de gestion les plus appropriées (Toma *et al.*, 2002). En changeant les paramètres du modèle, on peut évaluer les options les plus efficaces.

#### **3.4.1.6. Communiquer assure la transparence et la cohérence**

La communication relative au risque correspond à un échange d'informations et d'opinions concernant le risque, entre les responsables de l'évaluation du risque, les responsables de la gestion du risque et les autres parties intéressées telles que les milieux professionnels et le public. Ce n'est pas une opération finale dédiée aux gestionnaires. Elle assure la transparence de l'évaluation de risque qui a été menée et sa cohérence. Des modalités doivent encore être définies pour conduire cette communication (Toma *et al.*, 2002).

#### **3.4.1.7. Variabilités et incertitudes ou la raison d'un continuum**

Dans toutes les étapes menant à la caractérisation des risques chimiques, des variabilités (par exemple des variétés interspécifiques et intraspécifiques) et des incertitudes (par exemple des incertitudes liées à la détermination de la DSEIO<sup>25</sup>) sont à prendre en compte. Des méthodes statistiques permettent d'étudier l'influence des incertitudes sur la variabilité des résultats d'une évaluation de risque quantitative (analyse de sensibilité). Cette analyse consiste à quantifier l'influence de la variabilité d'un paramètre sur celle du résultat (Sanaa *et al.*, 2002). Un test non

---

<sup>25</sup> Les incertitudes liées à la détermination de la DSEIO dépendent de trois variables : (i) la sensibilité de la méthode mesurant l'effet toxique ; (ii) la taille de l'échantillon d'étude ; et (iii) le choix de l'incrément des doses testées (Renwick *et al.*, 2003).

paramétrique<sup>26</sup> est utilisé dans le logiciel @risk pour quantifier cette influence (Palisade Corporation, Newfield, NY, USA). Lorsque c'est possible, deux autres méthodes peuvent être mises en œuvre : (i) des opinions pertinentes d'experts permettent de définir une distribution de probabilité qui correspond le mieux à une incertitude donnée et un test statistique paramétrique, de plus grande puissance, peut alors être utilisé ; et (ii) l'adjonction de données disponibles permet d'amenuiser les incertitudes et, dès lors, améliore une évaluation initiale.

### 3.4.2. Importance des normes internationales

Lorsque des normes internationales existent ou sont sur le point d'être adoptées, elles sont prises en considération dans le processus d'évaluation des risques (règlement 178/2002/CE ; Anonyme, 2002). Les principales instances internationales participant à l'établissement de normes et des recommandations en matière d'évaluation des risques chimiques sont (listes non exhaustive) :

- le Système de monitoring global de l'environnement et le Programme de monitoring et d'évaluation de la contamination alimentaire dont l'objectif est d'évaluer les niveaux et les tendances des dangers chimiques potentiels dans l'alimentation et leur impact sur la santé publique et le commerce (GEMS/Food ; <http://www.who.int/foodsafety/chem>) ;
- le Programme international sur la sécurité chimique dont l'objectif est d'établir les bases scientifiques pour l'évaluation du risque sur la santé publique et l'environnement provenant de l'exposition à ces contaminants chimiques (IPCS<sup>27</sup> ; <http://www.who.int/pics>) ;
- la Commission du Codex alimentarius qui fixe des normes relatives à la sécurité et à l'hygiène de l'alimentation, sur base de propositions émanant de ses multiples comités spécifiques (<http://www.codexalimentarius.net>) ;
- les réunions conjointes FAO/OMS sur les résidus de pesticides dont les objectifs sont d'examiner les aspects relatifs aux résidus et l'analyse des pesticides considérés, y compris les données concernant leur métabolisme, leur comportement dans l'environnement et leur mode d'utilisation ; de proposer des LMRs au comité compétent du Codex alimentarius (Codex Committee on Pesticide Residues, CCPR) et de déterminer les concentrations médianes relevées à la suite de l'utilisation de ces produits conformément aux bonnes pratiques agricoles dans le cadre d'essais contrôlés ; de passer en revue les données toxicologiques et autres renseignements connexes concernant les pesticides ainsi que d'établir, lorsque cela est possible, une DJA. Si nécessaire, des DARf sont également

<sup>26</sup> Le coefficient de corrélation de Spearman est un test non paramétrique ne nécessitant pas d'hypothèse de normalité des variables mais qui est généralement de faible puissance.

<sup>27</sup> Il s'agit d'une initiative entre l'Organisation mondiale de la santé (OMS), l'Organisation mondiale du travail (BIT) et les Nations Unies (programme pour l'environnement).

fixées. Un autre objectif est d'étudier l'exposition réelle des populations aux résidus de pesticides (JMPR ; <http://www.who.int/pcs/jmpr/jmpr.htm>) ;

- les réunions conjointes FAO/OMS du Comité d'experts sur les additifs alimentaires dont l'objectif est d'étudier le profil toxicologique des contaminants, additifs et médicaments vétérinaires, et de fixer les valeurs toxicologiques critiques correspondantes (DJA, DJT, etc) et de proposer des limites maximales aux comités compétents du Codex alimentarius (Codex Committee on Food Additives and Contaminants, CCFAC ; Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods, CCRVDF) (<http://www.codexalimentarius.net/web/committees.jsp>) ;
- l'Agence européenne d'évaluation des médicaments dont l'objectif est d'étudier le profil toxicologique des substances actives des médicaments vétérinaires (EMA ; <http://www.ema.eu.int>);
- l'Institut international des sciences dont l'objectif est de faire progresser la compréhension des questions scientifiques liées à la nutrition, la sécurité alimentaire, la toxicologie, l'évaluation des risques et l'environnement (ILSI ; <http://www.ilsa.org>) ;
- l'Autorité européenne de sécurité des aliments dont l'objectif est de fournir des avis scientifiques et une assistance scientifique et technique à la politique et à la législation de la Communauté dans les domaines de la sécurité des aliments (EFSA ; <http://www.efsa.eu.int>);
- la Commission européenne (Direction générale Santé et Protection des Consommateurs, DG SANCO) qui fixe des normes, établies en concertation des états membres, selon des procédures bien définies. Ces normes ont une valeur contraignante dans l'Union européenne ([http://europa.eu.int/comm/dgs/health\\_consumer/index\\_fr.htm](http://europa.eu.int/comm/dgs/health_consumer/index_fr.htm)).



## Préambule

La détection des événements rares repose sur les signes cliniques et/ou sur l'application de tests de dépistage lorsque ces derniers sont disponibles. En raison d'une origine parfois indéterminée, un test de dépistage peut ne pas être disponible lorsqu'une maladie émerge comme ce fût le cas pour l'ESB. La détection visera alors à définir les limites entre la normalité et l'anormalité (tableau clinique que l'observateur compétent ne peut pas rattacher, selon sa propre expérience, à une maladie connue). Dans ce contexte, le passage en revue des troubles d'expression nerveuse (TEN) susceptibles d'être rencontrés en Europe occidentale est des plus utiles pour le clinicien confronté au diagnostic différentiel d'un événement rare tel que l'ESB. Cette revue est facilitée si la classification proposée des TEN tient compte de l'étiologie, la fréquence et les conditions d'apparition, l'âge et le type d'animaux concernés et les principaux signes cliniques observés. Cette démarche aide également le clinicien à mieux juger de la confiance qu'il peut accorder au résultat d'un examen clinique ou aux résultats d'examens complémentaires qu'il est amené à devoir interpréter (valeur prédictive d'un résultat positif).

Différents aspects permettant d'améliorer l'épidémiosurveillance des événements rares, en particulier l'émergence, sont présentés sous forme d'une contribution scientifique consacrée au diagnostic différentiel des troubles à expression nerveuse dans l'espèce bovine en Europe occidentale. Cette contribution constitue un chapitre du numéro spécial de la *Revue scientifique et technique de l'Office international des Epizooties* consacrée à l'analyse du risque des maladies à prions chez les animaux.

## **Article 1**

### **Diagnostic différentiel des troubles à expression nerveuse dans l'espèce bovine en Europe occidentale**

## Résumé

Une classification des troubles neurologiques ou à expression nerveuse susceptibles d'être rencontrés en Europe occidentale chez les bovins âgés de 12 mois et plus a été établie selon l'étiologie, la fréquence et les conditions d'apparition, l'âge et le type d'animaux concernés et les principaux signes cliniques observés. Les troubles à expression nerveuse ont été classés selon les différents groupes de causes : biologiques, non biologiques et non spécifiques ou inconnues. Le diagnostic différentiel des troubles à expression nerveuse est un élément essentiel de l'épidémiosurveillance clinique de l'encéphalopathie spongiforme bovine. Un nombre croissant d'étiologies est décrit dans la littérature scientifique. L'identification et la gestion centralisée des troubles neurologiques permettra, d'une part, de tenir compte de la variabilité inhérente à la forme clinique développée et à la démarche diagnostique de l'observateur et, d'autre part, d'identifier de nouveaux facteurs de risque permettant leur maîtrise.

# **Diagnostic différentiel des troubles à expression nerveuse dans l'espèce bovine en Europe occidentale<sup>\$</sup>**

Saegerman C.<sup>1</sup>, Claes L.<sup>2</sup>, Dewaele A.<sup>3</sup>, Desmecht D.<sup>3</sup>, Rollin F.<sup>5</sup>, Hamoir J.<sup>6</sup>, Gustin P.<sup>6</sup>,  
Czaplicki G.<sup>7</sup>, Bughin J.<sup>7</sup>, Wullepit J.<sup>2</sup>, Laureyns J.<sup>8</sup>, Roels S.<sup>9</sup>,  
Berkvens D.<sup>10</sup>, Vanopdenbosch E.<sup>9</sup> & Thiry E.<sup>4</sup>

1. Agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire, Administration de la politique de contrôle, World Trade Center III, Boulevard Simon Bolivar 30, B-1000 Brussels, Belgium
2. Dierengezondheidszorg Vlaanderen, Kruisstraat 24, B-3061 Leefdaal, Belgium
3. Service de pathologie générale, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster 20 B43, B-4000 Liège, Belgium
4. Service de virologie-épidémiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster 20 B43 bis, B-4000 Liège, Belgium
5. Service de médecine interne des grands animaux, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster 20 B42, B-4000 Liège, Belgium
6. Service de pharmacologie, pharmacothérapie et toxicologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster 20 B41, B-4000 Liège, Belgium
7. Association régionale de santé et identification animale, Allée des Artisans 2, B-5590 Ciney, Belgium
8. Dienst van de algemene pathologie, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit van Gent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, Belgium
9. Centre d'étude et de recherches vétérinaires et agrochimiques, Groeselenberg 99, B-1180 Uccle, Belgium
10. Prince Leopold Instituut voor Tropische Geneeskunde, Departement Diergeneeskunde, Nationalestraat 155, B-2000 Antwerpen, Belgium

***Revue scientifique et technique de l'Office international des Epizootie, 2003, 22, 61-82***

(version anglaise disponible également dans le même numéro, pages 83-102)

---

<sup>\$</sup> *Commentaire des coordinateurs du numéro spécial de la Revue scientifique et technique de l'OIE consacré à l'analyse du risque des maladies à prions : « Nous espérons que l'article consacré au diagnostic différentiel de l'ESB en Europe occidentale donnera lieu à des études similaires dans d'autres régions du monde » (Lasmézas et Adams, 2003).*

## **Abstract**

A classification of neurological or neurologically expressed disorders that occur in western European cattle aged 12 months and over has been established on the basis of aetiology, frequency and conditions of appearance, age and type of animals concerned and the main clinical signs observed. Neurologically expressed disorders have been classified according to different groups of causes: biological, non-biological and non-specific or unknown. Differential diagnosis of neurologically expressed disorders is an essential element in the clinical epidemiological surveillance of bovine spongiform encephalopathy. A growing number of aetiologies are described in the scientific literature. The identification and centralised management of neurological disorders will make it possible, on the one hand, to take account of the inherent variability in the clinical forms encountered and in the diagnostic approaches of the observers and, on the other hand, to identify new risk factors in order to control them.

# 1. Introduction

L'incidence des troubles neurologiques chez la bête bovine est peu connue à l'échelle de la population et les résultats disponibles sont peu comparables. Ces données sont pourtant de toute première importance pour l'épidémiosurveillance des encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles [124]. Un pourcentage relatif de 0,82 % de pathologies neurologiques a été mentionné parmi l'ensemble des pathologies rencontrées en pratique vétérinaire [65]. En Suisse, l'incidence annuelle minimale des cas neurologiques examinés dans les universités de Zürich et Berne a été estimée à 89 bovins de tout âge par million d'animaux ; ce taux est assez faible [73]. Aux États-Unis d'Amérique, le réseau « National Animal Health Monitoring System » (NAHMS) a enregistré, pour l'année 1995, un taux de mortalité d'une vache laitière sur 1 000 en raison d'« un manque de coordination motrice et une sévère dépression » et, pour l'année 1996, un taux de morbidité dans les troupeaux viandeux d'une femelle reproductrice présentant des « problèmes neurologiques » sur 1000 [29, 30]. D'après Heim et coll. [73], la distribution des pathologies neurologiques concerne préférentiellement les bovins âgés de moins d'un an (29,3 %) et ceux de quatre à cinq ans (18,9 %).

La distinction entre maladies nerveuses et syndromes nerveux n'est pas aisée. En effet, une pathologie comme la babésiose bovine peut aboutir à une anoxie ou un coma hépatique ayant pour conséquence l'apparition de signes cliniques à expression nerveuse. Tsuji et coll. ont reproduit ce phénomène sur un modèle souris [140]. L'expression « troubles à expression nerveuse » (TEN) a été utilisée et est définie comme étant : « tout cas neurologique où, soit l'anamnèse et/ou la clinique mentionnent une symptomatologie nerveuse, soit un résultat d'un examen nécropsique et/ou d'un examen complémentaire identifient une cause morbide pouvant induire une symptomatologie nerveuse, soit en l'absence d'un ou de plusieurs éléments qui précèdent, si des analyses ont été réalisées sur le système nerveux central » [124].

Il existe plusieurs critères de classification des TEN en fonction de l'objectif poursuivi. Différentes clefs d'entrée ont été envisagées. Le choix peut porter sur les signes cliniques et leur durée d'évolution [6, 11, 17, 111, 123, 128, 133, 136, 154], sur l'examen histopathologique de l'encéphale [73, 134], sur les examens complémentaires, ceux-ci pouvant être *ante mortem* [11, 57, 58, 141] ou *post mortem* [62, 111], ou enfin sur le résultat d'un traitement [11, 111, 144]. Le diagnostic étiologique des troubles neurologiques est nécessaire également pour identifier des problèmes de troupeau ou des erreurs de conduite d'élevage [6].

Des outils spécialisés d'aide à la décision ont été mis au point au cours de ces dernières années. Les signes cliniques observés lors de l'examen clinique d'un animal peuvent être introduits dans un logiciel qui donne une liste de diagnostics à envisager par ordre alphabétique [155]. Plus récemment, des classements probabilistes ont été proposés en tenant compte de 55 pathologies à expression nerveuse présentes au Royaume-Uni [33]. Ceux-ci sont basés sur la présence ou l'absence de 14 signes cliniques aisément reconnaissables. Ainsi, les signes évoluant depuis plus de 15 jours, le plus fréquemment rencontrés en cas d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) sont la crainte et/ou la nervosité, l'hyperesthésie et l'ataxie. Ce profil clinique correspond à celui décrit dans d'autres pays européens [14, 38, 85, 125, 126, 131, 149, 150, 153, 156].

L'objectif poursuivi par cet article est d'établir, chez les bovins âgés de 12 mois et plus, une classification des TEN susceptibles d'être rencontrés en Europe occidentale selon l'étiologie, l'âge, la fréquence, les circonstances d'apparition et les principaux signes cliniques observés. Pour une raison de clarté, les étiologies ont été regroupées par catégories. Les causes biologiques ont été subdivisées en causes parasitaires, mycosiques, bactériennes, virales et agents transmissibles non conventionnels. Les causes non biologiques sont subdivisées en causes mécaniques, physiques, chimiques, métaboliques et nutritionnelles, génétiques et immunes. Enfin une dernière catégorie a été ajoutée. Il s'agit des causes non spécifiques ou inconnues. Le diagnostic différentiel des troubles à expression nerveuse est un élément essentiel de l'épidémiosurveillance clinique de l'ESB [78].

## 2. Causes biologiques

### 2.1. Maladies d'origine parasitaire

Les TEN d'origine parasitaire [129] sont rencontrés rarement ou occasionnellement chez les bovins en Europe occidentale (Tableau I). Le plus souvent, ils résultent soit d'un traitement inadapté (hypodermose), soit de conditions régionales particulières (babésiose), soit d'erreurs de gestion dans un contexte de surpeuplement (coccidiose), soit enfin du passage d'un agent infectieux chez un hôte intermédiaire (toxoplasmose) [48]. Accessoirement, des nématodes [129], des cestodes [56] et des protozoaires [15] peuvent induire des TEN.

### 2.2. Maladies d'origine mycotique

Certains champignons peuvent parasiter des plantes et produire des mycotoxines trémogènes [128]. Lorsque ces plantes sont distribuées aux bovins, elles peuvent occasionner des TEN [34, 90, 117, 143, 159]. L'ergotisme est un exemple bien connu (voir ci-dessous, parmi les causes non biologiques, la section « Causes chimiques »).

### 2.3. Maladies d'origine bactérienne

Parmi les causes biologiques induisant des TEN, les causes bactériennes ont été les plus fréquentes, après les causes virales, dans les pays où la rage a sévi à l'état enzootique [124]. Parmi ces causes bactériennes (Tableau II), viennent en premier lieu : la listériose [73, 79, 92, 99, 136] ; la méningo-encéphalite thrombosante, qui frappe plutôt les jeunes bovins [134, 136], l'abcès parahypophysaire [134, 136, 144], le tétanos [92, 136] et le botulisme [32, 68, 134, 136]. Les méningites et/ou encéphalites purulentes sont fréquemment la conséquence d'une bactériémie et sont caractérisées par une alternance de signes cliniques correspondant à une période initiale d'excitation, suivis de signes cliniques correspondant à l'arrêt des fonctions [11, 93]. Par contiguïté de tissu, une sinusite (écornage, bris de corne ou de dent) ou une otite peuvent induire des TEN [70, 109]. L'entérotoxémie qui est moins fréquemment rencontrée chez le bovin adulte peut également induire des TEN dans la forme subaiguë [6, 11, 100]. L'hydrocéphalie acquise qui peut être d'origine inflammatoire est exceptionnelle chez les



ruminants et est caractérisée par une immobilité permanente parfois interrompue par des crises d'excitation [11, 93]. Une augmentation significative du nombre de cas de listériose a été constatée en Suisse, en raison d'un tableau clinique et d'une distribution d'âges qui sont proches de ceux de l'ESB [74]. La prévalence de la listériose dans les troupeaux laitiers a été estimée à 11,7 % en Angleterre (intervalle de confiance 95 % : 9,6 %-14,6 %) [53]. Dans plusieurs pays, les premiers cas d'ESB ont été diagnostiqués à la suite d'une suspicion de listériose [23]. Les résultats d'examen histopathologiques indiquent une augmentation significative de la fréquence de la listériose en hiver et au printemps [126]. Cette observation a été rapportée à plusieurs reprises dans la littérature scientifique [53, 54, 73, 105, 123, 154]. On l'explique par le régime alimentaire, plus particulièrement la consommation d'ensilage mal conservé ou d'ensilage en trop grande quantité [11, 64, 105, 123]. La listériose peut induire des toxi-infections alimentaires collectives [130].

**Tableau I.**  
**Principales causes parasitaires des troubles d'expression nerveuse en Europe occidentale chez les bovins âgés de plus de 12 mois**

Affection et agent causal	Fréquence	Âge et type d'animaux	Condition d'apparition et principaux signes cliniques	Références
<b>Hypodermose</b> <i>Hypoderma bovis</i>	+	Animaux de tout âge	Insecticide systémique administré au moment de la migration larvaire au niveau du canal rachidien (après la mi-décembre) Démarche raide, instable puis paralysie	11
<b>Forme nerveuse de la coccidiose</b> <i>Eimeria</i> sp.	++	Jeunes animaux	Plus fréquente lors d'un été pluvieux Animaux en stabulation ou confinés Forme nerveuse peu rencontrée Diarrhée fétide, mucoïde et tachée de sang Tremblements musculaires Nystagmus Hyperesthésie Décubitus avec convulsions Opisthotonos	6, 11
<b>Forme furieuse de la babésiose</b> <i>Babesia divergens</i>	++	Animaux adultes	Liée à certaines régions en raison : - de la présence de tiques - d'un biotope particulier (haies, buissons) - de la transmission verticale dans la descendance des tiques Liée aux bonnes saisons (augmentation de l'activité des tiques) Le trépied de la symptomatologie est le suivant : - forte fièvre pouvant aller jusqu'à 42 °C - ictère hémolytique (muqueuses couleur jaune pâle) - hémoglobinurie (urines couleur « brun chocolat ») Abattement important (prostration) Diminution importante de la production lactée Anémie Occasionnellement, troubles nerveux dus à l'anoxie et, à l'état chronique, dus au coma hépatique - grincement des dents - incoordination motrice, ataxie - folie furieuse - convulsions et coma	1
<b>Forme nerveuse de la toxoplasmose</b> <i>Toxoplasma gondii</i>	+	Les bovins semblent assez résistants	Encéphalite et pneumonie : - température - dyspnée - ataxie - hyperexcitation puis léthargie	1, 11, 48

+ :rare

++: rencontré occasionnellement

**Tableau II.**  
**Principales causes bactériennes des troubles d'expression nerveuse en Europe occidentale chez les bovins âgés de plus de 12 mois**

Affection et agent causal	Fréquence	Âge et type d'animaux	Condition d'apparition et principaux signes cliniques	Références
<b>Listériose</b> <i>Listeria monocytogenes</i>	++++	Animaux adultes	<p>Surtout en hiver et au printemps</p> <p>Avortement, mammites, septicémie du veau</p> <p>Température supérieure à 40 °C</p> <p>Signes cliniques le plus souvent unilatéraux</p> <p>Paralysie du nerf facial (VII) :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- ptose de l'oreille, de la paupière supérieure et de la lèvre inférieure</li> <li>- présence d'aliments d'un côté de la bouche</li> <li>- ptyalisme unilatéral</li> </ul> <p>Paralysie du nerf trijumeau (V) :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- hypoalgésie faciale (répond mal ou pas à une stimulation)</li> </ul> <p>Paralysie du nerf vestibulaire (racine inférieure du nerf auditif VIII) :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- tête déviée d'un côté</li> <li>- marche tourmante (toujours dans le même sens)</li> </ul> <p>Hémiparésie</p> <p>Phase terminale : décubitus sternal avec persistance du tourner en rond (disposition circulaire de la litière)</p> <p>Bonne réponse à une antibiothérapie précoce surtout si l'animal est jeune (pénicillines ou tétracyclines)</p>	53, 54, 73, 74, 79, 92, 99, 105, 123, 125, 136
<b>Tétanos</b> <i>Clostridium tetani</i>	++	Animaux de tout âge	<p>Origine tellurique</p> <p>Anamnèse : plaie, écorchage, chirurgie, rétention d'arrière-faix</p> <p>Les germes se multiplient dans les érosions des muqueuses ou les plaies profondes ou recouvertes (anaérobiose)</p> <p>Temps d'incubation : 1 à 3 semaines mais peut être plus long</p> <p>Raideur musculaire généralisée (paralysie spastique bilatérale) :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- gêne à la préhension des aliments et de l'eau</li> <li>- trismus</li> <li>- procidence de la troisième paupière</li> <li>- oreilles raides tirées en arrière</li> <li>- extension de la tête et de l'encolure (aspect d'un cerf)</li> <li>- soulèvement de la queue (constant)</li> <li>- météorisme persistant (non constant)</li> <li>- absence de toute tendance à se coucher (position en chevalet)</li> </ul> <p>Hyperesthésie au bruit, à la lumière et au toucher</p> <p>Décubitus latéral au stade final :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- membres en extension spastique</li> <li>- toute chance de guérison disparaît</li> </ul>	92, 136
<b>Botulisme</b> <i>Clostridium botulinum</i>	++	Animaux de tout âge	<p>Le germe se multiplie dans les matières animales en décomposition (cadavres et leurs restes)</p> <p>La multiplication de <i>Cl. botulinum</i> est également possible dans les ensilages d'herbe, surtout si le pH est alcalin, et en conditions d'anaérobiose</p> <p>Paralysie musculaire flasque, progressive et bilatérale :</p> <p>a) dans la forme classique (antérieure)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- les oreilles et les paupières supérieures s'affaissent</li> <li>- la bouche s'ouvre facilement et la langue est pendante</li> <li>- dysphagie (eau, aliments)</li> <li>- myosis</li> </ul> <p>b) dans la forme non classique (ascendante)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- la queue est pendante (comme une « balançoire »)</li> <li>- l'anus ne se contracte plus au fouiller rectal</li> <li>- démarche vacillante et trébuchante</li> <li>- parésie de l'arrière-train qui évolue ensuite vers l'avant</li> <li>- puis décubitus (menton sur le sol, queue allongée en arrière)</li> </ul> <p>Respiration abdominale en phase terminale</p> <p>Mort en quelques jours suite à une paralysie respiratoire</p>	32, 68, 134, 136

Tableau II. (suite)

Affection et agent causal	Fréquence	Âge et type d'animaux	Condition d'apparition et principaux signes cliniques	Références
<b>Méningo-encéphalite thrombo-embolique infectieuse</b> <i>Haemophilis somnus</i>	+++	Bovins à l'engrais	Incubation de 1 à 4 semaines Morbidity de 10 % et mortalité de 90 %  Des troubles respiratoires précèdent les troubles nerveux : toux, jetage, salivation (pas nécessairement chez les mêmes animaux) D'abord fièvre élevée (phase septicémique), puis température normale après quelques heures : ataxie, incoordination locomotrice puis décubitus La fermeture des paupières est caractéristique mais l'animal voit toujours Parfois, strabisme unilatéral divergent Forte dépression (apathie malgré forte stimulation auditive ou tactile) Persistence de la salivation et du jetage Paralysie de la queue, de l'anus et de la vessie (décelable par fouiller rectal) La septicémie induit une polyarthrite (grosses articulations) Évolution vers la mort en quelques heures à trois jours	134, 136
<b>Méningite et/ou encéphalite</b>	+++	Plus souvent les jeunes	Température Les méningites aiguës sont le plus souvent associées aux encéphalites par contiguïté de tissu On décrit deux phases mais souvent elles se succèdent ou se superposent : - inflammation de la corticale (période initiale d'excitation), puis - destruction de la corticale (arrêt des fonctions vitales) Période initiale d'excitation : - troubles psychiques : hyperexcitabilité - troubles sensoriels : hypersensibilité au bruit, à la lumière et au toucher - troubles moteurs : convulsions cloniques, raideur, nystagmus, trismus, myosis, rictus, grincement des dents, mâchonnements, opisthotonos Arrêt des fonctions vitales : - troubles psychiques : dépression (immobilisme, désintérêt, somnolence) - troubles sensoriels : hyposensibilité au bruit, à la lumière et au toucher - troubles moteurs : démarche chancelante, parésie/paralysie - perte des fonctions neuro-végétatives (incontinence)	11, 93
<b>Abcès parahypophysaire</b>	++	Animaux de tout âge	Prédisposition anatomique due à l'important réseau veineux périphérique Résulte souvent du placement incorrect d'un anneau nasal (nécrose du cartilage du septum) ou d'une complication d'écornage (sinusite) Abcès métastatique circonscrit Paralysie plus ou moins nette de la mâchoire inférieure La mâchoire tremble et par extension le mufler aussi Difficulté de déglutition (dysphagie) Appétit et soif sont conservés mais : - une partie de l'eau coule hors de la bouche - lors de la prise de nourriture, constitution d'une chique Intérêt pour l'environnement conservé ou peu altéré Traitement sans effet	134, 136, 144
<b>Sinusite</b>	+++	Animaux de tout âge	Par contiguïté de tissu Suite à un écornage, un bris de come ou de dent Fièvre Dépression Une ou deux paupières sont gonflées et tombantes Une conséquence peut être l'induction d'un abcès parahypophysaire	70
<b>Otite</b>	+++	Jeunes animaux	Par contiguïté de tissu Fièvre et dépression Rotation de la tête vers le bas et du côté atteint Tendance à tourner en cercle du côté atteint Une paralysie faciale du côté atteint peut être observée	109

Tableau II. (suite)

Affection et agent causal	Fréquence	Âge et type d'animaux	Condition d'apparition et principaux signes cliniques	Références
<b>Entérotoxémie</b> <i>Clostridium perfringens</i>	+++	Veaux au pis, bétail à l'engrais	Souvent suraigu : mort sans signe clinique Dans la forme subaiguë, les signes cliniques suivants peuvent être observés : - salivation, coliques - constipation / diarrhée - excitation fugace / dépression dominante - décubitus, mouvements de pédalage - opisthotonos et coma Autopsie : entérite segmentaire hémorragique avec fréquemment une adénite satellite	6, 11, 100
<b>Hydrocéphalie acquise*</b>	+	Plus souvent les jeunes	Rétention et hypersécrétion de liquide céphalo-rachidien résultant le plus souvent d'une épendymite, d'une méningite ou d'une ventriculite Qualifiée d'interne quand elle affecte les cavités internes Qualifiée d'externe quand elle affecte les espaces sous-arachnoïdiens Engendre une immobilité permanente, rarement entrecoupée d'excitation Résulte souvent d'une découverte d'autopsie tout en n'étant pas nécessairement la cause de la mort	11, 93

- + : rare  
 ++ : rencontré occasionnellement  
 +++ : rencontré moins fréquemment  
 ++++ : rencontré couramment  
 \* souvent d'origine inflammatoire

## 2.4. Maladies d'origine virale

En raison d'une enzootie de rage ayant sévi dans plusieurs pays d'Europe occidentale, les causes virales (Tableau III) ont été longtemps les plus fréquentes [124]. Dans deux pays au moins, le premier cas d'ESB a été diagnostiqué suite à une suspicion de rage [74, 150]. La rage doit être envisagée dans le diagnostic différentiel de l'ESB [59], bien que le temps d'évolution soit généralement plus court, c'est-à-dire inférieur à une semaine [151]. En Belgique, toutes les suspicions de rage qui sont infirmées sont également analysées pour l'ESB [125, 126, 150]. La plupart des pays d'Europe occidentale sont actuellement reconnus indemnes de rage [112, 114]. On pourrait dès lors penser que la part prise par les causes virales sera moins importante. Toutefois, plusieurs diagnostics étiologiques viraux ont récemment été posés chez des bovins âgés de plus de 12 mois ayant présenté une méningo-encéphalite non purulente : le virus de la diarrhée virale bovine chez une bête bovine âgée de 26 mois [126] ; l'herpèsvirus bovin 1, responsable de la rhinotrachéite infectieuse bovine chez une bête bovine âgée de 44 mois [122, 126] et l'herpèsvirus ovin 2, responsable du coryza gangreneux, chez trois bovins âgés de 12 à 18 mois dont deux avaient eu des contacts avec des moutons [45]. Des épidémies d'encéphalites à herpèsvirus bovin 5 ont été principalement décrites en Australie, en Argentine, au Brésil et aux États-Unis d'Amérique. Le virus a été identifié en Hongrie et en Allemagne. Cependant, de nombreuses souches d'herpèsvirus isolées de cas cliniques d'encéphalite bovine n'ont pas été caractérisées. Il est probable que la distribution de l'infection à herpèsvirus bovin 5 est plus étendue que les résultats d'isolement

ne le laissent présager [104, 139]. Les signes cliniques de coryza gangreneux sont dominés par un syndrome fébrile marqué, des lésions oculaires de kératoconjonctivite et d'uvéite, des lésions ulcéronécrotiques des muqueuses digestive et nasale et une polyadénomégalie [25, 127]. Une périécoronarite aiguë ulcéreuse a également été observée [45]. Les signes cliniques nerveux sont inconstants [127], rares et consistent souvent en des fasciculations musculaires [25, 37, 127], une incoordination motrice [37] et du nystagmus [25]. Une faiblesse générale avec refus de marcher et des grincements des dents ont également été décrits chez les bovins [45].

La maladie de Borna est rare chez les bovins, contrairement aux chevaux et aux moutons [96, 139]. Toutefois, le virus de la maladie de Borna a été mis en évidence chez des bovins en bonne santé en Allemagne [87, 102, 163], en Suisse [27] et au Japon [71]. Plus récemment, la maladie de Borna a été diagnostiquée chez des bovins ayant présenté des TEN dans plusieurs pays : en Allemagne [12], en Suisse [26], en France [40] et au Japon [110]. Le tableau clinique ressemble partiellement à l'ESB [96]. Par ailleurs, la détection d'anticorps, d'antigènes et/ou du génome viral dans le tissu nerveux d'humains décédés et ayant présenté des troubles psychiatriques sévères, a relancé le débat d'une possible implication de ce virus dans l'étiologie d'affections neurologiques et sur l'hypothèse d'une éventuelle transmission de ce virus de l'animal à l'homme [40, 96, 139].

Le virus du louping-ill est transmis par la tique *Ixodes ricinus*. L'infection est le plus souvent subclinique. Parmi les animaux infectés, seuls certains présentent des troubles du système nerveux central caractérisés par de l'ataxie, de la paralysie, du coma et la mort [139].

La leucose bovine enzootique peut induire des TEN. Plusieurs pays d'Europe occidentale sont reconnus officiellement indemnes de leucose bovine enzootique par la Commission européenne [36]. La vigilance portera sur les animaux importés de pays non encore reconnus comme officiellement indemnes. Enfin, les bovins en contact avec des porcins peuvent contracter la maladie d'Aujeszky [119, 124, 139, 160]. Ce risque diminuera au cours du temps en raison des plans de qualification des troupeaux porcins et d'une nécessaire séparation stricte des unités de production. Toutefois, des cas sporadiques pourraient persister par le biais de contacts avec des sangliers sauvages, comme cela a déjà été démontré pour le chien de chasse en Allemagne [8].

Le rétrovirus de l'immunodéficience bovine (BIV) appartient au genre *Lentivirus* ; la période d'incubation est de trois à cinq ans [139]. Des bovins séropositifs ont été retrouvés dans tous les pays examinés [28, 81, 118, 132]. De la leucocytose, de la lymphadénopathie, de la méningo-encéphalite et des lésions rebelles au traitement sont retrouvées chez les bovins infectés naturellement ou expérimentalement [9, 18, 135, 139, 152].

**Tableau III. Principales causes virales des troubles d'expression nerveuse en Europe occidentale chez les bovins âgés de plus de 12 mois**

Affection et agent causal	Fréquence	Âge et type d'animaux	Condition d'apparition et principaux signes cliniques	Références
<b>Rage</b> <i>Lyssavirus</i> <i>Rhabdoviridae</i>	++	Animaux de tout âge	La plupart des pays d'Europe occidentale sont actuellement reconnus indemnes de rage La période d'incubation varie de 20 à 150 jours et plus (en moyenne : 35 à 45 jours) Le temps d'évolution est généralement de 2 à 6 jours Tous les signes cliniques ne sont pas toujours présents Phase prodromique (quelques heures à quelques jours) : - anorexie, légère hyperthermie et chute brutale de la lactation - salivation (bave claire et filante), beuglements rauques et biphasiques - agressivité (rare chez les bovins), parésie ou paralysie Phase furieuse : - modification du comportement avec irritabilité, hyperexcitabilité, ténésme et beuglements - ne refuse ni l'eau, ni la nourriture mais la déglutition est impossible Phase terminale : parésie, paralysie, déshydratation (amaigrissement rapide), prostration et opisthotonos	1, 139, 151
<b>Maladie d'Aujeszky</b> Suid herpesvirus 1 <i>Herpesviridae</i>	+	Animaux de tout âge	Transmission par contact direct ou indirect avec le porc (épandage de lisier, matériel, personnel) La transmission aérienne est possible, surtout quand la densité porcine est élevée La période d'incubation est de 3 à 6 jours L'issue est toujours mortelle (quelques heures ou au maximum 6 jours) Le premier signe clinique est le jetage nasal Après 2 à 3 jours, les bovins présentent de la dyspnée, du ptialisme et du météorisme Les animaux boivent beaucoup Les signes nerveux apparaissent ensuite : - tremblements musculaires et piétinements - les bovins se couchent et se lèvent de manière incessante - ils fouettent de la queue et alternent excitation avec beuglement et dépression - il n'y a pas d'agressivité Le signe clinique dominant est le prurit incoercible : - localisé à certains endroits (mufle, épaules, membres, ventre) - l'animal malade soulage son prurit jusqu'à l'automutilation, par tous les moyens : léchage, grattage, frottement La mortalité conjointe d'un ou de plusieurs chats dans l'exploitation est un indicateur	124, 139, 160
<b>Coryza gangreneux</b> Ovine herpesvirus 2 <i>Herpesviridae</i>	++	Animaux adultes	La forme européenne bovine est associée au mouton Le mouton est un porteur asymptomatique du virus La période des agnelages est propice à la dissémination du virus La transmission horizontale chez les bovins n'est pas décrite L'incubation dure quelques semaines à quelques mois Un syndrome fébrile et une prostration sont marqués Un enduit nécrotico-fibrineux d'odeur fétide recouvre le mufle La congestion des vaisseaux est visible (muqueuses rouge brique) Lésions ulcéro-nécrotiques des muqueuses digestive et nasale Polyadénomégalie Lésions cutanées sous forme de croûtes en surélévation Péricoronarite aiguë ulcéreuse Diarrhée ou dysenterie Troubles nerveux rares et inconstants : - fasciculations musculaires - incoordination motrice - nystagmus - faiblesse générale avec refus de marcher - grincements des dents	25, 37, 45, 92, 127, 139

Tableau III. (suite)

Affection et agent causal	Fréquence	Âge et type d'animaux	Condition d'apparition et principaux signes cliniques	Références
<b>Diarrhée virale bovine</b> Pestivirus bovins <i>Flaviviridae</i>	+	Bovins âgés de 6 à 24 mois	La surinfection exogène ou endogène (mutation) du veau infecté immunotolérant persistant (IPI) par une souche de virus de la diarrhée virale bovine de biotype cytopathogène et présentant par ailleurs les mêmes caractéristiques antigéniques que la souche de biotype non cytopathogène présente chez l'animal IPI, déclenche la maladie des muqueuses  Il n'y a pas de forme nerveuse décrite dans la maladie des muqueuses Toutefois, des isollements du virus de la diarrhée virale bovine sur des encéphales de bovins âgés de plus d'un an suspects et infirmes d'encéphalopathie spongiforme bovine ont été réalisés	126, 139
<b>Rhinotrachéite infectieuse bovine</b> Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) <i>Herpesviridae</i>	+	Plus souvent les jeunes	Le BoHV-1 est capable de provoquer des encéphalites chez le veau de 3 à 8 jours : - après une phase d'excitation, sans hyperthermie, le veau présente une période de dépression accompagnée de cécité - des symptômes respiratoires et généraux sont associés - la guérison est rare et la mort survient 3 à 4 jours après l'apparition des premiers signes cliniques  - des isollements viraux de BoHV-1 sur des encéphales de bovins âgés de plus d'un an suspects et infirmes d'encéphalopathie spongiforme bovine ont été réalisés Le BoHV-5 provoque des encéphalites chez les jeunes veaux âgés de plus de 10 mois - l'infection de bovins adultes est possible expérimentalement - l'infection de bovins par le BoHV-5 est peu connue en Europe occidentale	104, 122, 126, 139, 155
<b>Maladie de Borna</b> Bornavirus <i>Bornaviridae</i>	+	Animaux adultes	Maladie plus fréquente chez les chevaux et les moutons L'infection est fréquemment inapparente chez les bovins Les signes cliniques apparaissent après une longue période d'incubation sous la forme d'une encéphalopathie progressive : - alternance de phases d'excitation et de somnolence - ataxie, difficulté de proprioception, troubles oculaires - l'issue fatale survient trois semaines après le début de la phase clinique	12, 40, 87, 96, 102, 110, 139, 163
<b>Leucose bovine enzootique</b> Virus de la leucose bovine <i>Retroviridae</i>	+	Plus souvent les adulte	De nombreuses infections sont subcliniques Le diagnostic clinique n'est possible qu'en cas de phase tumorale Une proportion de 0,1 % à 10 % des bovins infectés développe la phase tumorale, contrairement aux ovins où tous les individus développent des tumeurs et meurent dans les 5 à 7 années suivant l'inoculation Dans la majorité des cas, les tumeurs atteignent les ganglions lymphatiques (un ou plusieurs) et peuvent s'étendre aux organes les plus divers Les symptômes, s'ils sont visibles, sont la conséquence des phénomènes compressifs engendrés par les tumeurs	139
<b>Louping-ill</b> Virus du louping-ill <i>Flaviviridae</i>	+	Animaux de tout âge	Affecte principalement le mouton Transmis par la tique <i>Ixodes ricinus</i> Infection le plus souvent subclinique  Parmi les animaux infectés, seuls certains présentent des troubles du système nerveux central caractérisés par de l'ataxie, de la paralysie, du coma et la mort	139
<b>Immunodéficience bovine</b> <i>Lentivirus</i> <i>Retroviridae</i>	++++ <sup>(b)</sup>	Animaux adultes	La période d'incubation est longue, de 3 à 5 ans Leucocytose Lymphadénopathie avec hyperplasie folliculaire Lésions cutanées rebelles au traitement Méningo-encéphalite	9, 18, 28, 81, 132, 135, 139

- + : rare  
 ++ : rencontré occasionnellement  
 ++++ : rencontré couramment

a) coryza gangreneux associé au mouton

b) existence de bovins séropositifs dans de nombreux pays; souches virales isolées en nombre limité

## 2.5. Agents transmissibles non conventionnels

Les agents transmissibles non conventionnels ont été provisoirement classés parmi les causes biologiques. Depuis sa première description clinique en 1986 [153], l'ESB a affecté un grand nombre de pays européens [49, 67, 75, 115, 150, 156, 157]. La maladie affecte les bovins adultes, avec un pic de fréquence situé à 4-5 ans [156]. A ce jour, le plus jeune bovin atteint cliniquement d'ESB était âgé de 20 mois et le plus vieux était âgé de 19 ans et 9 mois [44]. La

durée de la maladie clinique, depuis les signes cliniques les plus précoces jusqu'à la mort ou la mise à mort, peut être inférieure à deux semaines [85, 98, 125, 154] ou se prolonger jusqu'à une année [85]. La durée moyenne est d'un ou deux mois environ [85]. La fréquence des signes cliniques neurologiques observés chez 164 771 bovins atteints d'ESB a été déterminée par Wilesmith [156]. Dans plus de 50 % des cas, on observe les troubles et les anomalies suivants :

- a) troubles psychiques : crainte, modification du tempérament, position anormale des oreilles et comportement anormal ;
- b) troubles de la sensibilité : réponse exagérée aux stimuli, léchage excessif ;
- c) anomalie de la posture et des mouvements : ataxie et tremblements.

Une grande majorité d'animaux malades présentent des signes cliniques entrant dans ces trois catégories. De plus, certains signes généraux peuvent être associés à l'ESB : altération de l'état général, amaigrissement et une diminution de la production laitière. Des variations considérables dans la présence et la gravité des signes cliniques pris individuellement ont été constatées. Si les animaux sont maintenus dans un environnement calme et familier, la gravité des signes cliniques, particulièrement l'hyperesthésie, est diminuée. Après quelques semaines, les signes cliniques conduisent progressivement à des chutes répétées, puis à un décubitus permanent et enfin à la mort [85].

La détection de l'ESB repose sur l'observation des signes cliniques [156] et/ou nécessite une surveillance active basée sur la mise en évidence de la protéine prion anormale PrP<sup>Sc</sup> par des tests immunologiques rapides effectués sur des prélèvements réalisés au niveau du système nerveux central des animaux et ce, *post mortem* ou lors de leur abattage [107, 108, 115]. Le diagnostic de confirmation repose sur un examen histologique du système nerveux central démontrant l'aspect spongiforme de l'encéphale, sur l'extraction et l'examen des fibrilles associées à la scrapie ou examen SAF (*scrapie associated fibrils*), sur l'immunocytochimie ou sur le western-blot [85, 156].

Le nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) a été identifié pour la première fois au Royaume-Uni en 1996 [158]. Ultérieurement, il a été montré que la souche de l'agent pathogène responsable du vCJD est très semblable à celle de l'agent de l'ESB [19, 77]. Plusieurs revues ont été rédigées sur le sujet [par exemple 162].



## 3. Causes non biologiques

### 3.1. Causes mécaniques

La probabilité de l'occurrence des causes mécaniques augmente avec l'âge des animaux. Les pathologies traumatiques du système nerveux sont relativement rares chez les animaux de rente [73], sauf chez les animaux lourds pour lesquels les chevauchements et les chutes sont plus dommageables [46]. Les problèmes vasculaires ne sont généralement pas observés chez l'animal [73]. Les fractures du crâne ou du rachis, les (sub)luxations et les compressions médullaires se caractérisent le plus souvent par une hyperesthésie du segment se trouvant juste avant le siège de la lésion, une parésie ou une paralysie et une insensibilité en arrière du siège de la lésion. Les accidents *peripartum* proviennent soit de la surcharge pondérale induisant un traumatisme des vertèbres lombo-sacrées, des lésions occasionnées à la filière pelvienne lors du part (parésie ou paralysie du part) ou, plus fréquemment, d'une ischémie résultant d'un décubitus prolongé (paraplégie *postpartum*). La spondylose ossifiante peut être observée chez des taureaux âgés et lourds [6]. Une douleur intense consécutive à un corps étranger peut également induire des TEN.

Les pathologies nerveuses néoplasiques chez les bovins sont rares [55, 73, 99, 161]. La durée de vie plus brève des bovins dans les conditions actuelles peut être une explication. En France, sur la base d'enquêtes réalisées à l'abattoir, leur fréquence a été estimée entre 0,1 et 10 tumeurs par million d'animaux [69]. En Belgique, dans le cadre du réseau d'épidémiosurveillance de l'ESB, sur un total de 375 examens histopathologiques réalisés en 1998 et 1999, seul un neuroblastome cérébelleux a été identifié [125, 126].

### 3.2. Causes physiques

Les causes physiques sont assez rares. L'insolation ou le coup de chaleur trouvent leur place ici parce qu'ils entraînent fréquemment un œdème cérébral [93]. Ils affectent plus souvent les jeunes animaux en raison du rapport élevé entre la surface corporelle et le poids. Des animaux plus âgés et gras, et des animaux confinés (transport) ou insuffisamment abreuvés peuvent cependant aussi être concernés par ces pathologies. La fulguration ou l'électrocution conduisent à un choc nerveux se traduisant le plus souvent par la mort immédiate ou, occasionnellement, par une perte de conscience temporaire suivie ou non de séquelles nerveuses [11].

### 3.3. Causes chimiques

Les causes chimiques occupent historiquement la deuxième position parmi les causes non biologiques des TEN en Europe occidentale [124]. La gamme potentielle des toxiques présents dans l'environnement des ruminants adultes est grande [31, 43]. Les cas d'intoxication semblent être plus fréquents au printemps et en été, en raison des traitements phytosanitaires et de la mise en pâture des bovins [43]. En outre, la curiosité naturelle, l'habitude de lécher et le fort appétit parfois peu sélectif des bovins en font des cibles privilégiées [6, 20]. Les intoxications d'origine chimique les plus courantes induisant des TEN englobent les intoxications par le sel (régions maritimes), le plomb, les organophosphorés et les carbamates ainsi que par certains végétaux. L'importance relative d'un certain nombre de toxiques tels que les métaux lourds et les métalloïdes, mais aussi d'autres toxiques industriels ou non industriels (plomb, arsenic, mercure, strychnine et cyanures) a tendance à régresser du fait d'une meilleure information et prévention. Néanmoins des intoxications ponctuelles par certains polluants ne pourront jamais être écartées et peuvent avoir de graves répercussions économiques, médicales ou sociales. Celles-ci doivent donc faire l'objet d'une attention toute particulière, afin de minimiser les risques encourus par les animaux de rente et donc par le consommateur. L'intoxication par le plomb (saturnisme) reste une des plus fréquentes [5, 43]. Le saturnisme aigu est caractérisé par de l'amaurose, du pousser au mur et de la cécité, ce qui se traduit chez les bovins par la position de « radar » des oreilles, des errances et de l'incoordination motrice accompagnée de dépression ou de convulsion. De la diarrhée ou de la constipation, de l'arumination et du tympanisme peuvent aussi être observés. Une mastication « à vide » s'accompagnant d'une salivation spumeuse est un signe très suggestif et a valu au saturnisme le nom de « maladie du mâchonnement ». L'intoxication chronique est quant à elle caractérisée par de l'anorexie, un arrêt de la rumination, du météorisme, une inhibition de la croissance, une dégradation de l'état général ainsi qu'une anémie légère à modérée, accompagnée d'une augmentation de la protoporphyrinémie [136]. Des avortements et du jetage peuvent aussi être observés. Les intoxications par des biocides sont devenues moins fréquentes chez les bovins, du fait de l'utilisation plus rationnelle de ces produits [120, 137]. Néanmoins, certaines races de ruminants telle que la race charolaise semblent être plus sensibles à une intoxication par les organophosphorés ou carbamates [95]. Les signes cliniques observés dans ce cas sont attribuables à une inhibition d'estérases. Cette inhibition aboutit à une combinaison variable de signes muscariniques (vomissement, diarrhée, salivation, incontinence urinaire, lacrymation, bronchoconstriction, tympanisme, myosis, bradycardie), nicotiques (tremblements, convulsions, parésie et paralysie) et nerveux centraux plus tardifs et moins souvent observés (hyperexcitabilité, dépression, prostration, coma). L'utilisation médicale des organochlorés a été fortement limitée puisque la

commercialisation et l'emploi du lindane comme seul principe actif ont été interdits. Des spécialités à usage auriculaire enregistrées pour certains animaux de compagnie en contiennent encore. Son emploi toujours effectif en agriculture peut donner lieu, lors de contact ou d'ingestion, à des intoxications cliniques. Dans ce cas, le tableau clinique est dominé par de l'agitation, des fasciculations musculaires, de l'ataxie, des convulsions et de l'hyperthermie [22].

Les intoxications par les chlorates, les nitrates ou lors d'exposition chronique au cuivre (surtout chez le jeune veau) sont responsables d'une élévation du taux de méthémoglobine entraînant une diminution de l'oxygénation cellulaire. Une cyanose, un sang noirâtre peu coagulable et une tachycardie de compensation sont observés et sont accompagnés de somnolence, de dyspnée [11]. La mort est constatée lorsque le taux de méthémoglobinémie atteint ou dépasse 80 %. Les chlorates constituent un herbicide total relativement peu toxique pour les bovins [22], mais sont très appétants et peuvent par conséquent être consommés en quantité importante [42]. Quant aux intoxications par le métaldéhyde, molluscicide très courant, elles sont beaucoup moins fréquentes chez la bête bovine [20] que chez les carnivores domestiques qui sont souvent enclins à consommer des appâts préparés à des fins criminelles. Dans ce cas, les ruminants atteints présentent des troubles digestifs (salivation, diarrhée) et nerveux (tremblements musculaires, convulsions, ataxie). Une cécité peut être observée [22].

Les nitrates, transformés en nitrites plus toxiques dans le rumen, peuvent parfois être rendus responsables d'intoxications suite à l'ingestion de plantes telles que le colza, les choux, les betteraves, les navets, le ray-grass, devenues trop riches en nitrates en raison de diverses circonstances environnementales ou climatiques défavorables, comme l'humidité et le gel précoce [43, 80, 95]. L'utilisation excessive d'engrais, d'herbicides phénoxy-acides et la pollution des eaux peuvent aussi être des intervenants non négligeables dans ce type d'intoxication. Comme les chlorates, la toxicité des nitrites est liée à son action irritante pour les muqueuses et méthémoglobinisante [62].

Un grand nombre de végétaux contenant des substances toxiques se retrouvent dans la nature [20, 41]. La fréquence respective de chacun d'entre eux dépend du biotope rencontré. Sauf exception (par exemple *Atropa belladonna*), seul un traitement symptomatique peut être tenté face à une intoxication végétale [22]. Si l'animal meurt, une autopsie et une détermination des restes de végétaux contenus dans le rumen ou retrouvés sur le terrain seront utiles pour identifier le risque et éviter de nouveaux cas [43]. Lors de litige juridique, comme par exemple lors de dépôts de taille de haies sur une pâture par un voisin, une identification botanique des végétaux déposés sur la pâture pourrait être jugée insuffisante et doit donc être accompagnée d'une identification botanique et/ou chimique sur l'animal. Certains de ces végétaux toxiques peuvent être rencontrés dans les campagnes et peuvent induire des TEN. Une énumération

non exhaustive inclut : l'if (intoxication subaiguë par *Taxus baccata*) [22, 124], de nombreuses plantes cyanogènes (laurier cerise, sureau, lin, sorgho) [20, 22], les glands de chêne [95], le ray-grass quand celui-ci est parasité par *Neotyphodium* ou *Acremonium* [10, 34], le seigle quand celui-ci est parasité par *Claviceps purpurea* (ergotisme) [11, 62, 94], la grande ciguë [6], le buis, le thuya, la morelle noire, la belladone, l'œnanthe safranée, le rhododendron, l'azalée et le cytise [20].

En raison d'une sécurité accrue, les intoxications médicamenteuses sont devenues plus rares. Elles se rencontrent lors de surdosage, d'un mauvais usage des médicaments, d'utilisation de préparations non autorisées ou d'une sensibilité particulière liée à la race ou l'âge. Les principaux principes actifs dont l'usage nécessite une attention particulière sont les suivants : les quinolones [148], les nitrofuranes qui sont interdits d'utilisation [2, 35, 137], les sulfamidés [62], la lincomycine qui peut induire une acétonémie [11, 121], les aminosides [11, 39], mais aussi certains antiparasitaires, antiprotozoaires ou anthelminthiques comme les dérivés d'ivermectines et de milbémycines tels que la moxidectine (observations cliniques non publiées), les salicylanilidés pouvant entraîner de la cécité [11, 147], l'amprolium [146], le lévamisole/tétramisole [47] et les organophosphorés.

### 3.3. Causes métaboliques et nutritionnelles

Les affections métaboliques [88] sont des troubles fonctionnels ne s'accompagnant généralement pas de lésion des tissus nerveux [6, 103]. Elles représentent un grand problème chez les bovins [73] et leur fréquence relative est la plus élevée parmi les causes non biologiques induisant des TEN [124]. Étant donné que la mortalité est relativement basse et que dans beaucoup de cas, cause et thérapie sont connues, seuls 17 % des cas sont référés [73]. Du fait des modifications précoces de comportement, les pathologies métaboliques et nutritionnelles (Tableau IV) interviennent dans le diagnostic différentiel de l'ESB [73, 83, 85, 131]. Une durée d'évolution insidieuse et une récurrence à un traitement doivent faire suspecter l'ESB. La nécrose du cortex cérébral est une maladie métabolique à caractère sporadique (élevage traditionnel) ou enzootique (par exemple chez des bovins à l'engrais). Elle est due à une perturbation de la synthèse ruménale de la vitamine B1, à une destruction de la vitamine B1 par des thiaminases, ou à un excès de soufre dans la ration. Elle touche le plus souvent des animaux âgés de plus de 4 mois (rumen fonctionnel) à moins de 24 mois [73, 92]. Des cas sont décrits également chez des animaux plus âgés [73]. Une cécité d'origine centrale est observée. Suite à l'importante augmentation des pressions intra-crânienne et intra-rachidienne, l'animal élève la tête en extension. Lorsqu'il est encore capable de marcher, il adopte un pas de parade, tourne en rond en longeant les parois. Une ataxie et une incoordination motrice croissante s'installent peu avant le décubitus [136].

**Tableau IV. Principales causes métaboliques et nutritionnelles des troubles d'expression nerveuse en Europe occidentale chez les bovins âgés de plus de 12 mois**

Affection et agent causal	Fréquence	Âge et type d'animaux	Condition d'apparition et principaux signes cliniques	Références
<b>Fièvre de lait</b> Hypocalcémie puerpérale	++++	Surtout les vaches laitières	Lors de la période péri-partum (en particulier les premières semaines post-partum) L'incidence estimée est de 5 à 6 vaches pour 100 vaches par année à risque	3, 6, 11, 61, 66, 88, 89,
Fièvre vitulaire Parésie puerpérale			L'affection représente 70 % à 80 % des vaches couchées Cause : excès de cations en période de tarissement On décrit classiquement trois stades Stade 1 : l'animal est capable de se lever et de rester debout - le pis est tendu en l'absence de mammite - une excitation initiale et des spasmes tétaniques peuvent être aperçus Stade 2 : décubitus sternal en auto-auscultation le plus souvent (tête dans le flanc) - avec anorexie, atonie du rumen et absence de défécation - puis il y a engourdissement (extrémités froides) et atténuation des réflexes - les yeux sont tristes, fixes et les pupilles sont dilatées (mydriase) Stade 3 : le décubitus devient latéral avec perte de conscience, coma et mort La réponse à la calcithérapie est généralement bonne (l'éructation est le premier signe d'amélioration)  Certaines fièvres de lait nécessitent l'apport de potassium et de vitamine D	155
<b>Tétanie d'herbage</b> Hypomagnésiémie	+++	Génisses ou vaches	Surtout chez les génisses ou les vaches en lactation Aussi chez des vaches hautes productrices en fin de tarissement Ou chez des vaches après un très long transport ou un stress Plus fréquente au printemps et en automne lors de consommation d'herbe jeune ou de second cycle ou d'herbe sur laquelle une grande quantité d'engrais a été épandu (potasse et azote sous forme de nitrate d'ammonium) Yeux exorbités, grincements des dents Excitation, hyperesthésie, mouvements des oreilles vers l'arrière Fasciculations musculaires (épaules, cuisses), tétanie Hyperthermie inconstante (surtout observée au moment des crises) Mort soudaine ou convulsions Réponse à la magnésiothérapie mais des échecs sont fréquents Le dosage de la fraction du magnésium urinaire est un moyen de diagnostic précoce Le dosage de magnésium peut être réalisé dans l'humeur aqueuse jusque 48 h après la mort (si la température extérieure < 23°C)	6, 11, 88, 89, 97, 101, 155
<b>Acétonémie</b> Toxémie de gestation de la vache viandeuse	++++	Vache laitière, bovin viandeux en malnutrition protéocalorique	Du début de lactation jusqu'au pic de lactation Elle est primaire lorsque la balance énergétique est négative (déséquilibre entre les apports et les besoins) Elle est secondaire quand l'appétit diminue suite à une autre maladie (boiterie, mammite, déplacement de caillette) Baisse de la production laitière D'abord l'appétit est capricieux : les concentrés et les ensilages sont délaissés Puis amaigrissement rapide et durable pas de température Les symptômes nerveux sont inconstants, généralement tardifs et intermittents : - léchage incessant, mastication et salivation - incoordination, mouvements en cercle, pousser au mur - parfois, tremblements, tétanie, délire passager Une odeur d'acétone peut être décelée dans l'air expiré, dans les urines et le lait Les corps cétoniques peuvent être aisément dosés dans l'urine, le lait et le sang La vache malade guérit dans 80 % des cas	52, 76, 88, 89, 155
<b>Urémie</b> Insuffisance rénale	++	Animaux de tout âge	Stade terminal de l'insuffisance rénale ou inflammation rénale aiguë ou chronique Température normale, ou augmentée si l'origine est inflammatoire Déshydratation, anorexie, faiblesse Tachypnée et tachycardie Des troubles à expression nerveuse sont rapportés : - dépression - tremblements musculaires, piétinement continu	11, 88, 155

Tableau IV. (suite)

Affection et agent causal	Fréquence	Âge et type d'animaux	Condition d'apparition et principaux signes cliniques	Références
<b>Excès d'azote non protéique</b> Alcalose du rumen Intoxication à l'urée	++	Surtout les vaches laitières	<p>Souvent il s'agit d'une série clinique</p> <p>La cause d'intoxication est un excès d'azote non protéique (ANP) dans la ration, dû à :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- un excès d'apport (vaches laitières) ou le passage brutal à un apport d'ANP</li> <li>- un système de distribution d'ANP défectueux (vaches laitières)</li> <li>- une ingestion accidentelle d'engrais azotés</li> <li>- une accumulation d'ANP dans l'herbe lors d'utilisation de grandes quantités d'engrais ou lorsque le temps devient subitement froid (perturbation de la synthèse des protéines)</li> </ul> <p>Un délai de 3 à 4 semaines est nécessaire pour adapter la microflore ruménale du bétail de telle sorte qu'elle puisse utiliser des quantités progressivement augmentées d'ANP. Toutefois, l'adaptation est perdue rapidement (après 1 à 3 jours)</p> <p>Après ingestion, l'ANP est hydrolysé et absorbé s'il est en excès par rapport aux squelettes hydrocarbonés disponibles dans le rumen. Il induit une hyperammoniémie si le foie est dépassé dans son rôle de synthèse de l'urée</p> <p>Évolution le plus souvent suraiguë (&lt; 4 heures)</p> <p>Anorexie, chute brutale de la lactation</p> <p>Piétinement continu (membres postérieurs), dos voussé (douleur abdominale)</p> <p>Ramollissement des excréments (effet de l'ANP sur les muqueuses digestives)</p> <p>Quelques tremblements et salivation mousseuse</p> <p>La vache se couche difficilement puis ne se relève plus</p> <p>Hyperflexie, opisthotonos en phase terminale</p> <p>Autopsie : pétéchies myocardiques, l'intestin grêle est très congestionné avec des suffusions sous-muqueuses</p> <p>Traitement : eau froide (dilution et diminution de l'activité de l'uréase bactérienne) et vinaigre (diminution du pH)</p>	11, 62, 106, 116, 155
<b>Acidose lactique aiguë du rumen</b>	+++	Animaux de tout âge	<p>Importance de l'anamnèse : animal détaché se gavant d'amidon ou de sucres solubles en grande quantité sans transition alimentaire (par exemple : fruits, céréales, betteraves, racines de carottes, chicons [endives], pommes de terre) ou erreur de programmation de la distribution automatisée des concentrés</p> <p>Anorexie, faiblesse, fatigue, dépression</p> <p>Hyperpnée, tachycardie</p> <p>Atonie du rumen (météorisation) avec liquéfaction de son contenu (aspect laiteux)</p> <p>Diarrhée (matières fécales jaunâtres et mousseuses), déshydratation</p> <p>Tremblements, démarche ébrieuse</p> <p>Décubitus sternal</p>	88, 142, 155
<b>Encéphalose hépatique</b> Hépatose	+	Animaux de tout âge	<p>On peut observer des signes nerveux associés à des affections hépatiques d'origine toxique (mycotoxines, plantes hépatotoxiques, alcaloïdes de la pyrrolizidine du séneçon, cuivre) ou lors de parasitoses hépatiques chroniques importantes (distomatose)</p> <p>De nombreux facteurs explicatifs des troubles nerveux sont incriminés (par exemple : les troubles du métabolisme protéique avec hyperammoniémie)</p> <p>Apathie, dépression, léthargie</p> <p>Troubles du comportement : hallucinations, accès furieux</p> <p>Convulsions et coma</p> <p>Les enzymes SGOT, SGPT, phosphatase alcaline, SDH sont fortement augmentées</p> <p>Les protéines totales sont diminuées</p>	11, 84, 88
<b>Photosensibilisation</b>	++++	Animaux de tout âge avec peau non pigmentée et/ou faiblement recouverte de poil	<p>Les peaux les moins colorées et les plus exposées (dos) sont les plus sensibles</p> <p>Les ultra-violets sont toujours nécessaires pour activer les agents photodynamiques ; la lumière du jour suffit mais la pathologie est surtout rencontrée par temps ensoleillé</p> <p>Cette activation des agents photodynamiques produit de l'énergie et occasionne des lésions cutanées</p> <p>La photosensibilisation est primaire quand elle est d'origine exogène :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- par l'alimentation ou par contact</li> <li>- agents photodynamiques végétaux (séneçon, sarrasin, certaines variétés de trèfles et de luzerne) ou médicamenteux (phénothiazine, sulfamidés, tétracycline)</li> </ul> <p>La photosensibilisation est secondaire quand elle est d'origine hépatogène ; la phyloérythrine dérive de la lyse anaérobie de la chlorophylle par les micro-organismes du rumen. Elle est absorbée normalement dans la circulation sanguine et ensuite éliminée par la voie hépato-biliaire. Toute altération de l'excrétion biliaire (fasciolose étendue, toxiques hépatiques) entraîne son accumulation dans la circulation et peut atteindre la circulation périphérique en concentration adéquate pour induire une photosensibilisation</p> <p>L'apparition d'un cas unique doit faire suspecter la fasciolose hépatique</p> <p>Hyperesthésie des endroits dépigmentés atteints</p> <p>Cédème, exsudat, nécrose et gangrène des endroits exposés selon le stade d'évolution : surtout la tête (mufle, pourtour des yeux), les trayons et la vulve (œdème asymétrique)</p> <p>L'animal recherche l'ombre en pâture (la mise à l'étable fait partie intégrante du traitement)</p> <p>Des signes à expression nerveuse accompagnent les troubles cutanés : état de prostration intense dû à la douleur ou hyperexcitabilité</p>	11, 94, 155

Tableau IV. (suite)

Affection et agent causal	Fréquence	Âge et type d'animaux	Condition d'apparition et principaux signes cliniques	Références
<b>Intoxication au sel ou à l'eau</b>	+	Animaux de tout âge	<p>Apport normal en sel avec abreuvement insuffisant ou nul, suivi d'un abreuvement libre (gel des abreuvoirs) ou ingestion d'eau de mer ou alimentation trop salée</p> <p>Les vaches laitières en haute production sont physiologiquement plus sensibles</p> <p>Induit un œdème cérébral</p> <p>Intoxication aiguë :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- diarrhée muqueuse, polyurie</li> <li>- nystagmus, cécité, opisthotonos</li> <li>- tremblements, parésie</li> <li>- décubitus avec convulsions</li> <li>- mort 24 h à 48 h après les premiers signes cliniques</li> </ul> <p>Intoxication chronique :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- inappétence, perte de poids, déshydratation</li> <li>- faiblesse, diarrhée</li> <li>- collapsus et convulsions tétaniques à l'effort</li> </ul>	6, 11, 88
<b>Nécrose du cortex cérébral</b> NCC	+++	Surtout animaux âgés de 4 à 24 mois	<p>Se raréfie du fait d'une meilleure information</p> <p>Est due à un trouble du métabolisme de la vitamine B1 :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- soit par carence de production par la flore du rumen</li> <li>- soit par manque de résorption</li> <li>- soit en présence de thiaminases (aliments, dérivés de la pipérazine)</li> </ul> <p>Des modifications de la flore du rumen perturbent la production de vitamine B1 :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- changement d'alimentation</li> <li>- interruption passagère de l'abreuvement</li> </ul> <p>Pas de température</p> <p>Isolement du reste du troupeau</p> <p>Cécité d'origine centrale :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- de jour comme de nuit</li> <li>- absence du réflexe palpébral et présence du réflexe pupillaire (contrairement au dernier stade de la carence en vitamine A)</li> <li>- l'animal butte contre les obstacles, il tourne en rond en longeant les parois du boxe (disposition circulaire de la litière)</li> </ul> <p>Strabisme dorso-médial</p> <p>L'animal élève la tête en extension suite à l'augmentation des pressions intra-crânienne et intra-rachidienne (maladie de l'astronome)</p> <p>Lorsqu'il est encore capable de marcher, il adopte un pas de parade</p> <p>Il perd l'intérêt pour le milieu environnant</p> <p>Décubitus sternal ou latéral avec mouvements de pédalage et opisthotonos</p> <p>Évolution vers la mort en 3 à 10 jours</p> <p>Bonne réponse à l'administration de vitamine B1 lors de traitement précoce</p>	6, 73, 92, 128, 136
<b>Carence en vitamine A</b>	++	Surtout les jeunes	<p>Alimentation carencée en vitamine A de façon prolongée et non complétée avec un complexe minéral vitaminé (ensilage de maïs, pulpes séchées, céréales, tourteaux de lin)</p> <p>Perte de la vision crépusculaire au stade précoce</p> <p>Disparition du réflexe palpébral et du réflexe pupillaire contrairement à la NCC</p> <p>Troubles nerveux très fréquents : convulsions puis paralysie</p>	6, 11, 88
<b>Carence en vitamine E</b> Sélénium	+++	Surtout les jeunes	<p>Généralement, la myopathie-dyspnée est rencontrée chez les jeunes animaux mais peut également être observée chez des animaux plus âgés</p> <p>Parésie spastique</p>	11, 145

- + : rare
- ++ : rencontré occasionnellement
- +++ : rencontré moins fréquemment
- ++++ : rencontré couramment

### **3.4. Causes génétiques**

Les affections d'origine génétique dans l'espèce bovine sont nombreuses et variées [6, 62]. La sélection intensive des reproducteurs à l'intérieur d'un petit pool de sujets d'élite augmente la diversité et la fréquence des troubles de cette nature [6, 138]. Généralement, les animaux atteints d'anomalies sont morts ou euthanasiés avant l'âge de 12 mois [73, 91, 134]. L'ataxie progressive des bovins charolais [6, 62] a été décrite chez des bovins de 8 à 24 mois. La spasticité périodique affecte des bovins âgés de 3 à 7 ans [6, 11] tandis que l'épilepsie idiopathique affecte généralement des bovins de moins de deux ans [11]. La mannosidose [7, 21, 51] et la myélo-encéphalopathie dégénérative progressive bovine, appelée encore syndrome de Weaver, affectent essentiellement des bovins âgés de moins d'un an mais ont déjà été observées chez des animaux plus âgés [13, 50, 91, 113, 138]. De la cécité a été observée chez un bovin de race Devon âgé de 14 mois qui présentait une lipofuchsinose neuroviscérale [11, 72].

### **3.5. Causes immunes**

Parmi les causes immunes, les allergies médicamenteuses sont les plus fréquentes. Celles-ci ont tendance à se raréfier en raison de la production de vaccins en culture cellulaire en lieu et place d'œufs embryonnés. Les accidents observés ont un caractère aigu, sont peu spécifiques et à expression clinique très variable. De l'incoordination motrice peut être observée [4].



## 4. Causes non spécifiques ou inconnues

En raison du fait qu'un diagnostic étiologique n'est pas toujours demandé car onéreux, un grand pourcentage des TEN sont d'origine inconnue. Ce pourcentage a été estimé à 39 % des animaux suspects de rage en Suisse [54] et historiquement à 40 % des bovins pour lesquels des troubles neurologiques ont été rapportés dans un laboratoire de diagnostic vétérinaire en Belgique [124]. Il est probable que certains cas sans altération pathologique étaient de nature métabolico-toxique, comme cela avait été proposé par McGill et Wells [99]. Comme l'indiquent les statistiques de l'Institut de neurologie animale de l'université de Berne, le pourcentage relatif de cas sans diagnostic a diminué au cours du temps du fait de l'expérience acquise et le recours à des techniques d'examen amélioré [73]. Plusieurs entités d'origine inconnue ont été décrites dans le cadre du diagnostic différentiel de l'ESB : des convulsions épileptiformes chez des bovins adultes [16, 93], une chromatolyse neuronale et une nécrose des noyaux du tronc cérébral accompagnée ou non d'une sclérose de l'hippocampe chez des bovins âgés de 6 à 16 ans [82].

## 5. Discussion et conclusions

Une classification des TEN susceptibles d'être rencontrés en Europe occidentale, chez les bovins âgés de 12 mois et plus a été établie selon l'étiologie, la fréquence, l'âge et le type d'animaux concernés, les conditions d'apparition et les principaux signes cliniques observés. Les TEN d'incidence rare sont plus fréquemment décrits dans la littérature scientifique par leur caractère original. Il a également été tenu compte de l'expérience acquise par la profession vétérinaire. Pour ce faire, un tableau préliminaire avait été diffusé à un cercle restreint de vétérinaires praticiens et de laboratoires de diagnostic ayant une motivation particulière sur le sujet, pour qu'ils l'utilisent et le critiquent sur la base de leur activité quotidienne. Cette classification constitue également une aide pour le médecin vétérinaire praticien placé devant un tableau susceptible de générer un diagnostic différentiel qui inclut l'ESB. Pas moins de 85 étiologies pouvant induire des TEN ont été recensées. D'autres classifications sont disponibles en fonction de l'approche utilisée, comme par exemple celle des diagnostics anatomo-pathologiques [73].

L'expression clinique des TEN chez un animal est fonction de plusieurs paramètres : la nature de l'agent causal (dose, virulence) [130], la localisation des lésions occasionnées [63, 111], l'hôte (résistance, état général, statut immunitaire) et l'environnement ; certains signes cliniques peuvent être exacerbés lorsque l'environnement de l'animal est modifié [85, 125]. La qualité d'observation intervient en premier lieu et est proportionnelle au niveau d'information, de sensibilisation et de formation des éleveurs et des vétérinaires. L'intensité d'observation des animaux joue également un rôle et semble directement proportionnelle à la taille du troupeau. En effet, en référence au réseau NAHMS, le taux d'atteinte de troubles neurologiques d'une vache viandeuse sur 1 000 est doublé lorsque la taille du troupeau est inférieure à 100 bêtes et elle est nulle lorsque la taille du troupeau est supérieure à 300 bêtes [30]. Tenant compte de ces paramètres, il subsiste toujours une variabilité qui dépend de l'animal et de l'observateur (tableau clinique, phase pré-patente, durée d'évolution). Pour améliorer les connaissances concernant les TEN, il convient :

- a) d'améliorer la sensibilisation, l'information et la formation des éleveurs et des vétérinaires,
- b) d'utiliser une méthode uniforme d'examen clinique,
- c) de recourir plus systématiquement à des examens complémentaires,
- d) de former des réseaux sentinelles d'éleveurs et de vétérinaires parmi les plus motivés,
- e) de transcrire les résultats des observations sous une forme codifiée et standardisée, tant sur le plan de la nature que de la durée,

- f) de rassembler les informations,
- g) d'enrichir une base de données relationnelles,
- h) de discuter les expériences vécues.

Une typologie des troubles neurologiques pourra alors être établie et des facteurs de risque mis en évidence.

Ce type de réseau a été initié durant l'année 2000, respectivement sur les bovins âgés de plus de 12 mois en Belgique (L. Xambeu, communication personnelle) et sur les bovins âgés de plus de 18 mois en France [24]. La pérennité de tels réseaux dépendra du degré de participation volontaire des éleveurs et des médecins vétérinaires, du degré d'analyse des données qui en sera faite et du degré de rétroaction positive (diffusion de rapports synthétiques et spécialisés entre les acteurs des réseaux). Les pathologies neurologiques dans la pratique vétérinaire sont rares [65] et leur diagnostic étiologique est rarement obtenu [58], demande du temps et est relativement coûteux [6]. Pour disposer d'une meilleure connaissance en la matière, il convient d'assurer un financement externe pour les charges liées aux investigations d'un diagnostic étiologique. Cette connaissance est, et restera, particulièrement utile en matière d'encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles, puisqu'elle permettra, d'une part, de retirer les animaux contaminés de la chaîne alimentaire et, d'autre part, de tenir compte du polymorphisme de l'expression clinique. Par ailleurs, dans l'hypothèse d'un passage inter-espèce des encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles, le temps d'incubation et le tableau clinique pourraient être modifiés, voire atténués [60]. Par analogie, il est connu que les ruminants sauvages en captivité atteints d'ESB présentent des signes cliniques similaires mais la durée d'évolution de la maladie est plus courte, de l'ordre de quelques jours [86]. Dès lors, le développement des connaissances concernant les troubles neurologiques et le renforcement des réseaux d'épidémiosurveillance et d'épidémiologie existant dans les différents pays sont des priorités.

Pour poser un diagnostic étiologique, il est nécessaire de procéder à un examen clinique selon une méthodologie standardisée, de transmettre une anamnèse complète et de recourir à des examens complémentaires adéquats. Malgré les grands progrès accomplis dans le domaine de la neurologie vétérinaire, des lacunes subsistent dans le relevé et l'analyse systématique des données. Il est regrettable qu'en raison de la difficulté de récolte des anamnèses, l'établissement d'un diagnostic et la réalisation d'enquêtes épidémiologiques soient rendus difficiles [6, 73]. Poser un diagnostic étiologique est utile pour plusieurs raisons :

- a) classer les pathologies en fonction de leur fréquence d'apparition, et partant, accorder toute l'importance voulue à celles qui sont le plus fréquemment rencontrées (mise en évidence de facteurs de risque permettant leur maîtrise),

b) mettre à jour de nouvelles pathologies pour mieux les comprendre,

c) évaluer la pertinence du diagnostic clinique posé afin d'améliorer la méthodologie de l'approche clinique utilisée.

L'ESB est une maladie neurodégénérative. La présence de signes cliniques semble liée à la localisation et au degré de vacuolisation des neurones. Les principaux signes d'appel consistent en des troubles psychiques (crainte, modification du tempérament, position anormale des oreilles et comportement anormal) ; des troubles de la sensibilité (réponse exagérée aux stimuli, léchage excessif) et des anomalies de la posture et des mouvements (ataxie et tremblements). L'identification de ceux-ci nécessite une démarche clinique (examen méthodique de l'animal au licol et en mouvement dans un environnement inhabituel). Aucun signe clinique n'étant pathognomonique, il est dangereux de ne considérer qu'une seule étiologie lors de l'apparition de signe(s) clinique(s) neurologique(s) chez un animal. La connaissance des éléments de diagnostic différentiel des troubles à expression nerveuse contribue à une meilleure épidémiosurveillance clinique de l'ESB.

## **6. Remerciements**

Ce travail a été réalisé en collaboration avec les laboratoires belges de diagnostic vétérinaire et des médecins vétérinaires praticiens. Il a été supporté par les membres du groupe belge d'avis scientifiques relatifs aux encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles créé sous l'égide du ministère des Classes moyennes et de l'Agriculture.

Les médecins vétérinaires suivants sont vivement remerciés pour leur contribution active à l'élaboration de ce document : G. Andrieu, G. Bertels, G. Boone, D. Cassart, F. Coignoul, A. Delaunois, L. De Meulemeester, R. Danvoye, A. Didier, J. Dufey, D. Lecomte, L. Lecomte, J.-M. Lecomte, B. Limbourg (†), B. Losson, E. Myten, F. Moreau, P. Mullier, C. Manteca, B. Sustronck, M. Persyn, J.-M. Robijns, M. Van Aert et G. Vermeiren.

## 7. Bibliographie

1. ACHA P.N., SZYFRES B. Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux, 2<sup>e</sup> éd. Office international des épizooties, Paris, 1989, 1063 pp.
2. ALI B.H. Some pharmacological and toxicological properties of furazolidone. *Vet. Res. Commun.*, 1983, **6**, 1-11.
3. ANDRESEN U., KIETZMANN M., ANDRESEN P. Efficacy and tolerance of a calcium-magnesium-aspartate solution in the treatment of hypocalcemic parturient paresis in cows. *Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr.*, 1999, **112**, 400-406.
4. ANONYME. Pharmacovigilantie: anaphylaxie bij runderen. Onverenigbaarheid tussen vaccins en antibiotica: mogelijke aanleiding tot ernstige shockreacties. [Pharmacovigilance. Anaphylaxie chez les bovins, incompatibilité entre les vaccins et les antibiotiques : raison possible d'une réaction de shock sévère.] Communiqué de presse de Mycofarm, Boehringer, Pfizer et Vétoquinol. Mycofarm, Turnhout, 1996, 3 pp.
5. BAKER J.C. Lead poisoning in cattle. *Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)*, 1987, **3**, 137-147.
6. BARLOW R. Differential diagnosis of neurological disorders in cattle. *In Practice*, 1989, **11**, 64-73.
7. BARLOW R., MACKELLAR A., NEWLANDS G., WISEMAN A., BERRETT S. Mannosidosis in Aberdeen Angus cattle in Britain. *Vet. Rec.*, 1981, **109**, 441-445.
8. BASTIAN S., BUFFEREAU J-P., LE DREAM E., BIND J-L., MÜLLER T., TOMA B. La maladie d'Aujeszky en France. *Épidémiol. Santé anim.*, 2000, **38**, 109-114.
9. BELLOC C., POLACK B., SCHWARTZ-CORNIL I., BROWNLIE J., LEVY D. Bovine immunodeficiency virus: facts and questions. *Vet. Res.*, 1996, **27**, 395-402.
10. BERRY P.H., HOWELL J.M., COOL R.D., RICHARDS R.B., PEET R.L. Central nervous system changes in sheep and cattle affected with natural or experimental annual ryegrass toxicity. *Aust. vet. J.*, 1980, **56**, 402-403.
11. BLOOD E.C., RADOSTITS O.M. Diseases of the nervous system. *In Veterinary Medicine*, 7<sup>e</sup> éd. Baillière Tindall, Londres, 1989, 410-448.

12. BODE L., DÜRRWALD R., LUDWIG H. Borna virus infections in cattle associated with fatal neurological disease. *Vet. Rec.*, 1994, **135**, 283-284.
13. BRAUN U., EHRENSPERGER F., BRACHER V. The Weaver syndrome in cattle. Clinical, biochemical and pathologico-anatomic studies in a Braunvieh/Brown Swiss cow with bovine progressive degenerative myeloencephalopathy. *Tierärztl. Praxis*, 1987, **15**, 139-144.
14. BRAUN U., SCHICKER E., HORNLIMANN B. Diagnostic reliability of clinical signs in cows with suspected bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.*, 1998, **143**, 101-105.
15. BRAUN U., ROGG E., WALSER M., NEHRBASS D., GUSCETTI F., MATHIS A., DELPLAZES P. *Trypanosoma theileri* in the cerebrospinal fluid and brain of a heifer with suppurative meningoencephalitis. *Vet. Rec.*, 2002, **150**, 18-19.
16. BRAUN U., SCHWEIZER G., HILBE M. Epileptiform convulsions in a cow with degeneration of the hippocampus. *Vet. Rec.*, 2002, **150**, 281-282.
17. BREWER B.D. Examination of the bovine nervous system. *Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)*, 1987, **3**, 13-24.
18. BROWNLIE J., COLLINS M.E., HEATON P. Bovine immunodeficiency-like virus: a potential cause of disease of cattle? *Vet. Rec.*, 1994, **134**, 289-291.
19. BRUCE M.E., WILL R.G., IRONSIDE J.W., MCCONNELL I., DRUMMOND D., SUTTIE A., MCCARDLE L., CHREE A., HOPE J., BIRKETT C., COUSENS S., FRASER H., BOSTOCK C.J. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, 1997, **389**, 498-501.
20. BRUNETON J. Plantes toxiques. Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. Lavoisier, Paris, 1996, 509 pp.
21. BRYAN L., SCHMUTZ S., HODGES S.D., SNYDER F.F. Bovine beta-mannosidase deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990, **173**, 491-495.
22. BURONFOSSE F., PINEAU X., ALVES DE OLIVEIRA L. Les principales intoxications. *In* Maladies des bovins (Institut de l'élevage, dir.). France Agricole, Paris, 2000, 216-223.
23. CACHIN M., VANDEVELDE M., ZURBRIGGEN A. A case of spongiform encephalopathy ('cattle madness') in a cow in Switzerland. *Schweizer Arch. Tierheilkd.*, 1991, **133**, 53-57.

24. CALAVAS D., DESJOUIS G., COLLIN E., SCHELCHER F., PHILIPPE S., SAVEY M. Incidence et typologie des maladies des bovins adultes à expression nerveuse en France. *Épidémiol. Santé anim.*, 2001, **39**, 121-129.
25. CALLIS J.J., DARDIRI A.H., FERRIS D.H., GAY J.G., MASON J., WILDER F.W. Illustrated Manual –Manuel illustré sur certaines maladies contagieuses des animaux domestiques. Commission mexicano-américaine pour la prévention de la fièvre aphteuse, Mexico, 1985, 27-31.
26. CAPLAZI P., WALDVOGEL A., STITZ L., BRAUN U., EHRENSPERGER F. Borna disease in naturally infected cattle. *J. comp. Pathol.*, 1994, **111**, 65-72.
27. CAPLAZI P., MELZER K., GOETZMANN R., ROHNER-COTTI A., BRACHER V., ZLINSZKY K., EHRENSPERGER F. Borna disease in Switzerland and in the principality of Liechtenstein. *Schweizer Arch. Tierheilkd.*, 1999, **141**, 521-527.
28. CAVIRANI S., DONOFRIO G., CHIOCCO D., FONI E., MARTELLI P., ALLEGRI G., CABASSI C.S., DE IACO B., FLAMMINI C.F. Seroprevalence to bovine immunodeficiency virus and lack of association with leukocyte counts in Italian dairy cattle. *Prev. vet. Med.*, 1998, **37**, 147-157.
29. CENTERS FOR EPIDEMIOLOGY AND ANIMAL HEALTH (CEAH). National Animal Health Monitoring System. Dairy'96, Part I: Reference of 1996 dairy management practices. United States Department of Agriculture, Fort Collins, 1996, 41 pp.
30. CENTERS FOR EPIDEMIOLOGY AND ANIMAL HEALTH (CEAH). National Animal Health Monitoring System. Beef'97, Part II: Reference of 1997 beef cow-calf health and health management practices. United States Department of Agriculture, Fort Collins, 1997, 38 pp.
31. CENTRE D'INFORMATIONS VETERINAIRES EN PHARMACO-TOXICOLOGIE (CIVPT). Analyses toxicologiques. CIVPT, faculté de médecine vétérinaire de l'université de Liège (<http://www.ulg.ac.be/fmv/civpt.htm>, consulté le 13 décembre 2002).
32. COBB S.P., HOGG R.A., CHALLONER D.J., BRETT M.M., LIVESEY R.T., SHARPE R.T., JONES T.O. Suspected botulism in dairy cows and its implications for the safety of human food. *Vet. Rec.*, 2002, **150**, 5-8.
33. COCKCROFT P.D. Pattern-matching models for the differential diagnosis of bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.*, 1999, **144**, 607-610.



34. COLIN E. Intoxication d'un cheptel bovin par une mycotoxine endophyte : observation d'un cas de rye-grass-stagger. *Point vét.*, 1998, **29**, 1157-1159.
35. COMMISSION EUROPEENNE. Règlement 508/1999/CEE du 4 mars 1999 de la Commission modifiant les annexes I à IV du règlement 2377/1990/CEE du Conseil établissant une procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale. *J. off. Communautés eur.*, **L 60**, 9 mars, 16-52.
36. COMMISSION EUROPEENNE. Décision 1999/465/CE de la Commission du 13 juillet 1999 établissant le statut d'officiallement indemne de leucose bovine enzootique des troupeaux bovins de certains États membres ou régions d'États membres. *J. off. Communautés eur.*, **L 181**, 16 juillet, 32-33.
37. CORTEZ P.P., DIAS PEREIDA P., CORTEZ A., THOMPSON G. First confirmed case of malignant catarrhal fever in a cow in Portugal. *Vet. Rec.*, 2001, **149**, 558-559.
38. COUDERT M., BELLI P., SAVEY M., MARTEL J.L. Le réseau national d'épidémiosurveillance de l'encéphalopathie spongiforme bovine. *Épidémiol. Santé anim.*, 1995, **27**, 59-67.
39. CROWELL W.A., DIVERS T.J., MARSHALL A.E., NUSBAUM K.E., LARSEN L. Neomycin toxicosis in calves. *Am. J. vet. Res.*, 1981, **42**, 29.
40. DAUPHIN G., LEGAY V., SAILLEAU C., SMONDACK S., HAMMOUMI S., ZIENTARA S. Evidence of Borna disease virus genome detection in French domestic animals and in foxes. *J. gen. Virol.*, 2001, **82**, 2199-2204.
41. DELAUNOIS A. Le rôle du médecin vétérinaire dans l'évaluation du risque toxicologique. *Ann. Méd. vét.*, 1998, **142**, 307-317.
42. DELAUNOIS A., GUSTIN P., ANSAY M. Toxicité des herbicides chez les animaux domestiques. *Ann. Méd. vét.*, 1992, **136**, 181-192.
43. DELAUNOIS A., BLODEN S., GUSTIN P. Premier bilan d'activités du centre d'informations vétérinaires en pharmaco-toxicologie. *Ann. Méd. vét.*, 1999, **143**, 191-202.
44. DEPARTMENT FOR ENVIRONMENT, FOOD & RURAL AFFAIRS (DEFRA). Bovine spongiform encephalopathy in Great Britain – Monthly statistics – Youngest and oldest cases by year of onset (passive surveillance only). Document du 30 juin 2002. DEFRA,

Londres (<http://www.defra.gov.uk/animalh/bse-statistics/bse/yng-old.html>, consulté le 1<sup>er</sup> juillet 2002).

45. DESMECHT D., CASSART D., ROLLIN F., COIGNOUL F., THAM D.-M. Molecular and clinicopathological diagnosis of non-wildebeest associated malignant catarrhal fever in Belgium. *Vet. Rec.*, 1999, **144**, 388.
46. DIVE M. Rusticité : l'opinion d'un vétérinaire praticien. *Elevages belges*, 2001, **4**, 25-26.
47. DONEV B., STOIANOV K., DZHUROV A., DULEV M. Toxicity of 'Farmakhim' tetramisole in laboratory and farm animals. *Vet. Med. Nauki*, 1982, **19**, 70-78.
48. DUBEY J.-P. A review of toxoplasmosis in cattle. *Vet. Parasitol.*, 1986, **22**, 177-202.
49. DUCROT CH., CALAVAS D., MORIGNAT E., VINARD J.L., COUDERT M., SAVEY M. Surveillance et épidémiologie de l'ESB en France. Analyse de la situation en mai 2001. *Épidémiol. Santé anim.*, 2001, **40**, 15-22.
50. EL HAMIDI M., LEIPOLD H.W., COOK J.E. Ultrastructural changes in Brown Swiss cattle affected with bovine progressive degenerative myeloencephalopathy (Weaver syndrome). *Zentralbl. Veterinärmed., A*, 1990, **37**, 729-736.
51. EMBURY D.H., JERRETT I.V. Mannosidosis in Galloway calves. *Vet. Pathol.*, 1985, **22**, 548-551.
52. ENJALABERT F., NICOT M.C., BAYROUTHE C., MONCOULON R. Ketone bodies in milk and blood of dairy cows: relationship between concentrations and utilization for detection of subclinical ketosis. *J. Dairy Sci.*, 2000, **84**, 583-589.
53. ERDOGAN H.M., CETINKAYA B., GREEN L.E., CRIPPS P.J., MORGAN K.L. Prevalence, incidence, signs and treatment of clinical listeriosis in dairy cattle in England. *Vet. Rec.*, 2001, **149**, 289-293.
54. FATZER R., STECK F. Histologische differentialdiagnose bei tollwurverdächtigen rindem. *Schweizer Arch. Tierheilkd.*, 1974, **116**, 347-356.
55. FATZER R., FANKHAUSER R. Beiträge zur Neuropathologie der Wiederkäuer. II. Neoplasmen. *Schweizer Arch. Tierheilkd.*, 1977, **119**, 67-78.
56. FATZER R., VANDEVELDE M., GOTTSTEIN B. Cerebral taeniid oncospherical lesions in two BSE suspects. *Vet. Rec.*, 2002, **150**, 46-47.

57. FERROUILLET C., FECTEAU G., LANEVSCHI A. Prélèvement et analyse du liquide céphalo-rachidien chez les bovins. *Point vét.*, 1998, **194**, 15-20.
58. FERROUILLET C., FECTEAU G., HIGGINS R., LANEVSCHI A. Analyse du liquide céphalo-rachidien pour le diagnostic des atteintes du système nerveux des bovins. *Point vét.*, 1998, **194**, 21-26.
59. FOLEY G.L., ZACHARY J.F. Rabies-induced spongiform change and encephalitis in a heifer. *Vet. Pathol.*, 1995, **32**, 309-311.
60. FOSTER J.D., PARNHAM D., CHONG A., GOLDMANN W., HUNTER N. Clinical signs, histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats. *Vet. Rec.*, 2001, **148**, 165-171.
61. FOURICHON C., BEAUDEAU F., BAREILLE N., SEEGER H. Incidence of health disorders in dairy farming systems in western France. *Livest. Prod. Sci.*, 2001, **68**, 157-170.
62. FRASER C.M., BERGERON J.A., MAYS A., AIELLO S.E. (édit.). Système nerveux. *In Manuel vétérinaire Merck*, 1<sup>e</sup> éd. Éditions d'Après, Paris, 1996, 486-541.
63. GEORGE L.W. Localization and differentiation of neurologic diseases. *In Large animal internal medicine*, 2<sup>e</sup> éd. Mosby-Year Book, Saint-Louis, 1996, 142-170.
64. GEORGE L.W. Diseases of the nervous system. *In Large animal internal medicine*, 2<sup>e</sup> éd. Mosby-Year Book, Saint-Louis, 1996, 1001-1176.
65. GERWECK G. Ein Beitrag zur Krankheitsstatistik in der Rinderpraxis. *Tierärztl. Umsch.*, 1993, **48**, 95-97.
66. GOFF J.P., HORST R.L. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.*, 1997, **80**, 1260-1268.
67. GOUELLO L. Analyse épidémiologique du premier cas d'encéphalopathie spongiforme bovine en France. *Épidémiol. Santé anim.*, 1991, **19**, 63-70.
68. GOURREAU J.-M. Le botulisme. *In Maladies des bovins* (Institut de l'élevage, dir.). France Agricole, Paris, 2000, 80-81.
69. GOURREAU J.-M. Les affections néoplasiques. *In Maladies des bovins* (Institut de l'élevage, dir.). France Agricole, Paris, 2000, 396-401.

70. HAFFAR Z. L'écornage des bovins. *In* Maladies des bovins (Institut de l'élevage, dir.). France Agricole, Paris, 2000, 480-481.
71. HAGIWARA K., NAKAYA T., NAKAMURA Y., ASHI S., TAKAHASHI H., ISHIBAR C., IKUTA K. Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells obtained from healthy dairy cattle. *Med. Microbiol. Immunol.*, 1996, **185**, 145-151.
72. HARPER P.A., WALKER K.H., HEALY P.J., HARTLEY W.J., GIBSON A.J., SMITH J.S. Neurovisceral ceroid-lipofuscinosis in blind Devon cattle. *Acta neuropathol. (Berl.)*, 1988, **75**, 632-636.
73. HEIM D., FATZER R., HORNLIMANN B., VANDEVELDE M. Häufigkeit neurologischer Erkrankungen beim Rind. *Schweizer Arch. Tierheilkd.*, 1997, **139**, 354-362.
74. HEIM D., KIHM U. Bovine spongiform encephalopathy in Switzerland – the past and the present. *In* Gestion des urgences zoosanitaires (G. Murray & P.M. Thornber, édit.). *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 1999, **18** (1), 135-144.
75. HEIM D., DETWILER L., WILLIAMS E., KIHM U. Mise à jour sur l'encéphalopathie spongiforme bovine, la tremblante du mouton et la cachexie chronique. *In* 69<sup>e</sup> Session générale du Comité international de l'Office international des épizooties (OIE), 27 mai-1<sup>er</sup> juin, Paris. Document 69 SG/12/CS3 C, OIE, Paris, 2001, 16 pp.
76. HERDT T.H. Ruminant adaptation to negative energy balance, influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)*, 2000, **16**, 215-230.
77. HILL A.F., DESBRUSLAIS M., JOINER S., SIDLE K.C.L., GOWLAND J., COLLINGE L., DOEY L.J., LANTOS P. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, 1997, **389**, 448-450.
78. HILL F. Neurological diseases of cattle where BSE has been included in the differential diagnosis. *Surveillance*, 1994, **21**, 25.
79. HIRSBRUNNER G., NICOLET J., TONTIS A., MARTIG J. Cerebral listeriosis in cattle: literature review and retrospective analysis of individual cases. *Tierärztl. Praxis*, 1997, **25**, 336-343.
80. HORNER R.F. Suspected ammonium nitrate fertiliser poisoning in cattle. *Vet. Rec.*, 1982, **110**, 472-474.

81. HORZINEK M., KELDERMANS L., STUURMAN T., BLACK J., HERREWEGH A., SILLEKENS P., KOOLEN M. Bovine immunodeficiency virus: immunochemical characterization and serological survey. *J. Gen. Virol.*, 1991, **72**, 2923-2928.
82. JEFFREY M., WILESMITH J.W. Idiopathic brainstem neuronal chromatolysis and hippocampal sclerosis: a novel encephalopathy in clinically suspect cases of bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.*, 1992, **131**, 359-362.
83. JEFFREY M., SIMMONS M.M., WELLS G.A.H. Observations on the differential diagnosis of bovine spongiform encephalopathy in Britain. *In* Transmissible spongiform encephalopathies. Proceedings of a consultation on BSE with the Scientific Veterinary Committee of the Commission of the European Communities, 14-15 septembre 1993 (R. Bradley & B. Marchant, édit.). Commission européenne, Bruxelles, 1994, 347-358.
84. JOHNSTONE A.C. Hepatic encephalopathy and bovine spongiform encephalopathy. *Surveillance*, 1993, **20**, 28.
85. KIMBERLIN R.H. Encéphalopathie spongiforme bovine. *In* Encéphalopathies spongiformes transmissibles des animaux (R. Bradley & D. Matthews, édit.). *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 1992, **11** (2), 391-439.
86. KIRKWOOD J.K., CUNNINGHAM A.A. Epidemiological observations on spongiform encephalopathies in captive wild animals in the British Isles. *Vet. Rec.*, 1994, **135**, 296-303.
87. KIUPEL H., WEHR J. Zum Vorkommen der sporadischen bovinen Enzephalomyelitis (SBE) im Norden der DDR. *Wiss. Zeitschr. Humboldt Univ. Berlin, Math. nat. R.*, 1980, **29**, 57-59.
88. KOPCHA M. Nutritional and metabolic diseases involving the nervous system. *Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)*, 1987, **3**, 119-135.
89. KRONFELD D.S. Les troubles métaboliques. *In* Médecine et chirurgie des bovins. Vigot Frères, Paris, 1974, 387-454. [Traduction de « Bovine medicine and surgery ».]
90. LE BARS J., LE BARS P. Recent acute and subacute mycotoxicoses recognized in France. *Vet. Res.*, 1996, **27**, 383-394.
91. LEIPOLD H.W., DENNIS S.M. Congenital defects of the bovine central nervous system. *Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)*, 1987, **3**, 159-177.

92. LEUPOLD U., MARTIG J., VANDEVELDE M. Diagnostic aspects of neurological diseases of cattle. A retrospective study. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, 1989, **131**, 327-340.
93. LIEGEOIS F. Traité de pathologie médicale des animaux domestiques. Duculot, Gembloux, 1933, 725 pp.
94. LOPEZ T.A., CAMPERO C.M., CHAYER R., DE HOYOS M. Ergotism and photosensitization in swine produced by the combined ingestion of *Claviceps purpurea sclerotia* and *Ammi majus* seeds. *J. vet. diagn. Invest.*, 1997, **9**, 68-71.
95. LORGUE G., LECHENET J., RIVIERE A. Précis de toxicologie clinique vétérinaire. Point Vétérinaire, Maisons-Alfort, 1987, 208 pp.
96. LUDWIG H., BODE L. Borna disease virus: new aspects on infection, disease, diagnosis and epidemiology. In Le point sur les zoonoses (P.-P. Pastoret, édit.). *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2000, **19** (1), 259-288.
97. MCCOY M.A., YOUNG P.B., EDGAR H.W., MCCARVILLE E.M., DAVISON G., FITZPATRICK D.A., KENNEDY D.G. Biochemical changes induced by hypomagnesemia in lactating cows and ewes. *Vet. Rec.*, 2002, **150**, 176-181.
98. MCELROY M.C., WEAVERS E.D. Clinical presentation of bovine spongiform encephalopathy in Republic of Ireland. *Vet. Rec.*, 2001, **149**, 747-748.
99. MCGILL I.S., WELLS G.A. Neuropathological findings in cattle with clinically suspect but histologically unconfirmed bovine spongiform encephalopathy (BSE). *J. comp. Pathol.*, 1993, **108**, 241-260.
100. MANTECA C., DAUBE G., JAUNIAUX T., LIMBOURG B., KAECKENBEECK A., MAINIL J.G. Étude de l'entérotoxémie bovine en Belgique. II. Épizootiologie élémentaire et pathologie descriptive. *Ann. Méd. vét.*, 2000, **145**, 75-82.
101. MARTENS H., SCHWEIGEL M. Pathophysiology of grass tetany and other hypomagnesemias. *Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)*, 2000, **16**, 339-368.
102. MATTHIAS D. Der Nachweis von latent infizierten Pferden, Schafen und Rindern und deren Bedeutung als Virusreservoir bei der Bornaschen Krankheit. *Arch. experim. Vet. Med.*, 1954, **8**, 506-511.

103. MAYHEW I.G. Evaluation of the large animal neurologic patient. *In* Large animal neurology. A handbook for veterinary clinicians. Lea & Febiger, Philadelphie, Londres, 1989, 3-69.
104. MEYER G., D'OFFAY J., THIRY E. Les encéphalites à herpèsvirus bovins. *Point vét.*, 2000, **31**, 417-424.
105. MILLEMANN Y., REMY D., BRUGERE-PICOUX J. La listériose des ruminants. 1 : Étiologie, pathogénie et épidémiologie. *Point. Vét.*, 2000, **31**, 313-316.
106. MORGAN S.E., EDWARDS W.C. Bovine bonkers: new terminology for an old problem. A review of toxicity problems associated with ammoniated feeds. *Vet. hum. Toxicol.*, 1986, **28**, 16-18.
107. MORIGNAT E., DUCROT C., ROY P., BARON T., VINARD J.-L., BIACABE A.-G., MADEC J.-Y., BENCSIK A., DEBEER S., ELIAZSEWICZ M., CALAVAS D. Targeted surveillance to assess the prevalence of BSE in high-risk populations in western France and the associated risk factors. *Vet. Rec.*, 2002, **151**, 73-77.
108. MOYNAGH J., SCHIMMEL H. Tests for BSE evaluated. Bovine spongiform encephalopathy. *Nature*, 1999, **400**, 105.
109. MSOLLA P., SEMUGURUKA W.D., KASUBU A.A., SHOO M.K. Clinical observations on bovine parasitic otitis in Tanzania. *Trop. anim. Hlth Prod.*, 1993, **25**, 15-18.
110. OKAMOTO M., FURUOKA H., HAGIWARA K., KAMITANI W., KIRISAWA R., IKUTA K., TANIYAMA H. Borna disease in a heifer in Japan. *Vet. Rec.*, 2002, **150**, 16-18.
111. OLIVER J.E., LORENZ M.D., KORNEGAY J.N. Handbook of veterinary neurology, 3<sup>e</sup> éd. W.B. Saunders, Philadelphie, 1997, 463 pp.
112. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE (OMS). Rabies surveillance report. Center for Rabies Surveillance and Research. *Rabies Bull. Eur.*, 2001, **3**, 4-8.
113. OYSTER R., LEIPOLD H.W., TROYER D., CASH W., JOHNSON D. Histochemical and morphometric studies of peripheral muscle in bovine progressive degenerative myeloencephalopathy of brown Swiss cattle. *Zentralbl. Veterinärmed., A*, 1992, **39**, 321-327.

114. PASTORET P.-P., BROCHIER B., VANDEPUTTE J., CHAPPUIS G., DESMETTRE P., LOMBARD M., LARDY C. In Memoriam: Charles Mérieux. Une vie dans la continuité de Pasteur. *Ann. Méd. vét.*, 2001, **145**, 59.
115. PASTORET P.-P., GOUFFAUX M., SAEGERMAN C., ROELS S., DECHAMPS P., THIRY E., VANOPDENBOSCH E. Le diagnostic immunologique rapide des encéphalopathies spongiformes transmissibles. *Ann. Méd. vét.*, 2001, **145**, 164-173.
116. PERDOK H.B., LENG R.A. Hyperexcitability in cattle fed ammoniated roughages. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 1987, **17**, 121-143.
117. PLUMLEE K.H., GALEY F.D. Neurotoxic mycotoxins: a review of fungal toxins that cause neurological disease in large animals. *J. vet. internal Med.*, 1994, **8**, 49-54.
118. POLACK B., SCHWARTZ I., BERTHELEMY M., BELLOC C., MANET G., VUILLAUME A., BARON T., GONDA M.A., LEVY D. Serologic evidence for bovine immunodeficiency virus infection in France. *Vet. Microbiol.*, 1996, **48**, 165-173.
119. POWER E.P., O'CONNOR M., DONNELLY W.J., DOLAN C.E. Aujeszky's disease in a cow. *Vet. Rec.*, 1990, **126**, 226.
120. PRANTER M.M., SOSALLA M.J. Delayed organophosphate neurotoxicosis in four heifers. *J. Am. vet. med. Assoc.*, 1993, **203**, 1453-1455.
121. RICE D.A., MCMURRAY C.H., DAVIDSON J.F. Ketosis in dairy cows caused by low levels of lincomycin in concentrate feed. *Vet. Rec.*, 1983, **113**, 495.
122. ROELS S., CHARLIER G., LETELLIER G., LEYER G., SCHNYNTS F., KERKHOFS P., THIRY E., VANOPDENBOSCH E. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. *Vet. Rec.*, 2000, **146**, 586-588.
123. ROSENBERGER G. Système nerveux central. In Examen clinique des bovins. Point Vétérinaire, Maisons-Alfort, 1976, 460-469.
124. SAEGERMAN C., CLAES L., VANOPDENBOSCH E., BIRONT P., DELUYKER H., THIRY E. Étude rétrospective de l'incidence des troubles neurologiques rapportés et suspects d'encéphalopathie spongiforme transmissible chez les bovins en Belgique. *Épidémiol. Santé anim.*, 1999, **35**, 31-42.
125. SAEGERMAN C., DECHAMPS P., VANOPDENBOSCH E., ROELS S., PETROFF K., DUFÉY J., VAN CAENEGHEM G., DEVREESE D., VAREWYCK H., DE CRAEMERE H.,



- DESMEDT I., CORMANN A., TORCK G., HALLET L., HAMERIJCKX M., LEEMANS M., VANDERSANDEN A., PEHARPRE D., BROCHIER B., COSTY F., MULLER P., THIRY E., PASTORET P.-P. Épidémiosurveillance de l'encéphalopathie spongiforme bovine en Belgique : bilan de l'année 1998. *Ann. Méd. vét.*, 1999, **143**, 423-436.
126. SAEGERMAN C., DECHAMPS P., ROELS S., PETROFF K., GEEROMS R., TORCK G., DUFEY J., FOUREZ R., HAMELRYCKX M., CORMANN A., VIATOUR P., DE CONNINCK V., LOMBA F., VERMEERSCH J.-P., HALLET L., LHOST O., LEEMANS M., VANDERSANDEN A., PEHARPRE D., BROCHIER B., COSTY F., PASTORET P.-P., THIRY E., VANOPDENBOSH E. Épidémiosurveillance de l'encéphalopathie spongiforme bovine en Belgique : bilan de l'année 1999. *Ann. Méd. vét.*, 2001, **145**, 47-58.
127. SCHELCHER F., FOUCRAS G., MEYER G., ANDREOLETTI O., VALARCHER J.-F. Le coryza gangréneux chez les bovins. *Point vét.*, 2001, **215**, 30-35.
128. SCHELCHER F., ANDREOLETTI O., CABANIE P., TABOURET G. Démarche diagnostique dans les maladies nerveuses des bovins. *In* Actualités en buiatrie. Journées européennes, Société française de buiatrie (SFB), 28-30 novembre, Paris. SFB, Toulouse, 2001, 229-240.
129. SCHILLHORN VAN VEEN T.W. Parasitic disease of the bovine nervous system. *Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)*, 1987, **3**, 99-105.
130. SCHLECH W.F. Listeriosis epidemiology, virulence and the significance of contaminated foodstuffs. *J. Hosp. Infect.*, 1991, **19**, 211-224.
131. SCHREUDER B.E., OSTERHAUS A.D. Bovine spongiform encephalopathy (BSE), a review. *Tijdschr. Diergeneesk.*, 1990, **115**, 507-517.
132. SCOBIE L., VENABLES C., SAYERS A.R., WEIGHTMAN S., JARRETT O. Prevalence of bovine immunodeficiency virus infection in cattle in Great Britain. *Vet. Rec.*, 2001, **149**, 459-460.
133. SHERMAN D.M. The role of clinical examination in the accurate diagnosis of bovine neurologic disease. *Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)*, 1987, **3**, 1-12.
134. SHERMAN D.M. Localized diseases of the bovine brain and spinal cord. *Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)*, 1987, **3**, 179-191.

135. SNIDER T.G., HOYT P.G., JENNY B.F., COATS K.S., LUTHER D.G., STORTS R.W., BATTLES J.K., GONDA M.A. Natural and experimental bovine immunodeficiency virus infection in cattle. *Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)*, 1997, **13**, 151-176.
136. STÖBER M. Symptomatologie différentielle de quelques affections du système nerveux des bovins. *Ann. Méd. vét.*, 1987, **131**, 401-410.
137. STOWE C.M. Central nervous system intoxications other than lead. *Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)*, 1997, **13**, 149-158.
138. TENHUMBERG H., TRELA T., MATZKE P., AVERDUNK G., DIRKSEN G. Bovine progressive degenerative myeloencephalopathy ('Weaver syndrome') in Brown Swiss × Braunvieh cattle: reproductive features and embryo transfer. *Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr.*, 1994, **107**, 400-404.
139. THIRY E. Maladies virales des ruminants. Point Vétérinaire, Maisons-Alfort, 2000, 244 pp.
140. TSUJI M., TERADA Y., ARAI S., OKADA H., ISHIHARA C. Use of the Bo-RBC-SCID mouse model for isolation of a *Babesia* parasite from grazing calves in Japan. *Experim. Parasitol.*, 1995, **81**, 512-518.
141. TVEDTEN H.W. Clinical pathology of bovine neurologic disease. *Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)*, 1987, **3**, 25-44.
142. UNDERWOOD W.J. Rumen lactic acidosis. Part II. Clinical signs, diagnosis, treatment and prevention. *Compend. cont. Educ. pract. Vet.*, 1992, **14**, 1265-1270.
143. VALDES J.J., CAMERON J.E., COLE R.J. Aflatoxin: a tremorgenic mycotoxin with acute neurotoxic effects. *Environ. Health Perspect.*, 1985, **62**, 459-463.
144. VALLET A. Les autres maladies infectieuses provoquant des troubles nerveux. *In Maladies des bovins* (Institut de l'élevage, dir.). France Agricole, Paris, 2000, 84-85.
145. VALLET A. La myopathie dyspnée. *In Maladies des bovins* (Institut de l'élevage, dir.). France Agricole, Paris, 2000, 234-235.
146. VALLET A. La nécrose du cortex cérébral. *In Maladies des bovins* (Institut de l'élevage, dir.). France Agricole, Paris, 2000, 236-237.

147. VAN CAUTEREN H., VANDENBERGHE J., HERIN V., VANPARYS P. , MARSBOOM R. Toxicological properties of closantel. *Drug. chem. Toxicol.*, 1985, **8**, 101-123.
148. VANCUTSEM P.M., BABISH J.G., SCHWARK W.S. The fluoroquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. *Cornell Vet.*, 1990, **80**, 173-186.
149. VANDEVELDE M., ZURBRIGGEN A., FATZER R. Spongiform encephalopathies with special reference to bovine spongiform encephalopathy. *Schweizer. Med. Wochenschr.*, 1992, **122**, 887-892.
150. VANOPDENBOSCH E., DECHAMPS P., SAEGERMAN C., DUFÉY J., ROELS ST., MULLIER P., HALLET L., BROCHIER B., COSTY F., CHARLIER G., FOUREZ R., PASTORET P.-P. Le premier cas d'encéphalopathie spongiforme bovine diagnostiqué en Belgique. *Ann. Méd. vét.*, 1998, **142**, 111-118.
151. VOROS K., TANYI J., KARSAI F. Clinical experiences with rabies in cattle in Hungary. *Dtsch. tierärztl. Wochenschr.*, 1999, **106**, 46-48.
152. WALDER R., KALVATCHEV Z., TOBIN G.J., BARRIOS M.N., GARZARO D.J., GONDA M.A. Possible role of bovine immunodeficiency virus in bovine paraplegic syndrome: evidence from immunochemical, virological and seroprevalence studies. *Res. Virol.*, 1995, **146**, 313-323.
153. WELLS G.A.H., SCOTT A.C., JOHNSON C.T., GUNNING R.H., HANDOCK R.D., JEFFREY M., DAWSON M., BRADEY R. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.*, 1987, **121**, 419-420.
154. WELLS G.A.H., SAYERS A.R., WILESMITH J.W. Clinical and epidemiological correlates of the neurohistology of cases of histologically unconfirmed, clinically suspect bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.*, 1995, **136**, 211-216.
155. WHITE M.E. Consultant. A diagnostic support system for veterinary medicine. Cornell College of Veterinary Medicine. <http://www.vet.cornell.edu/consultant/consult.asp>, consulté le 13 décembre 2002.
156. WILESMITH J.W. Manual on bovine spongiform encephalopathy. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome, 1998, 51 pp.
157. WILESMITH J.W., WELLS G.A., CRANWELL M.P., RYAN J.B. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet. Rec.*, 1988, **123**, 638-644.

158. WILL R.G., IRONSIDE J.W., ZEIDLER M., COUSENS S.N., ESTIBEIRO K., ALPEROVITCH A., POSER S., POCCHIARI M., HOFMAN A., SMITH P.G. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*, 1996, **347**, 921-925.
159. WILSON B.J., BYERLY C.S., BURKA L.T. Neurologic disease of fungal origin in three herds of cattle. *J. Am. vet. med. Assoc.*, 1981, **179**, 480-481.
160. WITTMANN G. Aujeszky's disease in ruminants. *In Herpesvirus disease of cattle, horses and pigs* (G. Wittmann, édit.). Developments in Veterinary Virology, Kluwer Academic Publishers, Boston, 1989, 163-175.
161. YAMADA M., NABAGAWA M., YAMAMOTO M., FURUOKA H., MATSUI T., TANIYAMA H. Histopathological and immunohistochemical studies of intracranial nervous-system tumours in four cattle. *J. comp. Pathol.*, 1998, **119**, 75-82.
162. ZEIDLER M., IRONSIDE J.W. (The new variant of Creutzfeldt-Jakob disease. *In Le point sur les zoonoses* (P.-P. Pastoret, édit.). *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2000, **19** (1), 98-120.
163. Zwich W. & Witte J. Zur Frage der Schutzimpfung und der Inkubationsfrist bei der Bornaschen Krankheit. *Arch. Tierheilkd.*, 1932, **64**, 116-124.

## **Chapitre 2**

### **Objectifs du travail**

## 1. Objectif général

En comparaison avec d'autres pays européens, le secteur agricole belge est particulièrement axé sur l'exportation. Dans ce contexte, il est de la plus haute importance de « veiller à la sécurité de la chaîne alimentaire et à la qualité de nos aliments, afin de protéger la santé des hommes, des animaux et des plantes ». L'amélioration de la détection et de la surveillance des événements rares et l'évaluation de l'impact sur la santé que peuvent représenter ceux-ci sont deux éléments clefs qui permettront de fixer les axes d'actions à accomplir en vue de limiter l'émergence ou la ré-émergence de maladies ou de troubles de la santé.

Un événement est qualifié de rare lorsque sa prévalence est inférieure à 1% (Toma et al., 2001). L'événement rare peut se manifester selon plusieurs états. Il peut soit « émerger », « persister » ou « disparaître ». L'approche des événements rares est encore actuellement exploratoire et constitue les défis de demain. L'objectif général de ce travail est de proposer un canevas commun d'épidémiosurveillance des événements rares chez les bovins en Belgique.

## 2. Objectifs spécifiques

### 2.1. Emergence d'un événement rare

L'émergence d'un événement rare sera traitée en prenant l'exemple de l'encéphalopathie spongiforme bovine. Le but sera d'améliorer la détection clinique de l'ESB. Pour atteindre ce but, différents objectifs seront poursuivis : (i) l'établissement d'une classification des troubles à expression nerveuse dans l'espèce bovine en Europe occidentale constituera un pré-requis indispensable du diagnostic différentiel de l'ESB (Article 1) ; (ii) la mise en œuvre d'une enquête rétrospective d'incidence de l'ESB permettra, d'une part, de vérifier les conditions de l'émergence de l'ESB et, d'autre part, d'informer, de sensibiliser, et de former les vétérinaires sentinelles (Article 2) ; (iii) l'épidémiosurveillance des premiers cas cliniques d'ESB permettra d'identifier des tendances et des paramètres d'intérêt clinique (Saegerman et al., 1999 ; 2001) et (iv) le développement d'un outil d'aide à la décision clinique de l'ESB, indépendant de la prévalence de la maladie et indépendant de la taille de l'échantillon étudié, constituera l'aboutissement des phases précédentes (Article 3).

---

## 2.2. Persistance d'un événement rare

La persistance d'un événement rare sera traitée en prenant l'exemple d'une contamination environnementale du cheptel bovin par des dibenzodioxines polychlorées (PCDDs ; polychlorinated-dibenzo-*p*-dioxins), des dibenzofuranes polychlorés (PCDFs ; polychlorinated dibenzofurans) et des biphényles polychlorés (PCBs ; polychlorinated biphenyls). Le but sera d'estimer l'exposition potentielle du consommateur à ce type de contaminants. Pour atteindre ce but, différents objectifs seront poursuivis : (i) l'amélioration de programmes de détection des contaminations par les PCBs/dioxines, au sein du cheptel bovin belge, non soumis au risque alimentaire de la crise de 1999 ; (ii) l'estimation de l'exposition potentielle d'un consommateur aux dioxines, dans deux scénarii extrêmes, provenant de l'alimentation à base de produits de viande et de produits laitiers (Article 4).

## 2.3. Disparition d'un événement rare

La disparition d'un événement rare sera traitée en prenant l'exemple de l'éradication de la brucellose bovine couplée à l'apparition des réactions sérologiques faussement positives (RSFP). Le but sera le développement et la validation d'outils de diagnostic en vue de la certification et du maintien de l'absence de brucellose bovine en Belgique dans un contexte d'apparition de RSFP. Pour atteindre ce but, différents objectifs seront poursuivis dans le cadre de la détection de la brucellose bovine que l'infection soit aiguë, chronique ou latente : (i) le développement et l'évaluation de l'apport de tests ELISA indirects, hautement sensibles (Article 5) et (ii) la mise au point des conditions d'utilisation et l'évaluation des performances du test cutané (hypersensibilité de type 4), hautement spécifique (Article 6).

## 2.4. Identification d'un indicateur du stade épidémiologique d'un événement rare

Le choix d'un indicateur robuste du stade épidémiologique d'un événement rare sera traité en prenant l'exemple de l'ESB (Article 7).

## **Chapitre 3**

### **Etude de l'émergence d'un événement rare**

#### **L'émergence de l'encéphalopathie spongiforme bovine en Belgique**



*« Absence of evidence is not the same as evidence of absence »*

*Abigail Salyers*

## Préambule

Différents aspects permettant d'améliorer la détection de l'encéphalopathie spongiforme bovine sont présentés dans ce chapitre sous forme de deux contributions scientifiques originales : (i) une étude épidémiologique rétrospective des troubles à expression nerveuse chez les ruminants avant la première déclaration de l'encéphalopathie spongiforme bovine en Belgique (il s'agit d'une première étude d'incidence des troubles à expression nerveuse réalisée à l'échelle d'une population) (article 3) ; et (ii) une étude concernant le développement d'un outil générique d'aide à la décision clinique d'une maladie en prenant l'exemple de l'ESB (article 4). Cette deuxième étude n'aurait pas pu être menée à son terme sans tenir compte des résultats de deux études épidémiologiques descriptives concernant les premiers cas d'ESB en Belgique. Face à un événement rare, la description détaillée et standardisée des premiers cas observés est déterminante en raison du fait qu'elle permet, notamment, d'identifier des tendances et des paramètres ayant un intérêt clinique (Saegerman *et al.*, 1999 ; 2001).

## **Article 2**

**Etude rétrospective à l'échelle de la population des troubles d'expression nerveuse chez les ruminants avant le début de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) en Belgique, un pays de catégorie III en ce qui concerne le risque géographique de l'ESB**

## Résumé

Une étude rétrospective des troubles d'expression nerveuse (TEN) chez les ruminants a été réalisée avant le début de l'encéphalopathie spongiforme bovine en Belgique ( $n = 7875$ ). Les archives de tous les laboratoires vétérinaires et des réseaux d'épidémiosurveillance de la rage et des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) ont été consultées. Dans toutes les espèces, un nombre significativement plus élevé de causes virologiques (rage) a été signalé au sud du sillon Sambre et Meuse. Durant la période 1992-97 : (i) le taux d'incidence annuel prédit des TEN variait significativement en fonction des espèces et des régions (plus élevé dans les régions où la rage est présente), mais il était toujours au-dessus de 100 cas par million, (ii) le taux d'incidence moyen prédit des cas suspects d'EST et, parmi ceux-ci, ceux investigués par examen histopathologique variait significativement en fonction des espèces et de la région. La valeur prédictive positive du diagnostic clinique présomptif des TEN était comprise entre 13 et 63 % en fonction des espèces. La connaissance de la valeur prédictive positive permet de définir un point de référence avant d'entreprendre certaines actions (par exemple, des campagnes de sensibilisation et de formation). L'utilité de l'examen nécropsique systématique ou de tests complémentaires de laboratoire pour établir un diagnostic étiologique a aussi été montrée. L'analyse d'un petit échantillonnage historique et ciblé ( $n = 48$ ) a permis la confirmation d'un cas et la découverte de deux autres cas de tremblante. Les résultats de la présente étude aident au développement et au maintien de la qualité des réseaux mondiaux d'épidémiosurveillance clinique des EST, particulièrement dans les pays qui, par le passé, ont importé des animaux vivants, des produits animaux et des aliments pour animaux de pays ayant enregistré des cas d'EST.

## **Population-level retrospective study of neurologically expressed disorders in ruminants before the onset of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in Belgium, a geographic BSE risk III country**

Saegerman C.<sup>1</sup>, Berkvens D.<sup>2</sup>, Claes L.<sup>3</sup>, Dewaele A.<sup>4</sup>, Coignoul F.<sup>4</sup>, Ducatelle R.<sup>5</sup>, Cassart D.<sup>4</sup>, Brochier B.<sup>6</sup>, Costy F.<sup>7</sup>, Roels S.<sup>8</sup>, Deluyker H.<sup>9</sup>, Vanopdenbosch E.<sup>8</sup>, Thiry E.<sup>10</sup>

1. Federal Agency for the Safety of the Food Chain, Administration of Control Policy, Secretariat of the Scientific Committee, World Trade Center III, avenue Simon Bolivar 30, B-1000 Brussels, Belgium
2. Prince Leopold Institute of Tropical Medicine, Department of Animal Health, Nationalestraat 155, B-2000 Antwerpen, Belgium,
3. Dierengezondheidszorg Vlaanderen, Kruisstraat 24, B-3061 Leefdaal, Belgium,
4. Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Boulevard de Colonster, 20, B43, B-4000 Liège, Belgium,
5. Vakgroep Pathologie, Bacteriologie en Pluimveeziekten, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Ghent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, Belgium
6. Department of Microbiology, Section of Virology, Scientific Institute of Public Health, rue Juliette Wytsman 14, B-1050 Brussels, Belgium
7. Institut Pasteur, Rabies Service, rue Engeland 642, B-1180 Brussels, Belgium
8. Veterinary and Agrochemical Research Center (CODA/CERVA), National Reference Laboratory for Veterinary TSE, Groeselenberg 99, B-1180 Brussels, Belgium
9. Vakgroep Verloskunde, Voortplanting en Bedrijfsdiergeneeskunde, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Ghent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, Belgium
10. Department of Infectious and Parasitic Diseases, Virology, Epidemiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Boulevard de Colonster, 20, B43b, B-4000 Liège, Belgium

***Journal of Clinical Microbiology*, soumis pour publication en juin 2004.**

## Abstract

A retrospective epidemiological study ( $n = 7,875$ ) on neurologically expressed disorders (NED) in ruminants was carried out in Belgium before the onset of the bovine spongiform encephalopathy epidemic. The archives of all veterinary laboratories and rabies and transmissible spongiform encephalopathies (TSE) epidemiosurveillance networks were consulted. In all species, a significantly higher number of virological causes (rabies) were reported south of the Sambre-Meuse Valley. During the period 1992-97: (i) the predicted annual incidence rate of NED varied significantly in function of species and area (higher numbers in areas where rabies is present), but it was always above 100 cases per million, (ii) the mean incidence rate of TSE suspected cases and, among them, those investigated by histopathological examination varied significantly in function of species and area. The positive predictive value of presumptive clinical diagnosis of NED ranged from 0.13 to 0.63 depending on the species. Knowledge of the positive predictive value permits the definition of a reference point before undertaking certain actions (e.g. awareness and training campaigns). It also shows the usefulness of a systematic necropsy examination or complementary laboratory tests to establish an etiological diagnosis. TSE analysis of a small, targeted historical sampling ( $n = 48$ ) permitted the confirmation of one case and uncovered two other cases of scrapie. The results of the present study help to develop and maintain the quality of the worldwide clinical epidemiological networks for TSE, especially in countries that in the past imported live animals, animal products and feedstuffs from countries with TSE cases.

## 1. Introduction

In affected ruminants, transmissible spongiform encephalopathies (TSE) cause neurological signs that can be classified into three categories: disturbances in behaviour, sensitivity and locomotion. In addition, some general clinical signs are also observed [6, 10, 41, 71, 78, 80]. The course of the disease is progressive and always fatal. The lesions are restricted to the central nervous system, although the pathogenesis of infection implies a primary replication step of TSE agents in the lymphoid organs followed by a neuro-invasive phase [29, 42, 64, 68].

Scrapie occurs in sheep, goats [46] and moufflons [80]. Scrapie in sheep has been an endemic disease for over 250 years [20, 46]. Scrapie affects adult animals, with a peak age-at-onset of 2 to 3 years [10, 17]. Not a single clinical case of scrapie was diagnosed in animal younger than six months [49]. The first description of the natural disease in goats dates back to 1942 [14]. Subsequently only a few cases of scrapie have been reported in this species [10, 20]. In France, a clinically suspected case of scrapie was described in a cow in 1883 but no brain-block was conserved [54]. This case is still an enigma. Currently, the etiology of scrapie is considered an infectious disease with a maternal and horizontal contagious transmission, where host genetic factors play a central role [3, 21, 62]. Chronic wasting disease (CWD) has emerged as an important wildlife disease in North America since the 1970s [79] and, over the last 5 years, the known distribution has expanded to free-ranging cervids and to game-farming industries [77]. CWD is horizontally transmitted and environmental contamination may play an important role in local maintenance of the disease [78]. Bovine spongiform encephalopathy (BSE) was first recognized and defined as a pathological entity in the United Kingdom (UK) in November 1986 [70]. Initial epidemiological investigations and examination of archived brains indicate that the first clinical cases occurred around April 1985 [41]. The disease affects adult animals, with a peak age-at-onset of 4 to 5 years [4, 27, 32, 71]. The age range of clinical, confirmed cases is very wide (between 20 months and almost 20 years) [18] although BSE is rarely confirmed in animals younger than 30 months [51]. The specific origin is not clear but the marker of the disease is the prion protein PrP<sup>Sc</sup> (PrPscrapie); its form resistant to heat or protease treatment is named PrP<sup>res</sup> [47]. In the late 1970s, a reduction in the use of hydrocarbon solvents in the production of meat and bone meal coincided with the accepted start of exposure of the cattle population in Great Britain [4, 5, 72, 73, 74]. The first BSE confirmed cases were born at the time of this change [19]. Most BSE cases resulted from the recycling within the cattle population of infected cattle tissues via meat and bone meal [71, 74]. The duration of clinical signs is on average 1 to 2 months, but it can be less than 2 weeks [41, 45, 53, 75] or as long as 1 year [41]. Currently BSE can only be confirmed post-mortem by

pathological examination of brain tissue. The histological changes are typical: microscopic lesions in the central nervous system consist of bilaterally symmetrical, non-inflammatory vacuolization of neuronal perikarya and grey matter neuropil [71]. The new variant of Creutzfeldt-Jakob disease was identified in UK first in 1996 [76]. Subsequently, several investigations have indicated a possible link with BSE [7, 34, 60].

Before the onset of BSE during the second half of the 1980s, there were no specific surveillance programs for TSE in ruminants in most countries. In Belgium notification of rabies is compulsory since 1967 and ruminant TSE since 1990. The first scrapie case in Belgium was recognized in 1963, i.e. before compulsory notification. It appeared in a Suffolk ram, which was imported from UK [37]. The first BSE case was diagnosed in October 1997 (Vanopdenbosch *et al.*, 1998). No case of CWD was ever reported in Europe.

In the literature little information was available on the definition of reported neurologically expressed disorder (NED) and those that were suspected of TSE. Almost no information on the incidence of NED in wild ruminants was found. In the United States of America (USA), the National Animal Health Monitoring System (NAHMS) has registered an incidence of 4,000 per million sheep above one year, that were culled or died in 1995 with “behavioural faults” [12]. For cattle some information is available but comparison of the different studies is not feasible. According to Heim *et al.* [33], neurological pathologies have a preferential distribution in bovines under one year of age (29.3%) and in those aged four to five years (18.9%). The network “Vigilance, ALerte, INtervention et Évaluation” (VIALINE) in Haute Normandie (France) mentions a total mortality rate of 5.1% in 1993 and 13.5% of these animals were over two years old. Of these, 8% had neurological diseases [25]. When combining these figures, a mortality rate of neurological diseases of 550 per million cattle over two years is obtained. Between 1992 and 1999, an annual average of 90 clinically suspected BSE cases per million cattle over two years were reported to the veterinary authorities in Switzerland (passive surveillance), of which 43% were confirmed [22]. In the USA in 1995, NAHMS recorded a mortality rate of 1000 per million dairy cow due to “lack of coordination or severe depression” and in 1996, a morbidity rate in beef herds of 1000 per million breeding females with “neurological problems” [11, 13]. In beef herds, this rate, expressed as affected bovines per thousand, doubles when the herd size is below 100 head, and is nil when it is over 300 [11]. Finally, a limited retrospective study is available in New Zealand, based on histopathological diagnoses made in 28 cattle suspected of BSE [35].

The information on ruminant neurological cases is very scarce. It is however extremely important to get epidemiological estimates of them because most of the neurological disorders enter into the differential diagnosis of TSE in ruminants.



The present study had three goals: firstly is to determine the annual incidence of NED in Belgium, a country classified as level III for the geographical BSE risk, secondly to determine whether TSE were present in a country before the first report, and thirdly, once it had been detected, to monitor the evolution of incidence in space and time.

The present epidemiological retrospective study constitutes the first validation, at a population level, of the Office International des Epizooties (OIE) requirements, which are based on expert opinion [81].

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Population at risk**

The inclusion criteria depended on the species: cattle older than twelve months, small ruminants older than six months and game of all age. Ruminant population size data in Belgium were extracted from the annual registration for the period 1980-1997 (available from the National Institute of Statistics), more specifically called the 15 May census.

### **2.2. Evolution in time**

The present study started on 1 January 1980 and ended on 31 December 1997 (year of the first indigenous BSE case in Belgium). The starting date was selected on the basis of the trade of live animals, animal products and meat-and-bone-meal from UK, where BSE occurs, to other European countries [38, 55, 56, 67] and countries outside Europe [30, 31] and on the basis of an average BSE incubation time of four to five years [71].

### **2.3. Spatial distribution**

Belgium is free of rabies since July 2001 [83]. Rabies was enzootic during the period under investigation. Belgium can be divided in three regions according to rabies prevalence. One region, the Sambre-Meuse Valley (SMV), forms a natural border that separates the two others: the area north of SMV where rabies is absent and the area south of SMV where rabies is present. The data from SMV itself are of limited importance and are not presented here.

### **2.4. Definitions**

For the purpose of this study, reported neurologically expressed disorder (NED) case is defined as a case for which either nervous clinical signs were reported to the veterinary laboratory, or for which a diagnosis of neurological disorder was made at autopsy or through another laboratory test, or for which, in the absence of the above information, analyses were performed on the central nervous system. A reported NED suspected of TSE is defined as a reported NED for which TSE could not be excluded (could not be explained by any other cause) or a reported NED, whatever the nature, for which the survival time is seven days or more or in case of less than seven days survival if the animal was euthanised. To meet the objectives of the present study, this definition was deliberately made broader than the definition of suspected cases proposed by the European Parliament and Council [2] or by the OIE [81, 82]. The annual

incidence rate is the ratio of the number of reported NED cases and those suspected of TSE to the population at risk.

## **2.5. Database**

The rabies and TSE epidemiosurveillance networks as well the veterinary diagnostic network report NED. In the first two networks game of all ages, all cattle over 20 months of age and all small ruminants over twelve months, suspected of rabies but tested negative, are examined for TSE since 1990. The veterinary diagnostic network consists of the provincial veterinary laboratories, the National Reference Laboratory for Veterinary TSE (CODA/CERVA) and the Veterinary Medicine Faculties at the Universities of Liège and Ghent.

A database with detailed information about all these cases was established. It contained the following information: laboratory, reference number, date of entry, locality of origin, race, sex, age, clinical signs, results of laboratory tests and/or autopsy, date of result and indication of whether biological material was forwarded to other laboratories (in order to avoid double entries). Archives were searched starting 1 January 1980. The archives were complete for the period 1992 to 1997. An exhaustive list of NED per species was constructed, with the goal to standardise the data independent of the source [51].

## **2.6. Pathological examination**

### **2.6.1. Targeted samples**

Brain blocks were produced by the TSE networks from 1990 and were available respectively since 1980 in the Department of Pathology of the Faculty of Veterinary Medicine of University of Liège (UL), and since 1990 in the Department of Pathology of the Faculty of Veterinary Medicine of University of Ghent (UG). Respectively 30 animals at UL and 18 animals at UG were analysed. The samples were taken between 1983 and 1997 and came from 17 bovines (one less than 24 months old and 16 over 24 months old), 24 sheep (two below 12 months of age and 22 over 12 months) and 7 goats (one below 12 months old and 6 over 12 months old).

### **2.6.2. Histology**

For histological examination, all tissues were fixed in 4% phosphate-buffered formalin, routinely processed, paraffin wax-embedded, and sectioned at 5 µm. Sections were stained with haematoxylin and eosin stains.

### 2.6.3. Immuno-histochemistry

All immuno-histochemical staining was carried out on 5 µm de-waxed sections. Rehydrated sections were placed in a bath of 98% or 100% formic acid at room temperature (RT) for 30 minutes. After rinsing with demineralized water they were sterilized at 125°C during 30 minutes. Endogenous peroxidase was inactivated by covering the sections with a bath of 0.3% hydrogen peroxide in methanol for 30 minutes at RT. Incubations with primary antibodies were performed at room temperature for one hour. The antibody used was R524-7/IDDLOMH-AA7 (ID-Lelystad, The Netherlands), a polyclonal rabbit anti-PrP-peptide serum diluted 1/1500. As secondary antibody, biotinylated goat anti-rabbit (EO432, DAKO, Denmark) was applied for 10 minutes at RT followed by a five minute incubation in peroxidase-conjugated streptavidin (PO397, DAKO, Denmark), both diluted 1/500 at RT. 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, St Louis, MO) was used as chromogen in the presence of hydrogen peroxide. Sections were counter stained with haematoxylin (Gill 3, Prosan N.V., Belgium) during 30 seconds, mounted with DPX-Mountant (BDH Laboratories Supplies, England) and covered with a cover glass. The immuno-histochemistry has been performed in Belgium since 1996.

### 2.6.4. Transmission electron microscopy

For examination of the fibers associated with TSE (scrapie-associated fibers [SAF]), the fresh brain stem material was dissected and discarded, 1g aliquots were homogenised in 10% (w/v) N-lauroylsarcosine and processed according to the Hilmert and Diringier technique [36]. After proteinase K digestion, the final pellet was resuspended in 50µl distilled water and negatively stained for EM as described by Scott *et al.* [61]. Examinations were carried out with a Philips EM 208S transmission electron microscope at a 22000x magnification.

## 2.7. Statistical analysis

The statistical analyses were carried in STATA/SE 8 [63]. Unless otherwise indicated, negative binomial regression was used for analysis of the annual incidence rates of reported NED, suspected rabies cases and TSE suspected cases, considering three independent variables for the first two rates (species, originating area and year) and four for the TSE suspected cases (species, originating area, year and number of suspected rabies cases). The cattle population south of SMV was taken as reference population. The modified formula of Cannon and Roe was used to estimate the number of brains to be examined in order to detect BSE, if present in at least 1% of the NED, with a 99% probability [9, 24, 43], as recommended by the OIE [81]:

$$n = \left[ 1 - (1 - a)^{\frac{1}{p}} \right] \cdot \left[ N - \frac{(D-1)}{2} \right]$$

where  $n$  is the sample size needed to detect one or more BSE affected animals in the sample;  $a$  is the confidence level of observing at least one affected animal in sample (in our case CL = 99%);  $D$  the number of TSE affected animals in a population with the selected minimum annual incidence;  $N$  the parent population size.

## 3. Results

### 3.1. Etiological classification of the reported neurologically expressed disorders

The number of reported NED in Belgium between 1980 and 1997 was respectively 5,261 cases in cattle, 1642 cases in sheep, 528 cases in goats and 446 cases in game. Table 1 shown the distribution by type of etiology according to Saegerman *et al.* [51]. Laboratory diagnosis was not always performed because of the cost of investigation. Eighty percent or more of the cases (depending on species) were included on the basis of a laboratory diagnosis, 7 to 19% (depending on species) were based on necropsy diagnosis and five percent or less (depending on species) were based on clinical diagnosis. In all species, the biological cause group is the most common during the period studied. In cattle, a virological cause is most frequently encountered followed by a bacteriological one. This order is reversed in the other species, especially so in goats and game. A parasitological cause is rarely put in evidence. Non-biological causes, i.e. metabolic and nutritional causes, were more frequently found in cattle, sheep and goats. A chemical cause is most commonly recorded in game. A unconventional transmissible agent was demonstrated in sheep (nine cases of scrapie), goats (one case of scrapie) and cattle (one case of BSE). Except for cattle (chi-square = 5.51; df = 2; p = 0.064), the proportions of cause groups were significantly different between the areas north and south of SMV (chi-square = 78; df = 2; p < 0.001). A significantly different proportion of etiological causes were found north and south of SMV in cattle (chi-square = 1111; df = 7; p < 0.001), in sheep (chi-square = 739; df = 7; p < 0.001), in goats (chi-square = 155; df = 6; p < 0.001) and in game (chi-square = 193; df = 3; p < 0.001). A significantly higher number of virological causes (rabies) were reported south of SMV (Fisher's exact p < 0.003). No etiological cause was found in respectively 41.5% (cattle), 39% (sheep), 40.5% (goats) and 77% of the cases (game).

**Table 1. Estimation of the most frequently reported neurologically expressed disorders <sup>a</sup> by species of ruminants in Belgium 1980 to 1997**

		Cattle <sup>b</sup>	Game <sup>c</sup>	Sheep <sup>d</sup>	Goats <sup>d</sup>		
Number of reported cases		5,261	446	1642	528		
Reported cases with determination of cause <sup>e</sup>		3,080	104	1005	314		
<b>Biological causes</b>	Parasitological	<i>Cenurosis</i>		2			
		<i>Coccidiosis</i>	2	5	4		
		<i>Oestrosis</i>		3			
	Bacteriological	<i>Abscess at the base of the brain</i>	18		5		
		<i>Botulism</i>	20				
		<i>Enterotoxemia</i>	225	53	332	95	
		<i>H. somnus</i>	27				
		<i>Keratitis</i>	1		1		
		<i>Listeriosis</i>	67	1	66	46	
		<i>Otitis</i>				2	
		<i>Purulent meningo-encephalitis</i>	55	2	30	12	
		<i>Sinusitis</i>	3		2		
		<i>Tetanus</i>	17		4	3	
		Virological	<i>Aujeszky</i>	45		9	
	<i>Bovine enzootic leukemia</i>		4		1	1	
	<i>Bovine viral diarrhea</i>		1				
	<i>Caprine arthritis encephalitis virus</i>					4	
	<i>Malignant Catarrhal Fever</i>		1				
	<i>Maedi visna</i>				2	1	
	<i>Rabies</i>		1088	22	305	21	
	<i>Bovine spongiform encephalopathy</i>		1				
	Unconventional transmissible agent			9	1		
	Unspecified biological causes	98	8	50	47		
	<b>Non biological causes</b>	Mechanical causes	<i>Cerebral or cerebellar tumor</i>	7		1	
			<i>Compression of the medulla</i>	10	2	5	2
			<i>Foreign body</i>	5			
			<i>Fracture</i>	4	1	3	
<i>Intra-cranial bleeding</i>					7		
Physical causes		<i>Post-partum paraplegia</i>	3				
		<i>Post-partum paresis or paralysis</i>	6		3	1	
		<i>Electrocution - Lightning</i>	7				
		Chemical causes	<i>Belladonna</i>		1		
			<i>Copper poisoning</i>			2	
<i>Cyanogenetic plants</i>			4		6	8	
<i>Ergot</i>				1			
<i>Glyphosate</i>					1		
<i>Lead</i>			44	1	5	2	
<i>Nitrates</i>			77		1	1	
<i>Organochlorates</i>			3			1	
<i>Organophosphates - carbamates</i>			3				
<i>Poisoning by ripe fruit</i>					1	2	
<i>Rhododendron - azalea</i>					2	4	
<i>Strychnin</i>				1			
Metabolic and nutritional causes		<i>Taxus bacata</i>	90	1	17	11	
		<i>Acute ruminal acidosis</i>	10	2	9	10	
		<i>Acetonemia</i>	31		5		
		<i>Cerebrocortical necrosis</i>	3	1	3	5	
		<i>Hepatic encephalosis</i>	5		5		
		<i>Milk fever</i>	848		3		
		<i>Photosensitization</i>			1		
	<i>Pregnancy toxemia</i>		1	73	18		
	<i>Tetany</i>	161		1			
	<i>Uremia</i>	36		3	1		
Genetic causes	1						
Immunological causes	2						
Unspecified non biological causes	46	3	25	11			

<sup>a</sup> inclusion criteria used: (i) first laboratory diagnosis, (ii) second necropsy diagnosis and (iii) third clinical diagnosis; <sup>b</sup> older than 12 months ; <sup>c</sup> all ages ; <sup>d</sup> older than 6 months ; <sup>e</sup> according to Saegerman *et al.* [51].

## 3.2. Predicted annual incidence rate

### 3.2.1. Predicted annual incidence rate of reported NED

Table 2 shows the predicted incidence rate for reported NED (PIR-NED) for the period 1992-1997. No difference could be demonstrated between different years and the final model only included the variables 'species' and 'area of origin'. PIR-NED in cattle is significantly higher south of SMV and PIR-NED is significantly higher in sheep and goats than in cattle. Game has a higher PIR-NED than cattle in the area north of SMV. South of the divide the situation is reversed.

**Table 2. Predicted mean incidence rate of reported neurologically expressed disorders in Belgium during the period 1992-1997 ( $\times 10^{-5}$ )**

Species	north <sup>a</sup>	south <sup>a</sup>
cattle <sup>b</sup>	10	40
game <sup>c</sup>	70	20
goat <sup>d</sup>	390	500
sheep <sup>d</sup>	70	160

<sup>a</sup> North and South of Sambre-Meuse Valley; <sup>b</sup> animals older than 12 months; <sup>c</sup> animals of all ages; <sup>d</sup> animals older than 6 months.

### 3.2.2. Predicted annual incidence rate of transmissible spongiform encephalopathy suspected cases

The predicted annual incidence rates of suspected transmissible spongiform encephalopathy cases (PIR-TSE) are given in Table 3. PIR-TSE is lower north of the SMV, irrespective of the species. This difference is constant in time. PIR-TSE is lowest in cattle and game, followed by sheep and is significantly higher in goats. There is a negative trend in time in all species, except for cattle where there is a significant increase. PIR-TSE is furthermore positively correlated to the predicted annual incidence rate of suspected rabies cases (PIR-rabies), again in all species. The PIR-rabies for the period 1992-1997 is shown in Table 4. The following trends were observed: there was no significant effect of time, except for cattle where there was a significant increase in number of suspected rabies cases over time in both north and south of SMV; PIR-rabies is always higher south of the SMV, irrespective of species; PIR-rabies is higher in sheep and goats compared to cattle and game, which have similar rates.



**Table 3. Predicted mean incidence rate of reported neurologically expressed disorders suspected of transmissible spongiform encephalopathy ( $\times 10^{-5}$ ) in Belgium during the period between 1992-1997<sup>a</sup>**

Region <sup>b</sup>	Species	1992	1993	1994	1995	1996	1997
north	cattle <sup>c</sup>	2.7	2.7	2.8	3.0	3.2	3.7
	game <sup>d</sup>	na	5.1	4.6	4.2	4.0	4.0
	goat <sup>e</sup>	117.4	92.3	73.0	58.5	49.0	43.4
	sheep <sup>e</sup>	20.9	19.1	17.6	16.4	15.9	16.4
south	cattle <sup>c</sup>	11.5	10.2	11.9	18.9	13.3	12.6
	game <sup>d</sup>	na	19.1	19.4	26.6	16.3	13.4
	goat <sup>e</sup>	507.5	343.0	308.2	373.4	201.9	146.6
	sheep <sup>e</sup>	90.4	71.0	74.1	104.4	65.6	55.3

<sup>a</sup> the definition of suspected TSE cases was deliberately made large (see text); <sup>b</sup> north and south of the Sambre-Meuse Valley; <sup>c</sup> animals older than 12 months; <sup>d</sup> animals of all ages; <sup>e</sup> animals older than 6 months; na = not available

**Table 4. Predicted mean incidence rate of suspected rabies cases in Belgium during the period 1992-1997 ( $\times 10^{-5}$ )**

Region <sup>a</sup>	Species	1992	1993	1994	1995	1996	1997
north	cattle <sup>b</sup>	0.1	0.2	0.2	0.3	0.5	0.7
	game <sup>c</sup>	na	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
	goat <sup>d</sup>	5.7	4.9	4.2	3.6	3.1	2.7
	sheep <sup>d</sup>	2.5	2.1	1.7	1.4	1.2	1.0
south	cattle <sup>b</sup>	6.5	9.1	12.7	17.8	25.0	35.1
	game <sup>c</sup>	na	16.9	16.3	15.6	15.1	14.5
	goat <sup>d</sup>	290.8	249.8	214.6	184.4	158.5	136.1
	sheep <sup>d</sup>	129.7	107.2	88.6	73.2	60.5	50.0

<sup>a</sup> north and south of the Sambre-Meuse Valley; <sup>b</sup> animals older than 12 months; <sup>c</sup> animals of all ages; <sup>d</sup> animals older than 6 months; na = not available

### 3.2.3. Incidence rate of suspected and histologically examined transmissible spongiform encephalopathy cases

Table 5 presents the observed annual incidence rate of histologically examined transmissible spongiform encephalopathy cases (IR-TSEHE). The statistical analysis revealed that significantly more records were obtained for goats, both north and south of SMV. Except for cattle, the incidence decreased significantly over time in all species and there was a correlation between IR-TSEHE and PIR-NED, also in both regions, although the relationship was stronger in the north.

**Table 5. Mean incidence rate of reported neurologically expressed disorders suspected of transmissible spongiform encephalopathy and with complete histological examination ( $\times 10^{-5}$ ) in Belgium during the period between 1992-1997**

Region <sup>a</sup>	Species	1992	1993	1994	1995	1996	1997
north	cattle <sup>b</sup>	2.3	2.5	2.6	2.8	3.0	3.4
	game <sup>c</sup>	na	6.0	5.6	5.3	4.8	4.4
	goat <sup>d</sup>	127.1	106.3	87.2	68.8	57.3	46.0
	sheep <sup>d</sup>	22.7	22.3	20.8	19.5	18.6	17.5
south	cattle <sup>b</sup>	9.9	12.3	17.0	16.3	13.7	13.4
	game <sup>c</sup>	na	21.6	19.9	18.5	17.0	15.5
	goat <sup>d</sup>	451.7	360.5	292.2	241.2	194.7	159.3
	sheep <sup>d</sup>	79.7	72.5	69.5	71.4	63.1	57.8

<sup>a</sup> north and south of the SMV; <sup>b</sup> animals older than 12 months; <sup>c</sup> animals of all ages; <sup>d</sup> animals older than 6 months; na = not available

### 3.3. Positive predictive value of presumptive clinical diagnosis

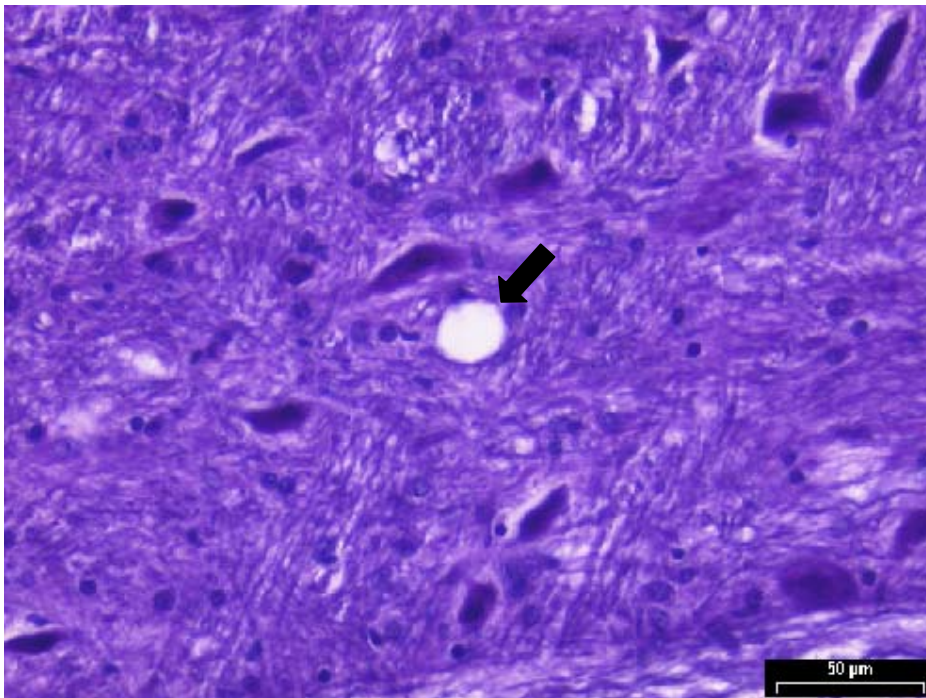
The level of agreement between presumptive clinical diagnosis (actually made or written in the anamnesis) and the necropsy findings was calculated for the Faculties of Veterinary Medicine of UL and UG for respectively 224 cattle older than 12 months, 112 sheep and 49 goats older than 6 months and 8 game of all ages. The obtained positive predictive values of presumptive clinical diagnosis versus necropsy were as follows: 0.50 for cattle (95% C.I.: 0.43 – 0.56), 0.63 for sheep (95% C.I.: 0.53 – 0.71), 0.49 for goats (95% C.I.: 0.34 – 0.64) and 0.13 for game (95% C.I.: 0.003 – 0.53).

### 3.4. Pathological examination on targeted samples

On the basis of the present study, a supplementary targeting of the available brain blocks of TSE suspected cases (e.g. presence of suspected clinical signs or/and presence of vacuoles in reports) was carried out.

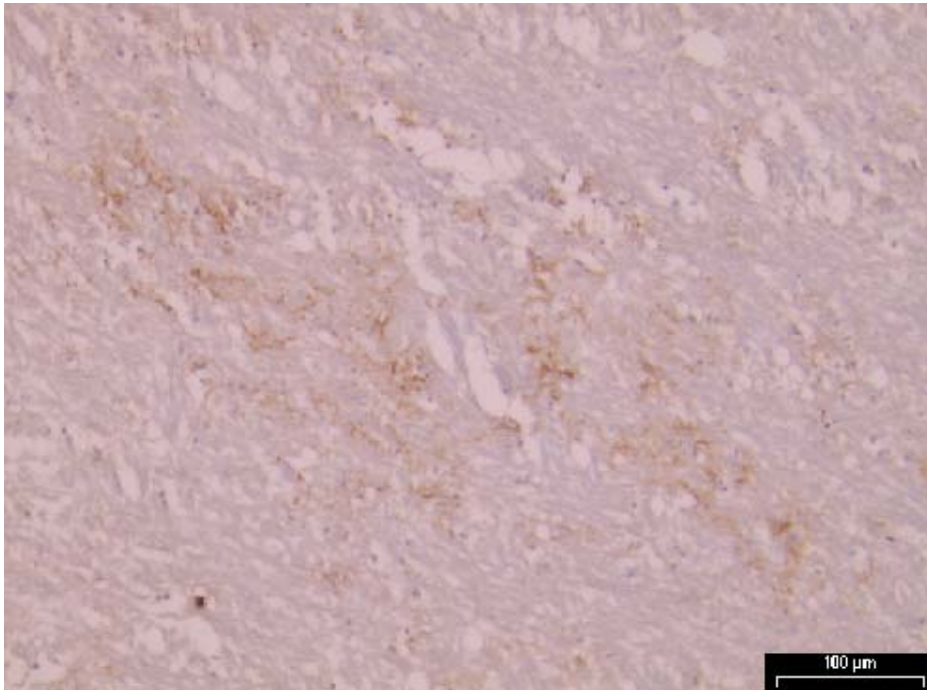
Among the samples examined by immuno-histochemistry and histopathology, three were positive for TSE. A first brain block from a sheep that was presented at UL in March 1983 was confirmed as a case of scrapie. For this, the immuno-histochemistry confirmed the original histopathological diagnosis (Fig. 1). A second brain block from the TSE network was classified negative for scrapie in November 1992, because the result of the histopathology was not conclusive and the SAF result was negative. Also for this sample, the result of immuno-histochemistry was positive (Fig. 2). This sample originated from a five-year-old sheep imported from UK. The third brain block from the UG was histologically diagnosed as scrapie in August 1992 in a three-year-old goat, but not confirmed by immuno-histochemistry in our study (Fig. 3). All other tested samples remained negative.

Figure 1. Histopathological examination <sup>a</sup> of scrapie case in sheep (year 1983)



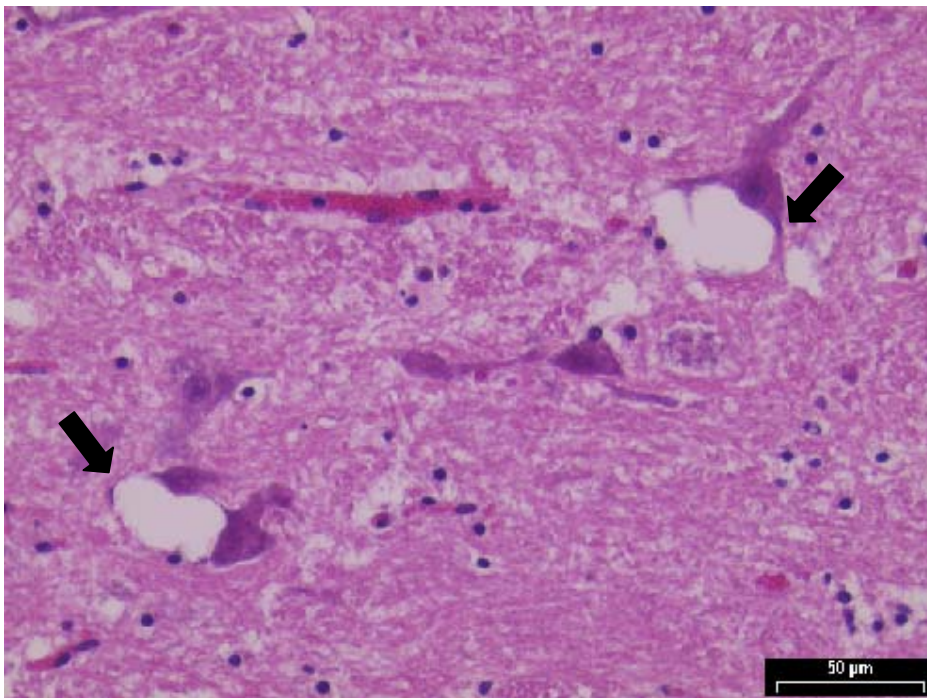
<sup>a</sup> Haematoxylin-eosin staining of brainstem: neuron with pathognomonic cytoplasmic vacuolisation.

**Figure 2. Histochemical examination <sup>a</sup> of scrapie case in sheep (year 1992)**



<sup>a</sup> Immuno-histochemical staining of brainstem with multiple sites of brownish positive staining from five-year old Hampshire ewe.

**Figure 3. Histopathological examination <sup>a</sup> of scrapie case in goat (year 1992)**



<sup>a</sup> Haematoxylin-eosin staining of brainstem from three-year old goat: neuron with pathognomonic multiple cytoplasmic vacuolisation.

## **4. Discussion**

The present study had three goals: (i) to determine the annual incidence of NED, (ii) to determine whether TSE were present in a country before the first report, (iii) once it had been detected, to monitor the evolution of incidence in space and time. Our study permitted: (i) to identify the strengths and the weaknesses of the organization of the network, (ii) to choose the appropriate awareness and training campaigns of the actors of the epidemiological network and (iii) to devise appropriate measures, implement them and monitor their effectiveness. The geographical TSE risk assessment [57, 58, 59] and TSE risk mapping would permit to define the countries and areas where TSE emerge plus the animal groups at risk [1, 23, 30, 65]. A targeted passive and active surveillance might be performed in these geographical areas and animal groups at risk.

### **4.1. Etiological classification of the reported neurologically expressed disorders**

Even though the laboratory archives were incomplete before 1992, all laboratories processed a sufficient number of samples to make them representative of the bovine population in their vicinity. Moreover, the same types of causes were found in every region before and after 1992. It is therefore assumed that the percentages of the morbidity causes calculated for every area during the period 1992-1997 were indeed representative for the population at risk. The fairly high percentage of cases for which no etiological cause could be established (around 40% for domestic ruminants to 77% of the reported NED for game) is in line with previous observations elsewhere: a similar percentage (39%) was found in a Swiss study of cattle with nervous signs and suspected of rabies [26]. It could partly be due to a metabolic or toxicological pathologies, producing no lesions [44]. Improving examination techniques and acquiring more experience could probably reduce this percentage by half [33].

During the period of this study, SMV plays a pivotal role in the distribution of causes of NED in Belgium essentially due to the rabies prevalence in south. Differences in causes between countries were already noted before [39, 40, 50, 69]. The knowledge about the distribution of NED causes and their associated risk factors should be improved because the development of decision support tools is based on them [e.g. 15, 16, 50].

### **4.2. Predicted annual incidence rate of NED and TSE suspected cases**

The annual incidence rate of NED and TSE suspected cases is higher south of SMV than north and PIR-TSE is correlated with the annual incidence rate of suspected rabies. Thus, the main

hypothesis to explain this observation is that south of SMV, where rabies is prevalent, farmers and veterinarians are historically more aware [53]. Moreover, PIR-NED is underestimated because many NED are not reported if cause and/or therapy are known. In addition, the incidence of suspected and histologically examined TSE cases is directly correlated with the PIR-NED. Any measure resulting in an increase in NED reporting has a non-specific knock-on effect on reporting of suspected and histologically examined TSE cases. Progressive increases in numbers reported through the specific TSE network were noted towards the end of the study period, particularly in cattle (data not shown). Overall, PIR-NED is higher and there are more suspected TSE cases in small ruminants. Several hypotheses can be forwarded for this observation. In Belgium, a considerable number of livestock holders have a few small ruminants and research into the cause of morbidity is more frequent with hobby farmers because animals are considered as pets. The “true” number of registered small ruminants has increased in Europe following the episode of food-and-mouth disease in Great Britain [28]. Even when taking this into account, the rate in small ruminants remains higher. In USA, the NAHMS network has registered an incidence rate of NED around fourfold higher in sheep than in cattle.

According to the OIE requirement, based on expert opinion, cattle are considered affected by NED in all countries with an annual incidence rate of 100 cases per million animals, irrespective of their BSE status [81, 82]. The present retrospective study gives the first external validation at the population level of this requirement. As no clinical sign is pathognomonic for BSE [51, 82], the laboratory examination of brains is essential for an efficient BSE epidemiological network. OIE [81] calculates the minimum number of samples to be examined in order to have a probability of 99% to detect at least one case, if the disease is present in one percent of the cattle with NED. According to this OIE requirement and the number of BSE suspected cases with complete histopathological examination, the power of the epidemiosurveillance effort for the period 1992-1997 was on average 59%, 28% and 33%, respectively for the area south of SMV, the area north of SMV and Belgium as a whole. If all BSE suspected cases were analysed (definition deliberately broader than the definition of suspected cases proposed by the OIE or the European Commission [2, 82]), the power respectively become 99%, 28% and 52%. This suggests the necessity to organize awareness and training campaigns to improve presumptive BSE clinical sign detection for all actors of the epidemiosurveillance network, especially in countries that imported live animals, animals products and feedstuffs in the past from countries where TSE occurs. This is in particular addressed in the methodology for the Geographical BSE Risk assessment (GBR), developed by the Scientific Steering Committee of the European Commission to classify countries following their BSE risk. The GBR is a qualitative indicator of the likelihood of the presence of one or more cattle being infected with BSE, pre-clinically or clinically, at a given point in time, in a country. Where its presence is

confirmed, the GBR gives an indication of the level of infection. The assessment of the GBR is based on the assumption that BSE arose in the United Kingdom and was propagated through the recycling of bovine tissues into animal feed. Later the export of infected animals and infected feed provided the means for the spread of the BSE-agent to other countries where it was again recycled and propagated via the feed chain [57, 58, 59]. Thus, in Belgium, with the onset of the BSE epidemic and one information campaign, the power of the BSE epidemiosurveillance network increased to 99% (Belgium and area south part of SMV) and to around 70% (north of SMV) in 1998 and 1999 [52, 53]. Outside sources of funding are necessary to cover research in etiological diagnosis in order to widen our knowledge of neurological pathologies [51].

The mean number of histologically investigated cases of NED during the period 1992-1997 (51 per million and 30 per million cattle respectively south and north of SMV) compares well with 10 per million in France [8] and 90 per million animals in Switzerland during the same period [22].

### **4.3. Positive predictive value of presumptive clinical diagnosis**

The determination of the positive predictive value of presumptive clinical diagnostic permits us to obtain a reference point before undertaking actions (e.g. awareness and training campaigns). In fact it offers the possibility to follow up and evaluate these actions continuously. It also shows the added benefits to systematically revert to necropsy examinations or complementary tests to establish an etiological diagnosis and above all to lift the uncertainty over the identification of suspected TSE cases [51, 82]. The main purpose of a clinical TSE epidemiosurveillance network is to attain as high as possible a sensitivity (in order to identify every BSE case). This has to be encouraged by permanent awareness and training campaigns for the veterinarians, farmers and other actors so that a higher number of nervous cases are reported and analysed [2, 81].

### **4.4. Pathological examination of targeted samples**

The present study confirms that the neuronal vacuolization can occasionally be observed in cattle in the absence of BSE [4]. The additional importance of immuno-histochemical staining in the control of TSE in ruminants is also proved. In fact, the immuno-histochemical staining revealed one extra TSE case and confirmed one TSE suspected case. The negative histopathological examination is possibly an indication that it concerned a clinical case with faint signs. However, due to the lack of tonsillar tissue, confirmation could not be established [48]. The absence of SAFs in the electron microscopy can be explained by the difficulty this technique encounters at such a large magnification. Our experience has shown that electron microscopy is sometimes difficult, especially when the PrP<sup>res</sup> concentration is low and/or the

sample is already putrefied or contaminated with bacterial infections. In those cases the few SAFs that might be present tend to accumulate in sites of debris and bacterial accumulation, which masks their presence and results in a false negative examination. Additionally, the samples that were used to perform the immuno-histochemical detection of PrP<sup>res</sup> were sometimes not appropriate (i.a. topography of brainstem material not available, delay before staining). The fact that no BSE case was detected before October 1997 may be due to the low sample size.

The present retrospective study constitutes the first validation, at population level, of the OIE requirements. The predicted mean incidence rate of NED in a GBR level III country is sufficiently high to detect BSE confirmed cases only when under condition that minimal number of samples has been examined. The results of the present study help to develop and maintain the quality of the clinical epidemiological TSE networks world-wide, especially in countries that imported live animals, animal products and feedstuffs in the past from countries where TSE occurs.

Finally, our study also revealed the two main limiting factors that hamper this type of study: (i) standardization of the definitions and list of NED and (ii) archiving of data and brain-blocks over time. The use of an identification registration system and a laboratory information management system would undoubtedly make it easier to analyze data.



## **5. Acknowledgements**

The authors wish to thank the members of the Belgian TSE Advisory Group for their support. This Group was founded by the Federal Agency for the Safety of the Food Chain in Belgium (FASFC). They also wish to thank all their colleagues from the private and the provincial veterinary investigation centers, the Pasteur Institute, the National Reference Laboratory for Veterinary TSE (CODA/CERVA) and from the Faculties of Veterinary Medicine at the Universities of Liège and Ghent, and also all the veterinarians in practice who have given the necessary information. We particularly thank P. Dechamps (FASFC) to facilitate the access to data. The calculation of the population size was made possible with the then help of Ir R. Hellemans of the Agriculture Economics Centre and different regions of Belgium for the population size of game.

## 6. References

1. ANONYMOUS. European commission, Scientific Steering Committee. Report on « The assessment of the geographical risk of bovine spongiform encephalopathy carried out worldwide by the european commission's scientific steering committee », 2003, 41 pp.
2. ANONYMOUS. European Parliament and Council. Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2001 laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. *Off. J. Eur. Communities*, 2001, **L 147**, 1-40.
3. BELT P.B.G.M., MUILEMAN I.H., SCHREUDER B.E.C., BOS-DE RUIJTER J., GIELKINS A.L.J., SMITS M.A. Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J. Gen. Virol.*, 1995, **76**, 509-517.
4. BRADLEY R. Bovine spongiform encephalopathy (BSE): the current situation and research. *Eur. J. Epidemiol.*, 1991, **7**, 532-544.
5. BRADLEY R., WILESMITH J.W. Epidemiology and control of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Br. Med. Bull.*, 1993, **49**, 932-959.
6. BRAUN U. Clinical signs and diagnosis of BSE. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 2002, **144**, 645-652.
7. BRUCE M.E., WILL R.G., IRONSIDE J.W., MCCONNELL I., DRUMMOND D., SUTTIE A., MCCARDLE L., CHREE A., HOPE J., BIRKETT C., COUSENS S., FRASER H., BOSTOCK C.J. Transmissions to mice indicate that « new variant » CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, 1997, **389**, 498-501.
8. CALAVAS D., DUCROT C. L'ESB en France. Synthèse sur l'évolution de l'épizootie à partir des données disponibles au 1<sup>er</sup> janvier 2003. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 2003, 16 pp.
9. CANNON R.M., ROE R.T. Livestock Disease Surveys: a Field Manual for Veterinarians. Australian Bureau of Animal Health, Canberra, 1982, 34 pp.
10. CAPUCCHIO M.T., GUARDA F., POZZATO N., COPPOLINO S., CARACAPPA S., DI MARCO V. Clinical signs and diagnosis of scrapie in Italy: a comparative study in sheep and goats. *J. Vet. Med.*, 2001, **48**, 23-31.

11. CENTERS FOR EPIDEMIOLOGY AND ANIMAL HEALTH. National Animal Health Monitoring System. Beef'97, United States Department of Agriculture, Fort Collins, 1997, 38 pp.
12. CENTERS FOR EPIDEMIOLOGY AND ANIMAL HEALTH. National Animal Health Monitoring System. Reference of 1996 U.S. sheep health and management practices, United States Department of Agriculture, Fort Collins, 1996a, 26 pp.
13. CENTERS FOR EPIDEMIOLOGY AND ANIMAL HEALTH. National Animal Health Monitoring System. Dairy'96, United States Department of Agriculture, Fort Collins, 1996b, 41 pp.
14. CHELLE P.L. Un cas de tremblante chez une chèvre. *Bull. Acad. Vét. Fr.*, 1942, **15**,294-295.
15. COCKROFT P.D. Clinical sign profile likelihood ratios for bovine spongiform encephalopathy suspects. *Res. Vet. Sci.*, 2000, **68**,285-290.
16. COCKROFT P.D. Pattern-matching models for the differential diagnosis of bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.*, 1999, **144**, 607-610.
17. DEPARTMENT FOR ENVIRONMENT, FOOD AND RURAL AFFAIRS. Age distribution of confirmed scrapie cases (in sheep and goats) from 1998 to 2002. [Online, June 2004a.] [http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/bse-science/scrapie/scrapie\\_age.PDF](http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/bse-science/scrapie/scrapie_age.PDF)
18. DEPARTMENT FOR ENVIRONMENT, FOOD AND RURAL AFFAIRS. Bovine spongiform encephalopathy in Great Britain: youngest and oldest cases by year of onset (passive surveillance only). [Online, June 2004b.] <http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/bse-statistics/bse/yng-old.html>.
19. DEPARTMENT FOR ENVIRONMENT, FOOD AND RURAL AFFAIRS. Bovine spongiform encephalopathy in Great Britain: confirmed cases by year of birth. [Online, June 2004c.] <http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/bse-statistics/bse/ybirth.html>.
20. DETWILER L.A. Scrapie. *Rev. sci. techn. Off. int. Epiz.*, 1992, **11**,491-537.
21. DICKINSON A.G., STAMP P.J.T., RENWICK C.C. Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep. *J. Comp. Pathol.*, 1974, **84**,19-25.
22. DOHERR M.G., HEIM D., FATZER R., COHEN C.H., VANDEVELDE M., ZURBRIGGEN A. Targeted screening of high-risk cattle populations for BSE to augment mandatory reporting of clinical suspects. *Prev. Vet. Med.*, 2001, **51**,3-16.

23. DOHERR M.G., HETT A.R., RÜFENACHT J., ZURBRIGGEN A., HEIM D. Geographical clustering of cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) born in Switzerland after the feed ban. *Vet. Rec.*, 2002, **151**, 467-472.
24. DURAND B., SAVEY M., MOUTOU F. Etude critique de la surveillance de l'encéphalopathie spongiforme bovine dans le monde. *Epidémiol. et santé anim.*, 1998, **34**, 29-39.
25. DURAND F. Le réseau VIALINE. *Epidémiol. et santé anim.*, 1995, **27**, 31-43.
26. FATZER R., F. STECK. Histologische differentialdiagnose bei tollwurverdächtigen rindem. *Schweizer Arch. Tierheilkd.*, 1974, **116**, 347-356.
27. FERGUSSON N.M., DONNELLY C.A., WOOLHOUSE M.E.I., ANDERSON R.M. The epidemiology of BSE in cattle herds in Great Britain. II. Model construction and analysis of transmission dynamics. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.*, 1997, **352**, 803-838.
28. GIBBENS J.C., SHARPE C.E., WILESMITH J.W., MANSLEY L.M., MICHALOPOULOU E., RYAN J.B.M., HUDSON M. Descriptive epidemiology of the 2001 foot-and-mouth disease epidemic in Great Britain: the first five months. *Vet. Rec.*, 2001, **149**, 729-743.
29. HADLOW W.J., KENNEDY R.C., RACE R.E. Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *J. Infect. Dis.*, 1982, **146**, 657-664.
30. HEIM D., KREYSA J. Risk assessment as an indicator for the distribution of BSE in the world. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, 2002, **144**, 710-715.
31. HEIM D., DETWILER L., WILLIAMS E., KIHM U. Mise à jour sur l'encéphalopathie spongiforme bovine, la tremblante du mouton et la cachexie chronique. Office International des Epizooties, 69<sup>ème</sup> session générale, Paris, 27 mai – 1<sup>er</sup> juin 2001, document 69 SG/12/C23 C.
32. HEIM D., KIHM U. Bovine spongiform encephalopathy in Switzerland: the past and the present. In Management of animal health emergencies (G. Murray & P.M. Thornber, eds). *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 1999, **18**, 135-144.
33. HEIM D., FATZER R., HORNLIMANN B., VANDEVELDE M. Häufigkeit neurologischer Erkrankungen beim Rind. *Schweizer Arch. Tierheilkd.*, 1997, **139**, 354-362.
34. HILL A.F., DESBRUSLAIS M., JOINER S., SIDLE K.C.L., GOWLAND J., COLLINGE L., DOEY L.J., LANTOS P. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, 1997, **389**, 448-450.
35. HILL F. Neurological diseases of cattle where BSE has been included in the differential diagnosis. *Surveillance*, 1994, **21**,25.

36. HILMERT H., DIRINGER H. A rapid and efficient method to enrich SAF-protein from scrapie brains of hamsters. *Biosci.Rep.*, 1984, **4**, 165-170.
37. HOORENS J., OYAERT W. Scrapie bij het schaap. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.*, 1966, **35**, 313-317.
38. HORNLIMANN B., GUIDON D., GRIOT C. Risikoeinschätzung für die Einschleppung von BSE. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 1994, **101**, 295-298.
39. JEFFREY M., SIMMONS M.M., WELLS G.A.H. Observations on the differential diagnosis of bovine spongiform encephalopathy in Great Britain, 1993, p. 342-362. In R. Bradley and B. Marchant (ed.), *Transmissible spongiform encephalopathy. Proceedings of a Consultation on BSE with the Scientific Committee of the European Communities*, Brussels, Belgium.
40. JEFFREY M., WILESMITH J.W. Idiopathic brainstem neuronal chromatolysis and hippocampal sclerosis: a novel encephalopathy in clinically suspect cases of bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.*, 1992, **131**, 359-362.
41. KIMBERLIN R.H. Bovine spongiform encephalopathy. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 1992, **11**, 347-390.
42. LASMÉZAS C.I. The transmissible spongiform encephalopathies. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2003, **22**, 23-36.
43. MARTIN S.W., MEEK A.H., WILLEBERG P. *Veterinary Epidemiology. Principles and Methods*. Iowa State University Press, Ames, 1987, 343 pp.
44. MAYHEW I.G. Evaluation of the large animal neurologic patient. In: *Large animal neurology. A handbook for veterinary clinicians*. Lea & Febiger edition, Philadelphia & London, 1989, 3-69.
45. MCELROY M.C., WEAVERS E.D. Clinical presentation of bovine spongiform encephalopathy in the Republic of Ireland. *Vet. Rec.*, 2001, **149**, 747-748.
46. PARRY H.B. Scrapie disease in sheep. In Oppenheimer D.R. (ed.), *Academic Press*, London & New York, 1983, 31-51.
47. PRUSINER S.B. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1998, **95**, 13363-13383.
48. ROELS S., VANOPDENBOSCH E., LANGEVELD J.P. AND SCHREUDER B.E. Immunohistochemical evaluation of tonsillar tissue for preclinical screening of scrapie based on surveillance in Belgium. *Vet. Rec.*, 1999, **145**, 524-525.
49. RUSSO P., DUCROT C., BELLI P., FONTAINE J.-J., PEYROUSE C. Tremblante ovine: bilan de six années d'épidémiosurveillance dans le Sud de la France (étude de 173 cas). *Point Vét.*, 1999, **28**, 667-670.

50. SAEGERMAN C., SPEYBROECK N., ROELS S., VANOPDENBOSCH E., THIRY E., BERKVENS D. Decision support tools for clinical diagnosis of disease in cows with suspected bovine spongiform encephalopathy. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, **42**, 172-178.
51. SAEGERMAN C., CLAES L., DEWAELE A., DESMECHT D., ROLLIN F., HAMOIR J., GUSTIN P., CZAPLICKI G., BUGHIN J., WULLEPIT J., LAUREYNS J., ROELS S., BERKVENS D., VANOPDENBOSCH E., THIRY E. 2003. Differential diagnosis of neurologically expressed disorders in Western European cattle. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2003, **22**, 83-102.
52. SAEGERMAN C., DECHAMPS P., ROELS S., PETROFF K., GEEROMS R., TORCK G., DUFÉY J., FOUREZ R., HAMERIJCKX M., CORMANN A., VIATOUR P., DE CONNICK V., LOMBA F., VERMEERSCH J.-P., HALLET L., LHOST O., LEEMANS M., VANDERSANDEN A., PEHARPRE D., BROCHIER B., COSTY F., PASTORET P.-P., THIRY E., VANOPDENBOSCH E. Epidémiosurveillance de l'encéphalopathie spongiforme transmissible chez les bovins en Belgique : bilan de l'année 1999. *Ann. Med. Vét.*, 2001, **145**, 47-58.
53. SAEGERMAN C., DECHAMPS P., VANOPDENBOSCH E., ROELS S., PETROFF K., DUFÉY J., VAN CAENEGHEM G., DEVREESE D., VAREWYCK H., DE CRAEMERE H., DESMEDT I., CORMANN A., TORCK G., HALLET L., HAMERIJCKX M., LEEMANS M., VANDERSANDEN A., PEHARPRE D., BROCHIER B., COSTY F., MULLIER P., THIRY E., PASTORET P.-P. Epidémiosurveillance de l'encéphalopathie spongiforme transmissible chez les bovins en Belgique : bilan de l'année 1998. *Ann. Med. Vét.*, 1999, **143**, 423-436.
54. SARRADET M. Un cas de tremblante sur un bœuf. *Revue vétérinaire de Toulouse*, 1883, 310-312.
55. SAVEY M., BELLI P., COUDERT M. L'encéphalopathie spongiforme bovine en Europe. Présent et avenir. *Vet. Res.*, 1993, **24**, 213-225.
56. SCHREUDER B.E.C., WILESMITH J.W., RYAN J.B.M., STRAUB O.C. Risk of BSE from the import of cattle from the United Kingdom into countries of the European Union. *Vet. Rec.*, 1997, **141**, 187-190.
57. SCIENTIFIC STEERING COMMITTEE. European Commission. Opinion on the Geographical BSE Risk for sheep and goats (GBR-S): adaptation of the cattle GBR methodology to small ruminants, in case of BSE in small ruminants would become probable or evident under field conditions. Adopted on 7-8 November 2002a, 20 pp.

58. SCIENTIFIC STEERING COMMITTEE. European Commission. Update of the Opinion on the Geographical Risk of Bovine Spongiform Encephalopathy (GBR). Adopted on 11 January 2002b, 10 pp.
59. SCIENTIFIC STEERING COMMITTEE. European Commission. Final Opinion on the Geographical Risk of Bovine Spongiform Encephalopathy (GBR). Adopted on 6 July 2000, 60 pp.
60. SCOTT M.R., WILL R., IRONSIDE J., NGUYEN H.-O.B., TREMBLAY P., DEARMOND S.J. AND PRUSINER S.B. Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1999, **96**, 15137-15142.
61. SCOTT A.C., DONE S.H., VENABLES C., DAWSON M. Detection of scrapie-associated fibrils as an aid to the diagnosis of natural scrapie. *Vet. Rec.*, 1987, **120**, 280-281.
62. SMITHS M.A., BOSSERS A. AND SCHREUDER B.E.C. Prion protein and scrapie susceptibility. *Vet. Quart.*, 1997, **19**, 101-105.
63. STATA CORP. Stata Statistical Software. Release 7.1. College Station, TX: Stata Corporation, 2003.
64. TERRY L.A., MARSCH S., RYDER S.J., HAWKINS S.A.C., WELLS G.A.H., SPENCER Y.I. Detection of disease-specific PrP in the distal ileum of cattle exposed orally to the agent of bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.*, 2003, **152**, 387-392.
65. VANOPDENBOSCH E., ROELS S., SAEGERMAN C. Animal TSE epidemiosurveillance and diagnosis in Belgium and BSE risk assessment. In Proceedings of the First Scientific Day on Transmissible Spongiform Encephalopathies: Creutzfeldt-Jakob Disease and Bovine Spongiform Encephalopathy. 18<sup>th</sup> November 2000, Scientific Institute of Public Health, Brussel, Belgium, 29-30.
66. VANOPDENBOSCH E., DECHAMPS P., SAEGERMAN C., DUFEY J., ROELS S., MULLIER P., HALLET L., BROCHIER B., COSTY F., CHARLIER G., FOUREZ R. AND PASTORET P.-P. Le premier cas d'encéphalopathie spongiforme bovine diagnostiqué en Belgique. *Ann. Méd. Vét.*, 1998, **142**, 111-118.
67. VICARI A., HORNLIMANN B., AUDIGE L. Appréciation du risque de contamination des aliments concentrés suisses pour bovins par l'agent de l'encéphalopathie spongiforme bovine. *Epidémiol. et santé anim.*, 1996, **30**, 77-84.
68. WELLS G.A.H., HAWKINS S.A.C., GREEN R.B., AUSTIN A.R., DEXTER I., SPENCER Y.I., CHAPLIN M.J., STACK M.J., DAWSON M. Preliminary observations on the

- pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. *Vet. Rec.*, 1998, **142**, 103-106.
69. WELLS G.A.H., SAYERS A.R., WILESMITH J.W. Clinical and epidemiological correlates of the neurohistology of cases of histologically unconfirmed, clinically suspect bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.*, 1995, **136**, 211-216.
70. WELLS G.A.H., SCOTT A.C., JOHNSON C.T., GUNNING R.H., HANDOCK R.F., JEFFREY M., DAWSON M., BRADLEY R. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.*, 1987, **121**, 419-420.
71. WILESMITH J.W. Manual on bovine spongiform encephalopathy. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 1998, 51 pp.
72. WILESMITH J.W., RYAN J.B.M., HUESTON W.D. Bovine spongiform encephalopathy: case-control studies of calf feeding practices and meat and bone meal inclusion in proprietary concentrates. *Res. Vet. Sci.*, 1992a, **52**, 325-331.
73. WILESMITH J.W., RYAN J.B.M., HUESTON W.D., HOINVILLE L.J. Bovine spongiform encephalopathy : epidemiological features 1985-1990. *Vet. Rec.*, 1992b, **130**, 90-94.
74. WILESMITH J.W., RYAN J.B.M., ATKINSON M.J. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet. Rec.*, 1991, **128**, 199-203.
75. WILESMITH J.W., WELLS G.A.H., CRANWELL M.P., RYAN J.B.M. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet. Rec.*, 1988, **123**, 638-644.
76. WILL R.G., IRONSIDE J.W., ZEIDLER M., COUSENS S.N., ESTIBEIRO K., ALPEROVITCH A., POSER S., POCCHIARI M., HOFMAN A., SMITH P.G. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*, 1996, **347**, 264-267.
77. WILLIAMS E.S., MILLER M.W. Transmissible spongiform encephalopathies in non-domestic animals: origin, transmission and risk factors. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2003, **22**, 145-156.
78. WILLIAMS E.S., MILLER M.W. Chronic wasting disease in deer and elk in North America. *In Infectious diseases of wildlife: detection, diagnosis and management, Part Two*, (R.G. Bengis, ed.). *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, 2002, **21**, 305-316.
79. WILLIAMS E.S., YOUNG S. Spongiform encephalopathy of rocky mountain elk. *J. Wildl. Dis.*, 1980, **18**, 465-471.
80. WOOD J.N.L., LUND L.J., DONE S.H. The natural occurrence of scrapie in moufflon. *Vet. Rec.*, 1992, **130**, 25-27.



81. WORLD ANIMAL HEALTH ORGANIZATION. International Animal Health Code, 10th edition, Appendix 3.8.4. Surveillance and monitoring systems for bovine spongiform encephalopathy [Online, June 2003.] [http://www.oie.int/eng/normes/mcode/A\\_00157.html](http://www.oie.int/eng/normes/mcode/A_00157.html).
82. WORLD ANIMAL HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for continuous surveillance and monitoring of bovine spongiform encephalopathy. Appendix VIIIb of the January 1997 meeting of the International Animal Health Code Commission, document 65 SG/12/CS 1.
83. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Rabies surveillance report. Center for rabies surveillance and research, *Rabies Bulletin Europe*, 2001, **3**, 4-8.

## **Article 3**

### **Outils d'aide à la décision pour le diagnostic clinique d'une maladie chez des vaches suspectes d'encéphalopathie spongiforme bovine**

## Résumé

La déclaration des bovins cliniquement suspects est actuellement la méthode la plus courante pour détecter des cas d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB). L'amélioration du diagnostic clinique et de l'aide à la décision reste cruciale. Une comparaison des profils cliniques, consistant en 25 signes, a été réalisée entre l'ensemble des 30 cas cliniques d'ESB, confirmés en Belgique avant octobre 2002 et 272 cas suspects qui ont été infirmés sur base d'un examen histologique, un examen immunohistochimique et un examen des fibrilles associées à la tremblante. Un effet saisonnier a été observé dans le rapportage des cas suspects, avec plus de cas rapportés durant la période où les animaux sont maintenus à l'étable. La durée moyenne d'évolution de la maladie était de 30 jours. Les 10 signes les plus pertinents étaient la ruade en salle de traite, l'hypersensibilité au touché et/ou au son, l'aspect farouche de la tête, la réaction de panique, le refus d'aller à la salle de traite ou dans le couloir, le mouvement ou port anormal des oreilles, l'attention augmentée, la chute de la production laitière, le grincement des dents et la modification du tempérament. L'ataxie n'est pas apparue comme étant un signe spécifique de l'ESB. Un arbre de décision (classification and regression trees, CART) a été construit en utilisant les 4 caractéristiques suivantes : l'âge des animaux, l'année de naissance, le nombre de signes pertinents notés et le nombre de signes typiques pour la listériose notés. Le modèle a une sensibilité de 100 % et une spécificité de 85 %. Cette approche permet l'utilisation d'un outil d'aide à la décision, interactif, basé entièrement sur les odds ratios, une statistique indépendante de la prévalence de la maladie.

## **Decision support tools for clinical diagnosis of disease in cows with suspected bovine spongiform encephalopathy**

Saegerman C.<sup>1</sup>, Speybroeck N.<sup>2</sup>, Roels S.<sup>3</sup>, Vanopdenbosch E.<sup>3</sup>, Thiry E.<sup>4</sup>, Berkvens D.<sup>2</sup>,

1. Secretariat of the Scientific Committee, Administration of Control Policy, Federal Agency for the Safety of the Food Chain, World Trade Center III, avenue Simon Bolivar 30, B-1000 Brussels, Belgium
2. Department of Animal Health, Prince Leopold Institute of Tropical Medicine, Nationalestraat 155, B-2000 Antwerpen, Belgium,
3. Section of Pathology, Department of Biocontrol, Veterinary and Agrochemical Research Center, Groeselenberg 99, B-1180 Brussels, Belgium
4. Department of Infectious and Parasitic Diseases, Virology, Epidemiology, and Viral Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Boulevard de Colonster, 20, B43b, B-4000 Liège, Belgium

*Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42, 172-178.

## **Abstract**

Reporting of clinically suspected cattle is currently the most common method for detecting cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE). Improvement of clinical diagnosis and decision-making remains crucial. A comparison of clinical patterns, consisting of 25 signs, was made between all 30 BSE cases, confirmed in Belgium before October 2002, and 272 suspected cases that were subsequently determined to be histologically, immunohistochemically, and scrapie-associated-fiber negative. Seasonality in reporting suspected cases was observed, with more cases being reported during wintertime when animals were kept indoors. The median duration of illness was 30 days. The 10 most relevant signs of BSE were kicking in the milking parlor, hypersensitivity to touch and/or sound, head shyness, panic-stricken response, reluctance to enter in the milking parlor, abnormal ear movement or carriage, increased alertness behavior, reduced milk yield, teeth grinding and temperament change. Ataxia did not appear to be a specific sign of BSE. A classification and regression tree was constructed by using the following four features: age of the animal, year of birth, number of relevant BSE signs noted, and number of clinical signs, typical for listeriosis, noted. The model had a sensitivity of 100% and a specificity of 85%. This approach allows the use of an interactive decision-support tool, based entirely on odds ratios, a statistic independent of disease prevalence.

## 1. Introduction

Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) was first recognized and defined as a pathological entity in the United Kingdom in November 1986 [41]. Initial epidemiological investigations and examination of archived brains indicated that the first clinical cases occurred around April 1985. The disease affects adult animals, with a peak age-at-onset of 4 to 5 years [16, 18, 42]. The age range of clinical, confirmed cases is very wide (between 20 months and almost 20 years) [14], although BSE is rarely confirmed in animals younger than 30 months. The specific origin is not clear, but the marker of the disease is the prion protein PrP<sup>res</sup> [28]. In the late 1970s, a reduction in the use of hydrocarbon solvents in the production of meat-and-bone meal coincided with the accepted start of exposure of the cattle population in Great Britain [2, 3, 44, 45, 46]: the first BSE confirmed cases were born at the time of this change [15]. Most BSE cases are suspected to result from the recycling of infected cattle tissues, via meat-and-bone meal, within the cattle population [43, 46]. The duration of clinical signs is on average 1 to 2 months, but it can be less than 2 weeks [23, 24, 31, 47] and as long as a year [2, 23]. Currently, BSE can only be confirmed postmortem by pathological examination of brain tissue. The histological changes are typical: microscopic lesions in the central nervous system consisting of bilaterally symmetrical, non-inflammatory vacuolization of neuronal perikarya and grey matter neuropil [43]. The new variant of Creutzfeldt-Jakob disease was identified in United Kingdom in 1996 [48]. Subsequently, several investigations have indicated a possible link with BSE [7, 19].

In Europe, clinical studies were performed, either in confirmed cases of BSE [2, 13, 20, 23, 24, 42, 44] or in BSE suspected and subsequently confirmed or unconfirmed cases [4, 10, 39]. BSE is characterized clinically by apprehension, hyperesthesia, gait ataxia and loss of body condition [11, 20, 34, 44, 47, 49]. The differential diagnosis of BSE is complex [29]. Diagnostic procedures include thorough clinical and neurological examinations with emphasis on the assessment of behavior, locomotion, and sensitivity [5]. Pattern-matching models for the differential diagnosis of BSE were also developed recently [9, 10].

The present clinical study applies a generalized approach that is independent of BSE prevalence. This present study is the first veterinary application of classification and regression trees (CART) [6]. The method is applied to a data set consisting of the suspected clinical BSE cases in Belgium. The aim of the present study was to identify important indicators for the classification of clinically suspected cases as a "BSE highly suspected case", allowing the development of clinical decision support tools. The conclusions are compared with previously published results.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Target population

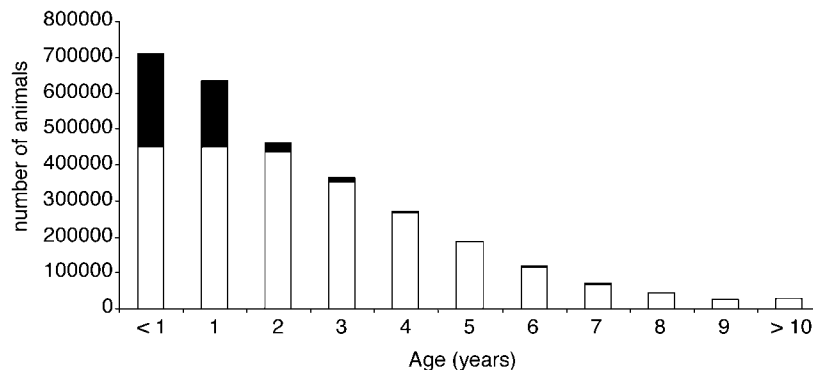
The statistics of the Belgian cattle population are given in Table 1 and its age pyramid by sex is shown in Figure 1.

**Table 1. Belgian cattle population in the period from 1998 to 2000 <sup>a</sup>**

Year	Number of herds	Number of live animals	
		< 24 months	≥24 months
1998	48,126	1,402,685	1,522,944
1999	51,776	1,341,152	1,571,563
2000	50,666	1,490,775	1,626,981

<sup>a</sup> Source: SANITEL (Belgian databank for registration and movement of cattle)

**Figure 1. Age pyramid of Belgian cattle in 2000 (□ = females; ■ = males).**



### 2.2. Laboratory analyses

Confirmatory diagnosis of all suspected clinical BSE cases consists of (i) a histological examination of the central nervous system, demonstrating the spongiform aspect of the brain, (ii) extraction and examination of the fibers associated with scrapie (scrapie-associated fibers, [SAF]) and (iii) an immunohistochemical examination [34, 38, 40, 41].

### **2.3. Inclusion criteria**

All clinical BSE cases, reported before October 2002 ( $n = 30$ ), and all other suspected clinical cases identified during the period from 1998 to 2000 were included in the present study [30, 31]. The period from 1998 to 2000 covers the time between the first confirmed case in Belgium in October 1997 [38] and the introduction of the rapid diagnostic tests in January 2001 [26]. Cases were only included if they concerned animals over 20 months of age and if a complete clinical evaluation record form was available ( $n = 272$ ).

### **2.4. Clinical evaluation record**

Suspected clinical BSE cases are discovered on the farm by the owner and/or private veterinary practitioner and in the abattoir by a state veterinary officer during ante-mortem examinations. Owners and veterinarians are regularly updated through all possible channels. A specifically assigned state veterinary officer re-examines all suspected cases. The officer completes a clinical evaluation record form indicating presence or absence of 25 clinical signs (Table 2). The clinical signs include behavioral change, sensory problems, locomotion problems, posture anomalies, and general problems.

### **2.5. Scoring of clinical signs**

A value of 1 was attributed for each observed clinical sign, and the score of an individual animal is defined as the sum (i.e., the number of clinical signs observed for that animal). Depending on the cases, scores can be total scores, or scores for groups of signs, but this will be made clear in the text.

### **2.6. Data base**

The following data were entered for every case fulfilling the above inclusion criteria: (i) year, month, method of detection (farm or abattoir), and geographical localization, (ii) month and year of birth and age of the animal, (iii) results of laboratory analyses, (iv) presence or absence of the signs listed in Table 2 and scores of the most frequent clinical signs for each of the neurohistopathological diagnosis categories.

### **2.7. Statistical analysis**

Statistical analyses were carried out with STATA/SE 7 (Stata Statistical Software, release 7.0; Stata Corp., College Station, Texas), and CART 4.0 [6]. The former was used to prescreen the signs to be entered into CART, using adjusted odds ratios, as defined by Grenier [17]. CART was developed by Breiman et al. [6] and Clark and Pregibon [8] and was evaluated previously



in medical science [12, 37]. This methodology is particularly useful for classification and regression problems where one has a set of classification or predictor variables and a single response variable. The predictor variables can be a mixture of factors and numeric variables. The initial construction of a tree involves three elements: (i) selection of binary splits of the measurement space, (ii) the decision of whether to declare a node as terminal or to continue splitting, and (iii) the assignment of each terminal node to a class [12]. In the present study the Gini index was used as the splitting method and a 10-fold cross-validation was used as the method for testing the obtained trees. The ultimate aim was to produce a decision tree with sensitivity equal to 1 (all confirmed cases are included in the final nodes) and with specificity as high as possible (the number of unconfirmed cases in the final nodes is minimized).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Distribution in space and time

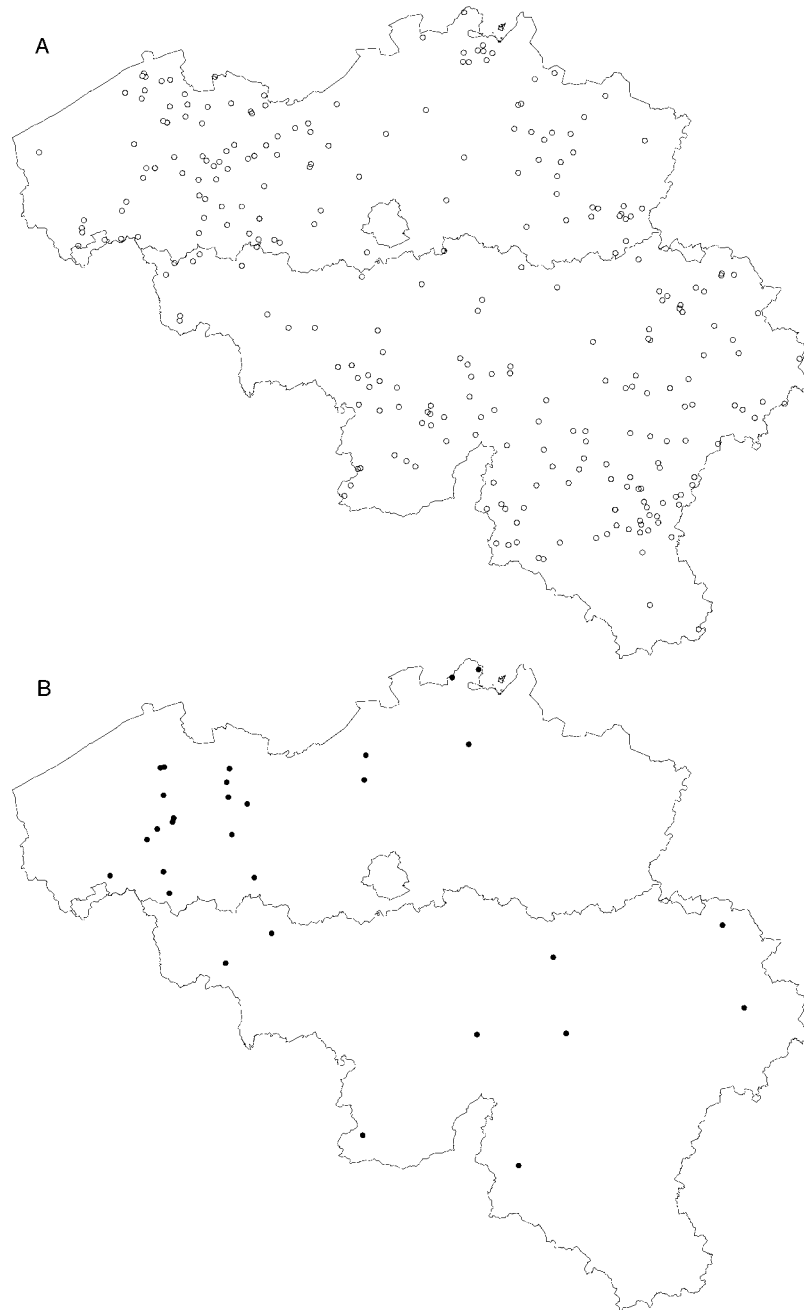
No statistically significant differences in spatial ( $\chi^2 = 0.98$ ; d.f. = 1;  $P = 0.322$ ) and temporal distribution ( $\chi^2 = 3.57$ ; d.f. = 2;  $P = 0.168$ ) were found between the sample retained in the present study and the total number of suspected clinical BSE cases during the period from 1998 to 2000 (Figure 2). Animals over 48 months were encountered significantly more in the suspected cases ( $\chi^2 = 17.02$ ; d.f. = 1;  $P < 0.001$ ). For bovines older than 24 months, the annual cumulated incidence of clinical BSE confirmed cases for the period studied were, respectively,  $3.94/10^6$  animals in 1998 (95% confidence interval [CI] =  $1.5/10^6$  to  $8.6/10^6$  animals),  $1.9/10^6$  animals in 1999 (95% CI =  $0.4/10^6$  to  $5.6/10^6$  animals), and  $5.5/10^6$  animals in 2000 (95% CI =  $2.5/10^6$  to  $10.5/10^6$  animals). The ratios between the clinical BSE confirmed and suspected cases were low: 3.7% in 1998, 1.6% in 1999, and 3.2% in 2000. Fewer suspected cases were reported between June and October, when the animals are kept outdoors (average per month = 14.4), compared to the period November-May (average per month = 31.1, Poisson regression likelihood ratio  $\chi^2 = 36.02$ ; d.f. = 1;  $P < 0.001$ ), but no such departure from a uniform distribution could be detected for confirmed BSE cases (1.6 cases per month during period June-October versus 1.4 cases per month during period November-May, Poisson regression likelihood ratio  $\chi^2 = 0.06$ ; d.f. = 1;  $P = 0.812$ ). This observation suggests that the BSE rapid tests carried out in accordance with European decision 2000/764/EC [1] play an important role in the global BSE epidemiosurveillance network.

### 3.2. Duration of illness

The mean duration of illness (defined as the time between the onset of clinical signs and the veterinary officer's visit) is an important parameter taking account of a BSE suspicion [23, 39, 42] and could be determined for 23 confirmed BSE cases: the median length was 30 days (average = 44 days, minimum = 7 days, maximum = 143 days). This observed median duration is considerably shorter than the 40 to 80 days reported for other European countries [13, 39, 44]. No precise information was available for the other seven confirmed cases: all four abattoir cases were included, one case was diagnosed a few days after the animal was purchased, one case was diagnosed when the animals were turned out onto their pastures, and for the last case a period of a few months was reported without further information. This underlines the difficulty to obtaining reliable information when dealing with concealed disorders or when the animals are outdoors [33]. An increase in precision of reported duration was, however, noted in

the present study after training sessions of the government officers involved, indicating that similar awareness campaign of farmers and private veterinary practitioners would lead to more precise data.

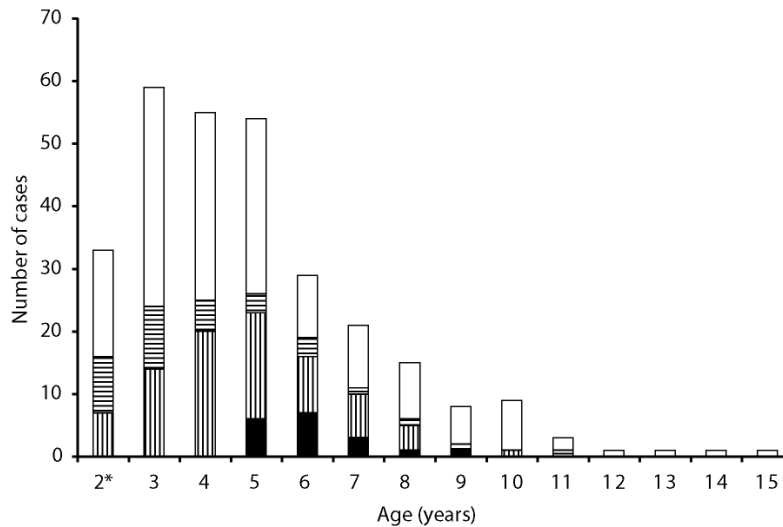
**Figure 2. Clinical BSE in Belgium. A diagram shows spatial distribution of the investigated cases, i.e., suspected cases with full clinical evaluation record. (A) BSE suspected cases and subsequently unconfirmed cases from 1998 to 2000 ( $n = 272$ ); (B) all BSE confirmed cases before October 2002 ( $n = 30$ ).**



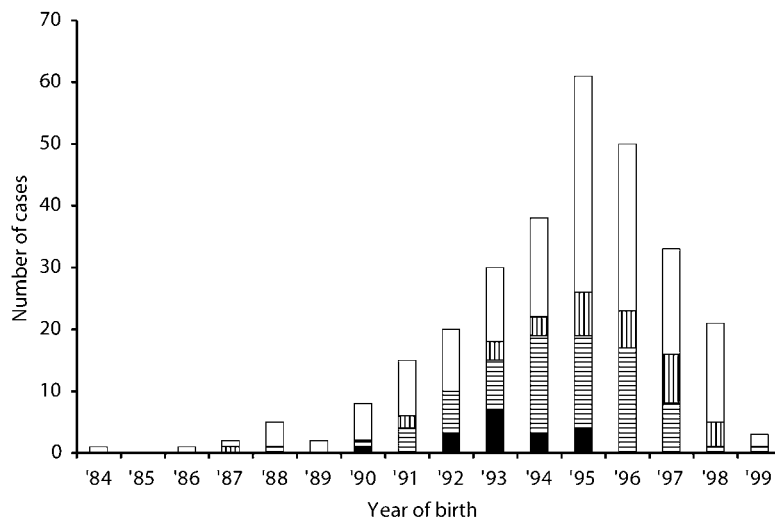
### 3.3. Major predictor variables

The age distribution of suspected BSE cases for the period 1998 to 2000 is shown in Figure 3. BSE confirmed cases were significantly more observed in animals in the age bracket of 54 to 112 months ( $\chi^2 = 9.86$ ; d.f. = 1;  $P = 0.002$ ). The distribution of year of birth of the suspected BSE cases for the same period is shown in Figure 4. BSE confirmed cases were more frequently observed in animals born between 1990 and 1995 ( $\chi^2 = 13.17$ ; d.f. = 1;  $P < 0.001$ ).

**Figure 3. Age distribution of clinically suspected BSE cases in Belgium between 1998 and 2000 ( $n = 290$ ). Bars: ■, BSE; ▨, listeriosis; ▩, meningitis and/or encephalitis; □, others; \*, bovines between 20 and 24 months.**



**Figure 4. Clinically suspected BSE cases in Belgium between 1998 and 2000 by birth cohort ( $n = 290$ ). Bars: ■, BSE; ▨, listeriosis; ▩, meningitis and/or encephalitis; □, others.**



### 3.4. Neurohistopathological findings

Listeriosis and meningitis and/or encephalitis were the most frequent neurohistopathological findings in the period 1998 to 2000 (Table 3). Four groups of cattle are considered in the following sections of the present study: group A (BSE), group B (listeriosis), group C (meningitis and/or encephalitis) and group D (no specific neurohistopathological lesions). The absence of significant neurohistopathological lesions in 56% of clinically suspected but afterwards unconfirmed BSE cases is comparable with those previously published [10, 25, 27, 40]. However, the neurohistopathological findings observed in Belgium are not identical to those reported in the differential diagnosis of BSE in United Kingdom [21, 22, 39]. This observation suggests that the prevalence of different diseases taken into account in the differential diagnosis of BSE would differ between the two countries.

**Table 3. Frequency of the neurohistopathological findings in 290 BSE suspected cases older than 20 months with full clinical evaluation record (1998 to 2000)<sup>a</sup>**

Neurohistopathology	Frequency
Listeriosis	79
Suppurative encephalitis and/or meningitis <sup>b</sup>	21
Bovine spongiform encephalopathy	18 <sup>a</sup>
Non-suppurative encephalitis and/or meningitis <sup>b</sup>	13
Suppurative thrombo-embolic encephalitis	2
Tumors	2
Putrefaction	2
No specific neurohistopathological lesions	153
Total	290 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Twelve confirmed BSE cases between January 2001 and September 2002 were added these results were compared with data in Table 2 and Figure 6; <sup>b</sup> combined with the meningitis or/and encephalitis group in Table 2.

**Table 2. Adjusted odds ratios, calculated for 25 clinical signs in 30 cows with BSE and 272 bovines with suspected but unconfirmed BSE**

Sign category and specific sign	adjOR (95% CI) <sup>a</sup>			
	All other cases (n = 272)	Listeriosis (n = 79)	Meningitis and/or encephalitis (n = 34)	Cases without specific lesions (n = 153)
The most common signs of BSE confirmed cases (BSE signs)				
Kicking in the milking parlor	6.75 (1.27-35.82)*	4.59 (0.58-36.35)	6.05 (0.28-131.26)	5.32 (0.88-32.10)
Hypersensitivity to touch or/and sound	5.83 (2.67-12.75)*	4.08 (1.70-9.76)*	5.29 (1.83-15.29)*	6.87 (3.00-15.74)*
Head shyness	5.80 (2.67-12.60)*	4.92 (2.03-11.93)*	6.49 (2.13-19.77)*	5.99 (2.64-13.60)*
Panic-stricken response	5.43 (2.50-11.76)*	4.59 (1.90-11.08)*	3.45 (1.25-9.56)*	6.52 (2.86-14.87)*
Reluctance to enter in the milking parlor	5.39 (1.78-16.34)*	3.62 (0.96-13.60)	14.88 (0.79-281.52)	4.89 (1.46-16.43)*
Abnormal ear movement or carriage	3.80 (1.77-8.17)*	1.76 (0.76-4.09)	3.97 (1.41-11.18)*	5.99 (2.64-13.60)*
Increased alertness behavior	3.75 (1.76-8.02)*	2.43 (1.04-5.68)*	2.33 (0.86-6.31)	5.23 (2.31-11.85)*
Reduced milk yield	3.65 (1.55-8.57)*	3.28 (1.18-9.10)*	5.74 (1.29-25.64)*	3.24 (1.31-8.00)*
Teeth grinding	2.54 (1.15-5.58)*	3.18 (1.24-8.20)*	1.84 (0.64-5.32)	2.49 (1.08-5.72)*
Temperament change	2.49 (1.17-5.28)*	1.62 (0.70-3.75)	2.33 (0.87-6.29)	3.19 (1.45-7.03)*
The most common signs of listeriosis (LIS signs)				
Abnormal head carriage	0.68 (0.32-1.44)	0.35 (0.15-0.83)*	0.38 (0.14-1.02)	1.07 (0.49-2.36)
Circling	0.65 (0.23-1.84)	0.18 (0.06-0.55)*	0.62 (0.17-2.25)	2.58 (0.78-8.54)
Head pressing or rubbing	0.59 (0.19-1.87)	0.24 (0.07-0.81)*	0.47 (0.12-1.84)	1.44 (0.41-5.05)
The most common signs of meningitis or/and encephalitis (ME signs)				
Recumbence	0.57 (0.27-1.21)	0.73 (0.31-1.69)	0.33 (0.12-0.90)*	0.57 (0.26-1.25)
Blindness	0.10 (0.01-1.67)	0.09 (0.01-1.54)	0.05 (0.00-0.93)*	0.13 (0.01-2.19)
Other signs				
Loss of condition	2.02 (0.95-4.26)	1.91 (0.82-4.43)	2.33 (0.85-6.40)	1.99 (0.91-4.34)
Increase licking of the muzzle or/and flank	2.01 (0.73-5.48)	1.81 (0.57-5.81)	14.88 (0.79-281.52)	1.80 (0.63-5.15)
Hindleg or/and foreleg ataxia	1.83 (0.80-4.17)	1.63 (0.66-4.05)	1.87 (0.66-5.28)	1.91 (0.81-4.47)
Weakness of legs	1.61 (0.77-3.40)	1.25 (0.55-2.88)	1.59 (0.60-4.24)	1.77 (0.82-3.86)
Abnormal behavior	1.59 (0.75-3.39)	1.12 (0.48-2.61)	3.02 (1.11-8.27)*	1.71 (0.78-3.74)
Tremors	1.52 (0.72-3.22)	1.47 (0.64-3.39)	1.83 (0.69-4.87)	1.50 (0.69-3.25)
Maniacal excitement	1.40 (0.48-4.09)	0.71 (0.23-2.22)	1.15 (0.28-4.70)	2.32 (0.71-7.55)
Loss of weight	1.25 (0.52-3.00)	2.11 (0.74-6.02)	0.99 (0.32-3.07)	1.11 (0.45-2.73)
Paresis	1.12 (0.47-2.68)	1.57 (0.57-4.31)	0.74 (0.25-2.23)	1.03 (0.42-2.53)
Falling	0.95 (0.44-2.05)	0.64 (0.27-1.49)	0.83 (0.31-2.25)	1.21 (0.54-2.70)

<sup>a</sup> Values statistically significant at  $P = 0.05$  are indicated by an asterisk.

### 3.5. Clinical findings

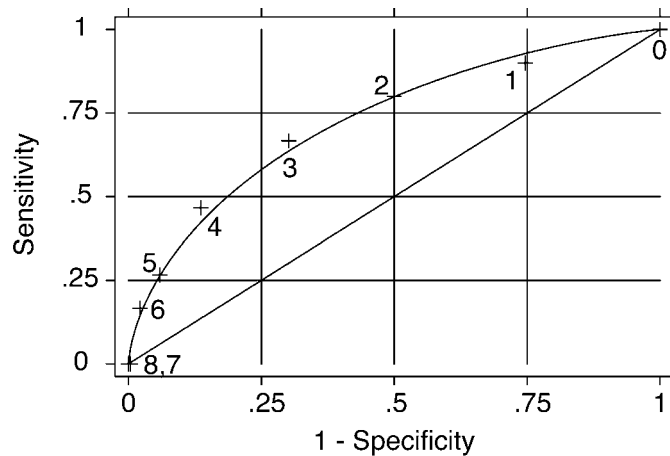
In function of results of neurohistopathological findings (groups A to D), the BSE suspected cases, subsequently confirmed or unconfirmed, were compared for each clinical sign separately and for all clinical signs combined.

#### 3.5.1. Comparison of each clinical sign

The comparison from each clinical sign was performed on the basis of neurohistopathological findings groups (Table 2). When BSE confirmed cases were compared to all BSE suspected but unconfirmed cases, the adjusted odds ratio ( $_{adj}OR$ ) were significantly higher than 1 for 10 clinical signs (BSE signs, in decreasing order): kicking in the milking parlor, hypersensitivity to touch and/or sound, head shyness, panic-stricken response, reluctance to enter in the milking parlor, abnormal ear movement or carriage, increased alertness behavior, reduced milk yield, teeth grinding, and change in temperament. Maximum efficacy in a receiver-operating-characteristic curve was obtained for a score of between 2 and 4 BSE signs (Figure 5). The same clinical signs were recorded more frequently in BSE cases compared to group D, except for kicking in the milking parlor (no significant  $_{adj}OR$ ). When BSE cases were compared to group B, six signs occurred statistically frequent in BSE cases (these were in decreasing order: head shyness, panic-stricken response, hypersensitivity to touch and/or sound, reduced milk yield, teeth grinding, and increased alert behavior), whereas three others were significantly more recorded in group B (LIS signs, in decreasing order: circling, head pressing or rubbing and abnormal head carriage). In addition, listeriosis occurs more frequently in winter and spring [40] and the mean duration of illness was found to be shorter, varying from 4 to 14 days [35, 38]. Compared to group C, six signs were reported more frequently in BSE cases (these were in decreasing order: head shyness, reduced milk yield, hypersensitivity to touch and/or sound, panic-stricken response, abnormal ear movement or carriage, and abnormal behavior), and two signs were encountered more frequently in group C (ME signs, in decreasing order: blindness and recumbence). In all comparisons, the most common signs of BSE were behavioral signs (especially head shyness and panic-stricken response), hyperesthesia, and reduced milk yield. Ataxia did not appear as a specific sign of BSE, but locomotor signs alone were noted in one BSE case and together with general disorders in another case (a pattern also reported by McElroy and Weaver) [24], but nevertheless ataxia as such was not a specific sign. It must be stressed again that these results were obtained on the basis of odds ratios, i.e., a statistic that is independent of sample size and disease prevalence. The observation that the behavioral changes and hyperesthesia predominate can be related to the preferred localization of the neuronal vacuolization in cattle [23, 34, 36]. This relationship between clinical sign and

pathology considerably increases the appropriateness to use the signs in a decision-support tool. Nevertheless a complete clinical examination and a detailed case anamnesis remain essential to arrest BSE [24]. No single clinical sign is pathognomonic for BSE, and recourse to complementary confirmatory examinations is needed [29, 32].

**Figure 5. Receiver-operating-characteristic curve of the score of the 10 most relevant signs of BSE (area under curve = 0.7290 s.e.[area] = 0.0503; 0,1,...,7,8 = BSE sign score).**



### 3.5.2. Comparison of all clinical signs (patterns)

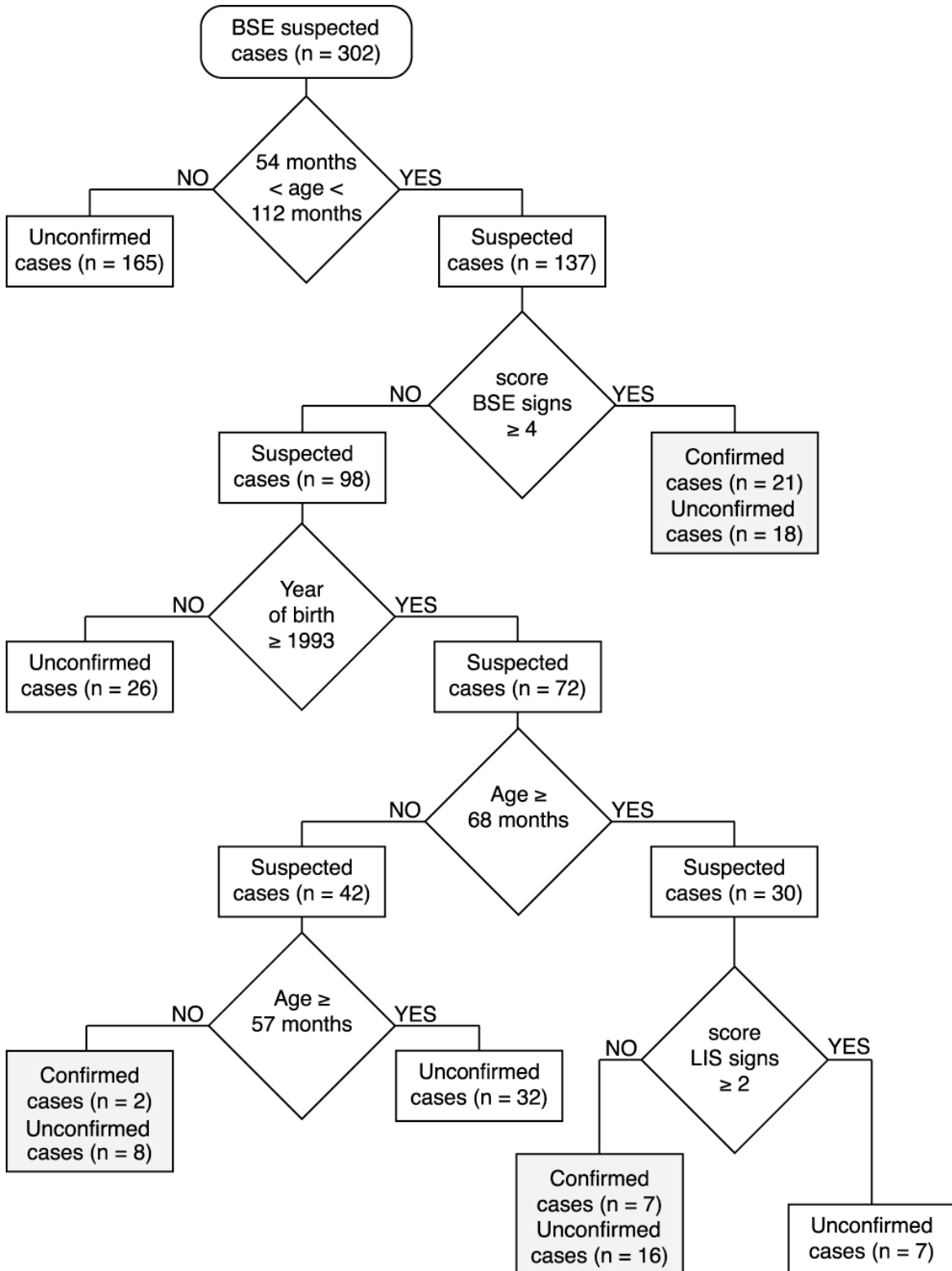
The clinical patterns observed in individual groups (A to D) were compared using a Spearman rank correlation. All six pair-wise comparisons (A versus B, A versus C, A versus D, B versus C, B versus D, and C versus D) yielded significant correlations, ranging in magnitude from 0.51 to 0.88. Using entire sets of patterns did not permit statistical discrimination and neurohistopathological findings therefore have no predictive power for making clinical decisions. The consistent differences observed in comparing overall clinical pictures indicate that suspected BSE cases form a distinct clinical entity.

### 3.6. Construction of a clinical decision tree

The following predictor variables were introduced in CART: age (in months), year of birth, each of the 25 clinical signs described in Table 2, combination of hypersensitivity to touch and/or sound and/or increased alertness, the score of 10 clinical signs that were encountered significantly more frequently in BSE confirmed cases (Table 2, BSE signs), the score of the three clinical signs that were significantly more frequent in listeriosis (Table 2, LIS signs), and the score of the two clinical signs that were significantly more frequent in meningitis and/or encephalitis (Table 2, ME signs). The clinical decision tree obtained in CART is shown in Figure 6.



Figure 6. CART decision tree for clinically suspected bovine BSE cases in Belgium.



Using only the 54-to-112-month age bracket identified all confirmed cases (sensitivity = 1, but this simple model had a specificity of only 0.61). Inclusion of all predictor variables produced a model that still had sensitivity equal to 1 (30 BSE confirmed cases in a final node), but the specificity was increased to 0.85 (42 out of 272 non-confirmed cases in a final node). The BSE confirmed cases are found in three final nodes: (i) animals between 54 and 57 months, born after 1993, (ii) animals between 54 and 112 months of age with at least four BSE signs; and (iii) animals between 68 and 112 months, born after 1993 with fewer than two typical listeriosis signs (Table 2, LIS signs).

The originality of the current approach lies in the fact that, first, it offers an explorative and interactive tool and, second, that the results and conclusions are independent of BSE prevalence, through its use of odds ratios. The second feature is especially appealing for rare events. A similar decision tree, allowing the distinction of "highly suspected BSE cases" from all other suspected BSE cases, could be applied in other countries, with or without the use of rapid tests. The continued addition of clinical data would permit further improvement of the current model tree, even if the clinical BSE pattern would be modified in time. The same methodology can also be applied to other afflictions and diseases, e.g. scrapie.

## **4. Acknowledgements**

We thank all members of the Federal Agency for the Safety of the Food Chain (FASFC), the Veterinary Agrochemical Research Centre, the Central Animal Health Organization (CAHO), and the many farmers and veterinarians who cooperated in this study. We particularly thank P. Dechamps (FASFC) for access to all clinical evaluation records, H. Deblander (Institut Scientifique Louis Pasteur, Brussels, Belgium) for the mapping, and V. Monfort (CAHO) for providing the cattle population data.

## 5. References

1. ANONYMOUS. European Commission Decision 2000/764/EC of 29 November 2000 on the testing of bovine animals for the presence of bovine spongiform encephalopathy and amending decision 98/272/EC on epidemio-surveillance for transmissible spongiform encephalopathies. *Eur. Commun. Off. J.*, 2000, **L305**, 35-38.
2. BRADLEY R. Les encéphalopathies spongiformes animales en Grande Bretagne. *Bull. Soc. Vét. Prat. De France*, 1994, **78**, 339-385.
3. BRADLEY R., WILESMITH J. W. Epidémiologie des encéphalopathies spongiformes en Grande-Bretagne. *Epidémiol. et santé anim.*, 1991, **19**, 27-48.
4. BRAUN U., SCHICKER E., HÖRNLIMANN B. Diagnostic reliability of clinical signs in cows with suspected bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.*, 1998, **143**, 101-105.
5. BRAUN U., KIHM U., PUSTERLA N., SCHÖNMANN M. Procédure d'examen clinique en cas de suspicion d'encéphalopathie spongiforme bovine. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 1997, **139**, 35-41.
6. BREIMAN L., FRIEDMAN J. H., OLSHEN R. A., STONE C. J. Classification and Regression Trees, Wadsworth S., Pacific Grove, California, 1984.
7. BRUCE M. E., WILL R. G., IRONSIDE J. W., MCCONNELL I., DRUMMOND D., SUTTIE A., MCCARDLE L., CHREE A., HOPE J., BIRKETT C., COUSENS S., FRASER H., BOSTOCK C. J. Transmissions to mice indicate that "new variant" CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, 1997, **389**, 498-501.
8. CLARK L. A., PREGIBON D. A. Tress-based models. p. 377-419. *In* Chambers J.A. & T.J. Hastie (ed.), *Statistical Models*, Wadsworth, Pacific Grove, California, 1992.
9. COCKCROFT, P. D. Clinical sign profile likelihood ratios for bovine spongiform encephalopathy suspects. *Res. Vet. Sci.*, 2000, **68**, 285-290.
10. COCKCROFT, P. D. Pattern-matching models for the differential diagnosis of bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.*, 1999, **144**, 607-610.
11. CRANWELL M. P., HANCOCK R. S., HINDSON J. R., HALL S. A., DANIEL N. J., HOPKINS A. R., WONNACOTT B., VIVIAN M., HUNT P. Bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.*, 1988, **122**, 190.
12. CRICHTON N. J., HINDE J. P., MARCHINI J. Models for diagnosing chest pain: is CART helpful ? *Stat. Med.*, 1997, **16**, 717-727.

13. DENNY G. O., HUESTON W. D. Epidemiology of bovine spongiform encephalopathy in Northern Ireland 1988 to 1995. *Vet. Rec.*, 1997, **140**, 302-306.
14. DEPARTMENT FOR ENVIRONMENT, FOOD AND RURAL AFFAIRS. Bovine spongiform encephalopathy in Great Britain: youngest and oldest cases by year of onset (passive surveillance only). [Online.] <http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/bse-statistics/bse/young-old.html>, 2002.
15. DEPARTMENT FOR ENVIRONMENT, FOOD AND RURAL AFFAIRS. Bovine spongiform encephalopathy in Great Britain: confirmed cases by year of birth. [Online.] <http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/bse-statistics/bse/ybirth.html>, 2000.
16. FERGUSON N. M., DONNELLY C. A., WOOLHOUSE M. E. I., ANDERSON R. M. The Epidemiology of BSE in cattle herds in Great Britain. II. Model construction and analysis of transmission dynamics. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 1997, **352**, 803-838.
17. GRENIER B. Utilisation des ODDS dans les tests associés ou séquentiels, p. 102-106. *In* Décision médicale. Analyse et stratégie de la décision dans la pratique médicale. Edition Masson, Paris, France, 1990.
18. HEIM D., KIHM U. Bovine spongiform encephalopathy in Switzerland – the past and the present. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, 1999, **18**, 135-144.
19. HILL A. F., DESBRUSLAIS M., JOINER S., SIDLE K. C. L., GOWLAND J., COLLINGE L., DOEY L. J., LANTOS P. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, 1997, **389**, 448-450.
20. HÖRNLIMANN B., BRAUN U. Bovine spongiform encephalopathy (BSE): clinical signs in Swiss BSE cases, p. 289-299. *In* R. Bradley and B. Marchant (ed.), Transmissible Spongiform Encephalopathy. Proceedings of a Consultation on BSE with the Scientific Veterinary Committee of the Commission of the European Communities, Brussels, 1993.
21. JEFFREY M., SIMMONS M. M., WELLS G. A. H. Observations on the differential diagnosis of bovine spongiform encephalopathy in Great Britain, p. 347-362. *In* Proceedings of consultation on BSE with the scientific Committee of the European Communities, Brussels, 1993.
22. JEFFREY M., WILESMITH J. W. Idiopathic brainstem neuronal chromatolysis and hippocampal sclerosis: a novel encephalopathy in clinically suspect cases of bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.*, 1992, **131**, 359-362.
23. KIMBERLIN R. H. Bovine spongiform encephalopathy. *Rev. sci. techn. Off. Int. Epiz.*, 1992, **11**, 347-390.

24. MCELROY M. C., WEAVERS E. D. Clinical presentation of bovine spongiform encephalopathy in the Republic of Ireland. *Vet. Rec.*, 2001, **149**, 747-748.
25. MCGILL I. S., WELLS G. A. H. Neuropathological findings in cattle with clinically suspect but histologically unconfirmed Bovine Spongiform Encephalopathy. *J. Comp. Path.*, 1993, **108**, 241-260.
26. PASTORET P. P., GOUFFAUX M., SAEGERMAN C., ROELS S., DECHAMPS P., THIRY E., VANOPDENBOSCH E. Le diagnostic immunologique rapide des encéphalopathies spongiformes transmissibles. *Ann. Méd. Vét.*, 2001, **145**, 164-173.
27. POLLIN M. M., MCGILL I. S., WELLS G. A. H. The differential neurohistological diagnoses of clinically suspect but unconfirmed BSE. *Neuropath. Appl. Neurobiol.*, 1992, **18**, 638.
28. PRUSINER S. B. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, **95**, 13363-13383.
29. SAEGERMAN C., CLAES L., DEWAELE A., DESMECHT D., ROLLIN F., HAMOIR J., GUSTIN P., CZAPLICKI G., BUGHIN J., WULLEPIT J., LAUREYNS J., ROELS S., BERKVEN S., VANOPDENBOSCH E., THIRY E. Differential diagnosis of neurologically expressed disorders in Western European cattle. *Rev. sci. techn. Off. Int. Epiz.*, 2003, **22 (1)**, 83-102.
30. SAEGERMAN C., DECHAMPS P., ROELS S., PETROFF K., GEEROMS R., TORCK G., DUFÉY J., FOUREZ R., HAMELRYCKX M., CORMANN A., VIATOUR P., DE CONINCK V., LOMBA F., VERMEERSCH J. P., HALLET L., LHOST O., LEEMANS M., VANDERSANDEN A., PEHARPRE D., BROCHIER B., COSTY F., PASTORET P.P., THIRY E., VANOPDENBOSCH E. Epidémiologie de l'encéphalopathie spongiforme bovine en Belgique : bilan de l'année 1999. *Ann. Méd. Vét.*, 2001, **145**, 47-58.
31. SAEGERMAN C., DECHAMPS P., VANOPDENBOSCH E., ROELS S., PETROFF K., DUFÉY J., VAN CAENEGHEM G., DEVREESE D., VAREWYCK H., DE CRAEMERE H., DESMEDT I., CORMANN A., TORCK G., HALLET L., HAMELRIJCKX M., LEEMANS M., VANDERSANDEN A., PEHARPRE D., BROCHIER B., COSTY F., MULLER P., THIRY E., PASTORET P. P. Epidémiologie de l'encéphalopathie spongiforme bovine en Belgique : bilan de l'année 1998. *Ann. Méd. Vét.*, 1999, **143**, 423-436.
32. SAEGERMAN C., CLAES L., VANOPDENBOSCH E., BIRONT P., DELUYKER H., THIRY E. Etude rétrospective de l'incidence des troubles neurologiques rapportés et suspects d'encéphalopathie spongiforme transmissible chez les bovins en Belgique. *Epidémiol. santé anim.*, 1999, **35**, 31-42.
33. SCHELCHER F., ANDREOLETTI O., CABANIE P., TABOURET G. Démarche diagnostique dans les maladies nerveuses des bovins, p 229-240. *In Proceedings of SFB*, Paris, 2001.

34. SCOTT A. C., WELLS G. A. H., STACK M. J., WHITE H., DAWSON M. Bovine spongiform encephalopathy: detection and quantification of fibrils, fibril protein (PrP) and vacuolation in brain. *Vet. Microbiol.*, 1990, **23**, 295-304.
35. STÖBER M. Symptomatologie différentielle de quelques affections du système nerveux des bovins. *Ann. Méd. Vét.*, 1997, **131**, 401-410.
36. SWANSON L. W. Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Research.*, 2000, **886**, 113-164.
37. THWAITES G. E., CHAU T. T., STEPNIEWSKA K., PHU N. H., CHUONG L. V., SINH D. X., WHITE N. J., PARRY C. M., FARRAR J. J. Diagnosis of adult tuberculous meningitis by use of clinical and laboratory features. *Lancet*, 2002, **360**, 1287-1292.
38. VANOPDENBOSCH E., DECHAMPS P., SAEGERMAN C., DUFEY J., ROELS S., MULLIER P., HALLET L., BROCHIER B., COSTY F., CHARLIER G., FOUREZ R., PASTORET P. P. Le premier cas d'encéphalopathie spongiforme bovine diagnostiqué en Belgique. *Ann. Méd. Vét.*, 1998, **142**, 111-118.
39. WELLS G. A. H., SAYERS A. R., WILESMITH J. W. Clinical and epidemiological correlates of the neurohistology of cases of histologically unconfirmed, clinically suspect bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.*, 1995, **136**, 211-216.
40. WELLS G. A. H., HANCOCK R. D., COOLEY W. A., RICHARDS M. S., HIGGINS R. J., DAVID G. P. Bovine spongiform encephalopathy: diagnostic significance of vacuolar changes in selected nuclei of the medulla oblongata. *Vet. Rec.*, 1989, **125**, 521-524.
41. WELLS G. A. H., SCOTT A. C., JOHNSON C. T., GUNNING R. F., HANCOCK R. D., JEFFREY M., DAWSON M., BRADLEY R. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.*, 1987, **121**, 419-420.
42. WILESMITH J. W. Manual on bovine spongiform encephalopathy. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 1998.
43. WILESMITH J. W., RYAN J. B. M., HUESTON W. D. Bovine spongiform encephalopathy: case-control studies of calf feeding practices and meat and bone meal inclusion in proprietary concentrates. *Res. Vet. Sci.*, 1992, **52**, 325-331.
44. WILESMITH J. W., HOINVILLE L. J., RYAN J. B. M., SAYERS A. R. Bovine spongiform encephalopathy: aspects of the clinical picture and analyses of possible changes 1986-1990. *Vet. Rec.*, 1992, **130**, 197-201.
45. WILESMITH J. W., RYAN J. B. M., HUESTON W. D., HOINVILLE L. J. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological features 1985 to 1990. *Vet. Rec.*, 1992, **130**, 90-94.

46. WILESMITH J. W., RYAN J. B. M., ATKINSON M. J. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet. Rec.*, 1991, **128**, 199-203.
47. WILESMITH J. W., WELLS G. A. H., CRANWELL M. P., RYAN J. B. M. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet. Rec.*, 1988, **123**, 638-644.
48. WILL R. G., IRONSDALE J. W., ZEIDLER M., COUSENS S. N., ESTIBEIRO K., ALPEROVITCH A., POSER S., POCCHIARI M., HOFMAN A., SMITH P. G. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet.*, 1996, **347**, 921-925.
49. WINTER M. H., ALDRIDGE B. M., SCOTT P. R., CLARKE M. Occurrence of 14 cases of bovine spongiform encephalopathy in a closed dairy herd. *Brit. Vet. J.*, 1989, **145**, 191-194.



## **Chapitre 4**

### **Etude de la persistance d'un événement rare**

#### **La contamination environnementale du cheptel bovin par des PCBs/dioxines**

*« Dire des mots,  
ne pas y croire  
mais les écrire cependant  
est le propre de notre temps »*

*Adapté du Général de Gaule*

## Préambule

La Belgique a connu, en janvier 1999, une contamination de la chaîne alimentaire, appelée « crise de la dioxine » (Maghuin-Rogister *et al.*, 1999 ; Focant *et al.*, 2002). Au niveau belge, les conséquences économiques de cette crise ont été estimées à près d'un milliard d'euros (Lebailly *et al.*, 2000). Différentes évaluations de risque concernant l'impact de cette crise sur la santé publique ont été produites durant la crise (Bernard *et al.*, 1999) et après la crise (Bernard *et al.*, 2002 ; Van Larebeke *et al.*, 2002 ; Vrijens *et al.*, 2002). Selon le modèle d'exposition envisagé, l'influence de la crise belge sur la charge corporelle en dioxines a été différemment qualifiée en fonction des études qui ont été menées : négligeable (Bernard *et al.*, 2002), faible (Vrijens *et al.*, 2002) et très importante (Van Larebeke *et al.*, 2002). Les modèles d'exposition étaient les suivants :

- Pour une population de jeunes adultes, il a été estimé que le doublement de la charge corporelle en PCBs et en dioxines aurait nécessité la consommation de respectivement 10 et 20 repas à base de poulet très contaminé ; ce qui est improbable compte tenu du fait que seul environ 2% des poulets mis sur le marché étaient contaminés (Bernard *et al.*, 2002).
- Une approche probabiliste basée sur les habitudes alimentaires de 341 adolescents gantois suivis durant 7 jours au printemps 1997 (Lambe *et al.*, 2000 ; De Henauw *et al.*, 2001) et sur les niveaux supposés de contamination des aliments durant la crise n'est pas alarmante (Vrijens *et al.*, 2002). L'effet de la crise serait statistiquement mesurable sans toutefois affecter de manière drastique les taux habituels d'exposition de la population (Vrijens *et al.*, 2002).
- Si on considère que (i) les quantités supposées de PCBs (50 kg) et de dioxines (1 g TEQ) ont été entièrement introduites dans la chaîne alimentaire durant la crise de 1999, (ii) que celles-ci ont été réparties sur l'ensemble des consommateurs potentiels en Belgique et (iii) que la probabilité de développer un cancer en fonction des charges corporelles en PCBs et dioxines suit un modèle dose-risque tel que défini par Bercher *et al.* (1998), une augmentation du nombre de cancers pourrait se situer entre 44 et 8300 unités sur une population belge de 10 millions d'habitants (Van Larebeke *et al.*, 2002). Il est clair que pour ces auteurs, la crise a eu un impact significatif sur la charge corporelle des citoyens belges ayant consommé ces denrées alimentaires.

Ce chapitre décrit l'approche méthodologique qui a été utilisée pour détecter une contamination environnementale par les PCBs/dioxines au sein du cheptel bovin belge non soumis au risque alimentaire (incident 1999). Cette approche est basée sur l'échantillonnage systématique de toutes les stations d'engraissement de veaux, des lots de bovins destinés à l'exportation,

l'échantillonnage aléatoire standardisé des bovins abattus en Belgique durant une semaine et l'échantillonnage du lait de citerne (mélange de lait provenant de trois camions citernes par province). Cette approche est comparée à celle préconisée par la directive (CE) n° 96/23 du Conseil concernant des mesures de monitoring de certaines substances et résidus d'animaux vivants et de produits animaux. Une évaluation des risques a été également mise en œuvre en prenant en compte des scénarii extrêmes et en établissant une prédiction réaliste de l'évolution du taux d'imprégnation en dioxines de la population. Un effet dépendant du type de consommation a été mis en évidence.

## **Article 4**

**Détection des biphényles polychlorés et des dioxines  
dans le cheptel bovin belge et estimation de  
l'exposition potentielle maximale chez les humains  
par l'intermédiaire des aliments d'origine bovine**

## Résumé

La méthodologie utilisée pour détecter une contamination par des biphényles polychlorés (PCBs)/dioxines dans la population bovine belge qui n'a pas été exposée à l'incident PCBs/dioxines de 1999 est présentée. Cette population est directement ou indirectement destinée à la consommation humaine. La méthodologie consiste en un échantillonnage systématique de toutes les stations d'engraissement de veaux, des lots de bovins destinés à l'exportation et en un échantillonnage aléatoire des bovins abattus en Belgique. Cette approche est comparée à celle préconisée par la directive 96/23/CE du Conseil européen. Lorsque les concentrations en PCBs (7 congénères numérotés 28, 52, 101, 118, 138, 153 et 180) excédaient le seuil de tolérance de 0,2 µg/g de graisse corporelle, le dosage des dioxines a été réalisé (17 congénères PCDDs et PCDFs possédant des atomes de chlore en position 2,3,7,8). La prévalence des bovins belges abattus avec une concentration PCBs excédant ce seuil était de 0,3% (intervalle de confiance 95% : 0,01 – 1,5%). Les résultats indiquent que l'incidence d'une contamination était minimale, avec une origine environnementale commune aux régions industrielles. L'exposition potentielle maximale du consommateur adulte aux dioxines provenant de l'alimentation d'origine bovine a été estimée dans deux scénarii extrêmes. Le premier correspond à la consommation de produits alimentaires contaminés par un faible nombre de consommateurs durant une longue période (type de consommation dite « locale ») et le second simule la consommation de produits contaminés par un grand nombre de consommateurs durant une courte période (type de consommation dite « super marché »). La consommation journalière maximale théorique de dioxines chez les adultes était respectivement de 374 et 123 pg TEQ/jour. L'augmentation maximale estimée de la charge corporelle en dioxines correspond à 7 pg TEQ/jour dans le mode de consommation locale et de 0,07 pg TEQ/g de graisse dans le mode de consommation type super marché.

## **Detection of polychlorinated biphenyls and dioxins in Belgian cattle and estimation of the maximal potential exposure in humans through diets of bovine origin**

Saegerman C.<sup>1</sup>, Berkvens D.<sup>2</sup>, Boelaert F.<sup>3</sup>, Speybroeck, N.<sup>2</sup>, Van Vlaenderen I.<sup>3</sup>, Lomba M.<sup>4</sup>, Ermens A.<sup>5</sup>, Biront P.<sup>3</sup>, Broeckaert F.<sup>6</sup>, De Cock A.<sup>7</sup>, Mohimont L.<sup>7</sup>, Demont S.<sup>7</sup>, De Poorter G.<sup>7</sup>, Torfs B.<sup>8</sup>, Robijns J-M.<sup>9</sup>, Monfort V.<sup>9</sup>, Vermeersch J-P<sup>1</sup>, Lengelé L.<sup>1</sup>, Bernard A.<sup>6</sup>

1. Ministry of Small Enterprises, Traders and Agriculture, Veterinary Inspection, World Trade Center III, Avenue Simon Bolivar 30, B-1000 Brussels, Belgium
2. Prince Leopold Institute of Tropical Medicine, Department of Animal Health, Nationalestraat 155, B-2000 Antwerp, Belgium
3. Coordination Center for Veterinary Diagnostics, Veterinary and Agrochemical Research Center, Groeselenberg 99, B-1180 Uccle, Belgium
4. Veterinary Investigation Center, Allée des Artisans, 2, Cinagro-Biron, B-5590 Ciney, Belgium
5. Institute for Veterinary Inspection, rue de la Loi, 26, B-1000 Brussels, Belgium
6. Catholic University of Louvain, Unit of Industrial Toxicology, Clos Chapelle-aux-Champs 30-54, B-1200 Brussels, Belgium
7. Ministry of Small Enterprises, Traders and Agriculture, Quality of Raw Materials and the Plant Sector, World Trade Center III, Avenue Simon Bolivar 30, B-1000 Brussels, Belgium
8. Computerization Infocenter, World Trade Center III, Avenue Simon Bolivar 30, B-1000 Brussels, Belgium
9. Central Animal Health Organization, World Trade Center III, Avenue Simon Bolivar 30, B-1000 Brussels, Belgium

*Journal of Toxicology and Environmental Health*, 2002, 65, 1289-1305.

## Abstract

The methodology used to detect a PCB/dioxin contamination in the Belgian cattle population, that was not exposed to the PCB/dioxin incident in 1999, is presented. This population is directly or indirectly destined for human consumption. The methodology consisted in the systematic sampling of all calf-fattening stations and groups of cattle destined for export, and in the random sampling of slaughter cattle. This approach is compared to the method described in directive 96/23/CE from the European Council. When PCB concentrations exceeded the tolerance level of 0.2 µg/g body fat (seven congeners with numbers 28, 52, 101, 118, 138, 153 and 180), dioxins (seventeen 2,3,7,8-substituted congeners of PCDD and PCDF) were also determined. The prevalence of Belgian slaughter cattle with PCB concentrations above this cut-off was 0.3% (95% confidence interval: 0.01-1.50%). Results indicate that the incidence of contamination was minimal, with environmental origin and common in all industrial countries. The maximal potential exposure of an adult human consumer to dioxins through diet of bovine origin is estimated in two worst-case scenarios. The first one corresponds to the consumption of contaminated food products by a small number of consumers during a long period (local consumption) and the second simulates the consumption of contaminated products by a large number of consumers during a short period (supermarket purchase). The theoretical maximum daily intake of dioxins in adults was respectively 374 and 123 pg TEQ/day. The estimated maximum increase of dioxin body burden corresponds to 7 pg TEQ/g fat in the local consumption scheme and 0.07 pg TEQ/g fat in the supermarket consumption scheme.



## 1. Introduction

In Belgium, ingestion is responsible for 90% (Ansay, 1999; Maghin-Rogister *et al.*, 1999) to 95% (Cox, 1999) of the dioxin exposure in humans. Dioxin accumulation, based on consumption patterns in 1990 (Ministry of Public Health, Consumers Protection and Environment, 1990) and prevalence in Dutch food products is estimated to be 179 pg of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin equivalent (toxic equivalent quantity of TCDD, TEQ) per day (Cox, 1999). For an adult consumer of 60 kg this estimate corresponds to an average of 3 pg TEQ/kg body weight/day with 43% coming from beef and milk products (average of 77 pg TEQ/day). Foodstuffs of animal origin normally contribute about 80% of the overall exposure (European Commission, 2000a, 2000b), although no single food group emerges as principal contributor (Guo *et al.*, 2001). Contamination of food is primarily caused by the release of dioxins from various sources and subsequent accumulation in the food chain is due to the high affinity of dioxins for lipid-rich tissues (Matthews & Dedrick, 1984). Various effects have been reported in animals exposed to polychlorinated dibenzodioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) (Weber & Greim, 1997). Many of the toxic effects of dioxins were high dose effects (European Commission, 2000b). The most commonly reported pathologies are endometriosis, developmental neurobehavioral effects, developmental reproductive effects and immunotoxic effects (World Health Organization, 1998a; Kavlock *et al.*, 1996, Weber & Greim, 1997). Dioxins are carcinogenic in several animal species (Mann, 1997) and humans and increased risk of cancer has been demonstrated at exposure levels more than 100 times the normal intake of the general population (Steenland *et al.*, 1999). Dioxins are classed as human carcinogenic by the International Agency for Research in Cancer (McGregor *et al.*, 1998).

The half-life of 2,3,7,8-TCDD in adults has been estimated as 7 years (Flesch-Janys *et al.*, 1996; Pirkle *et al.*, 1989), 7.6 years during a 15-yr follow-up (Michalek *et al.* 1996) and 8.7 years during a 10-yr follow-up (Michalek & Tripathi, 1999) and four months (Ansay, 1999; Kreuzer *et al.*, 1997) to six months (Maghin-Rogister *et al.*, 1999) for infants. In cattle, a half-life of 41 days has been found for dairy cows (Jensen & Hummel, 1982) and 16.5 weeks for beef (Jensen *et al.*, 1981). Other studies have demonstrated that PCB elimination in milk in cattle and humans is proportional to the level of exposure, and in the case of cattle amounted to 11-12% of the daily dose consumed (Willet, 1975). Half-life increases higher up in food chain (Delaunois, 1998). Knowing that a period equivalent to 7 half-lives is required for elimination of 99% of a contaminant (Maghin-Rogister *et al.*, 1999), average periods of respectively 10 months for cows, 27 months for bulls and 50 years for humans are necessary.

During two exposure studies coordinated by the World Health Organization (WHO), dioxin concentrations in human milk observed in Belgium were among the highest in industrialized countries with mean values in the 3 areas studied ranging from 33.7 to 40.2 in 1986/87 and from 20.8 to 27.1 pg TEQ/g fat in 1992/93 (World Health Organization, 1996). In 1999-2000, another study was conducted in rural and industrialized areas involving 112 subjects (average age of 50 years) living in the central and southern parts of Belgium (Bernard & Fierens, personal communication). In this study, the dioxin body burden for the whole population averaged 30.2 pg TEQ/g fat (geometric mean) and ranged from 5.5 to 114.8 pg TEQ/g fat. The current Belgian results correspond to other European observations for subjects with the same average age: in Finland, 33 pg TEQ/g fat (Tuomista *et al.*, 1999) and in Germany, 21.9 pg TEQ/g fat in general population (Päpke, 1998) and 40.8 pg TEQ/g fat in rural areas (Ewers *et al.*, 1996). Taking into account the age differences, the results of dioxin measurements indicate that the dioxin body burden continued to decrease. According to the correlation between age and dioxins concentration in serum lipids (Bernard *et al.*, 2001), the decrease is estimated to average 10-15 pg TEQ/g fat over a period of 20 years. Using the available toxicological database on dioxins in 1998, the WHO established a tolerated daily intake (TDI) in humans between 1-4 pg TEQ/kg body weight/day (Van Leeuwen & Younes, 2000). This TDI is based on the range of lowest adverse effect level (LOAEL) of 14-37 pg TCDD/kg body weight/day and applying an uncertainty factor of 10 (World Health Organization, 1998a). The upper limit of the TDI should be considered as the maximum tolerable intake on a provisional basis. The mean intake of dioxins and related compounds from food was estimated between 2.2 and 2.4 pg TEQ/kg body weight/day for adults in the US (Schechter *et al.*, 2001).

In February 1999, a case of poisoning came to light in several industrial poultry farms in Belgium (Bernard *et al.*, 1999, 2002). The source of the contamination was recycled fat delivered to several feed producers between January 19 and 31, 1999. This paper presents the methodology used to detect possible PCB/dioxin contamination in that part of the Belgian cattle population, directly or indirectly destined for consumption and not exposed in the PCB/dioxin incident in 1999. It consisted of a systematic sampling of all calf fattening centers, systematic sampling of all lots of exported bovines, and a random sampling of slaughter cattle. This methodology is compared to the approach described in directive 96/23/CE of the European Council (European Commission, 1996). The maximum potential consumer exposure to dioxins through beef and dairy products is also estimated in two scenarios: local consumption and supermarket consumption.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Analysis of PCBs

This includes the determination of a set of 7 “indicator” PCBs (International Union of Pure and Applied Chemistry; IUPAC numbers 28, 52, 101, 118, 138, 153 and 180) and is expressed as the sum of these 7 marker congeners (in  $\mu\text{g/g}$  fat). For the sum of these congeners a provisional cut-off was pegged at 0.1  $\mu\text{g/g}$  milk fat and 0.2  $\mu\text{g/g}$  body fat (European Commission, 1999c). The procedures for the PCB analyses used by the different laboratories were described previously and a interlaboratory comparison program was organized to ensure the uniformity of the results obtained from the different participating laboratories. The between-laboratory coefficient of variation was estimated at 30-35% (Beernaert & De Poorter, 1999). All methods applied were based on gas chromatography (e.g. GC-ECD). The advantages of the dosage of PCBs compared to dioxins were a rapid test protocol and the fact that a larger number of laboratories could participate.

### 2.2. Analysis of PCDDs and PCDFs

When PCB concentrations exceeded the above cut-off values, dioxins were also determined. The procedures for PDDD and PCDF analyses used by a limited number of laboratories consisted in gas chromatography - high resolution mass spectrometry (GC-HRMS) after extraction of fat, purification and concentration of samples. The standard method included the determination of the seventeen 2, 3, 7, 8-substituted congeners. Determination of these congeners provides diagnostic information to evaluate the concentrations of the most toxic dioxins. The concentration in TEQ was obtained by multiplying the concentration for each congener (usually expressed in  $\text{pg/g}$  fat) by a toxic equivalency factor (I-TEF or WHO-TEF in this case). These procedures are described elsewhere (Van Den Berg *et al.*, 1998).

### 2.3. Systematic sampling of all calf fattening centers

All calf fattening centers were sampled (the sampling unit was the animal, the primary sampling cluster was defined as a group of animals with a common feed supplier, and the secondary cluster was the center). Three samples of 40 g fat, taken randomly from three animals per primary sampling unit, were pooled. All samples were analyzed for PCBs by SGS-Agrilab (accredited by Beltest - norm EN-45004 type A). The sum of the seven congeners was determined.

## **2.4. Systematic sampling of bovines before export**

Between August 2 and October 3, 1999, samples of all lots of bovines were tested at most 1 month before export, according to decision 99/449/EC as modified by decision 99/551/EC of the European Commission (European Commission, 1999a, 1999b). The epidemiological unit for this sampling is an exported lot of animals. When the number of animals in the lot was below 8, all animals were submitted to a sampling of 100 g fat. When the number of animals in a lot was between 8 and 500, a random sample of seven animals was tested. This sampling frame was designed to have a probability of 95% to detect contamination of 25% or more of the animals in a lot (the so-called quality level of 0.25 as demanded by Ministry of Public Health of Consumers Protection and Environment). In total of 3,409 samples were submitted by the Provincial Veterinary Laboratories (PVL) to PCB analysis in different private laboratories that were accredited by the Ministry of Agriculture. During this period the percentage of bovines exported for slaughter was 62% (August) and 39% (September). In case of a PCB concentration above the cut-off level, the lot in question was not exported, additional samples were collected and tested for dioxins, and an epidemiological, food and environmental inquiry was performed to determine the source of contamination.

## **2.5. Random sampling of slaughter cattle**

On a random day during the week of August 23 to 27, 1999, the resident veterinary officials in all cattle slaughterhouses sampled one bovine per herd presented for slaughter. Each sample consisted in 100 g of fat. A total of 1235 samples were collected. All samples were dispatched to and stocked at the PVL of Ciney. During the period in question about 17,000 bovines were slaughtered weekly in Belgium. A sensitivity and specificity of PCBs analysis of 100% was assumed, in the absence of actual values. The actual number of samples submitted to PCB analysis was calculated according to the modified formula from Cannon and Roe (1982) and Martins *et al.* (1987), using a confidence level of 95% and a 1% minimum detectable prevalence of PCB concentrations above cut-off. The required sample size was calculated as 299 and these 299 samples were taken randomly from the 1235 samples in stock, proportionally stratified by province and age group of the animals. All samples were analyzed for PCBs by SGS-Agrilab (accredited by Beltest - norm EN-45004 type A). The sum of the seven congeners was determined.

## 2.6. Collection of epidemiological, feed related and environmental data

A relational database, containing the following information, was used: sample identification, registration of herds and animals, listing of restricted herds, risk analysis, results of PCB or dioxin analysis and reports of visits. For all positive PCB results epidemiological, feed and environmental investigations were performed in the herds of origin. These investigations were based on a checklist and a standard report of visit.

## 2.7. Statistical analysis

The statistical analysis were carried out in Stata version 6 (StataCorp, 1999).

## 2.8. Estimation of the potential consumer exposure to dioxin of through beef and dairy products

Two scenarios were investigated. The first scenario simulated consumption at local level (either the producer or some local consumer). In this situation, the exposure to contamination is high, because the contaminated foodstuffs are consumed during a very long period by few people (i.e., high cumulative exposure level). Consumption of whole-milk products prevails in this situation (higher percentage of fat). The second scenario describes the situation when products are marketed through supermarkets and are consumed by a large number of consumers during a short period (i.e., low cumulative exposure level). In this case, half-skimmed milk and half-skimmed milk products are the rule. The raw data concerning consumption came from the available current reports (Van Hecke, 2000; Confédération Belge de l'Industrie Laitière, 1999; World Health Organization, 1998b). The concentrations of dioxins in fat from milk and meat were obtained respectively from the data of the General Food Inspection (58 tank truck samples from all provinces) and from results of the systematic sampling of all lots of bovines before export (31 positive individual samples). Calculation of the Theoretical Maximum Daily Intake (TMDI) of dioxins (pg TEQ/day) from single products of bovine origin in adult consumers of 60 kg are based on the following formula:

$$\text{TMDI} = \frac{\text{CCBO (g/day)} \cdot \% \text{ fat} \cdot 97.5 \text{ PDC (pg TEQ/g fat)}}{\text{body weight (kg)}}$$

where CCBO is consumption of commodities of bovine origin and PDC is percentile of dioxin concentration.

The evolution in time of the body burden are based on the following formula:

$$BB_t = 30.5 \cdot e^{-\lambda t} + \sum_{i=0}^{\min(t,C)} (d \cdot e^{-\lambda(t-i)})$$

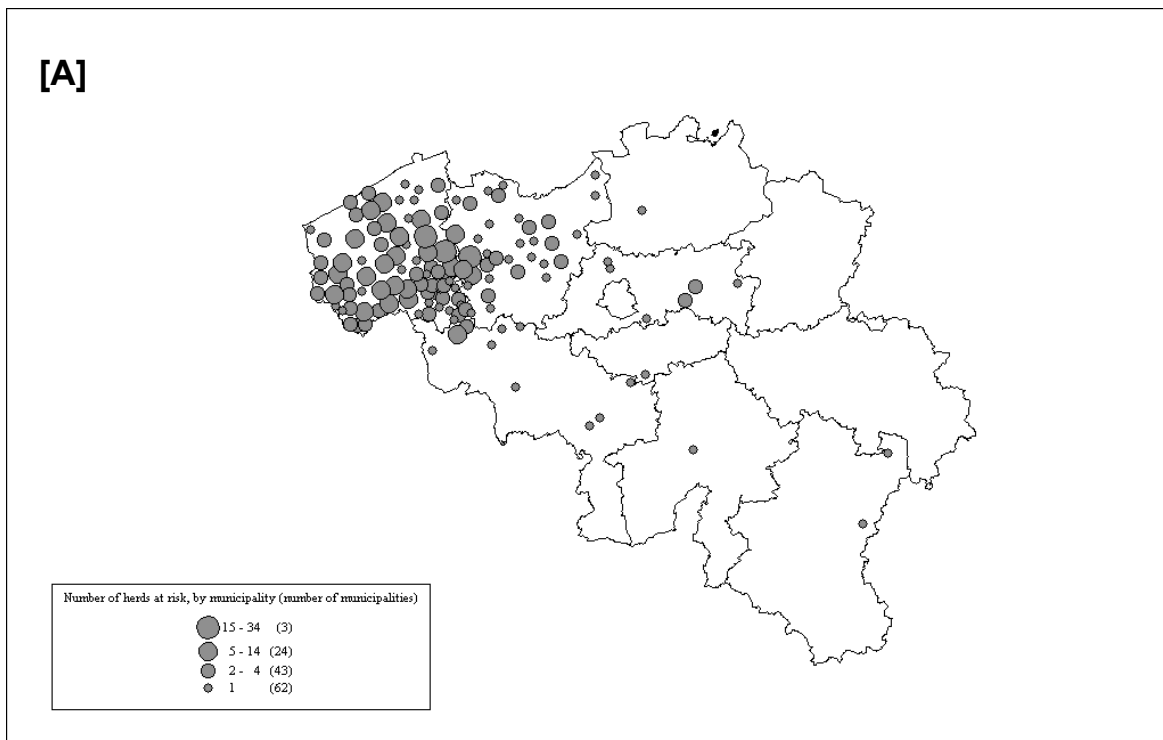
where BB is the body burden,  $\lambda$  is the exponential decay constant = 0.000049,  $t$  the time since start of exposure (days), C the length of exposure period, and  $d$  the daily intake.

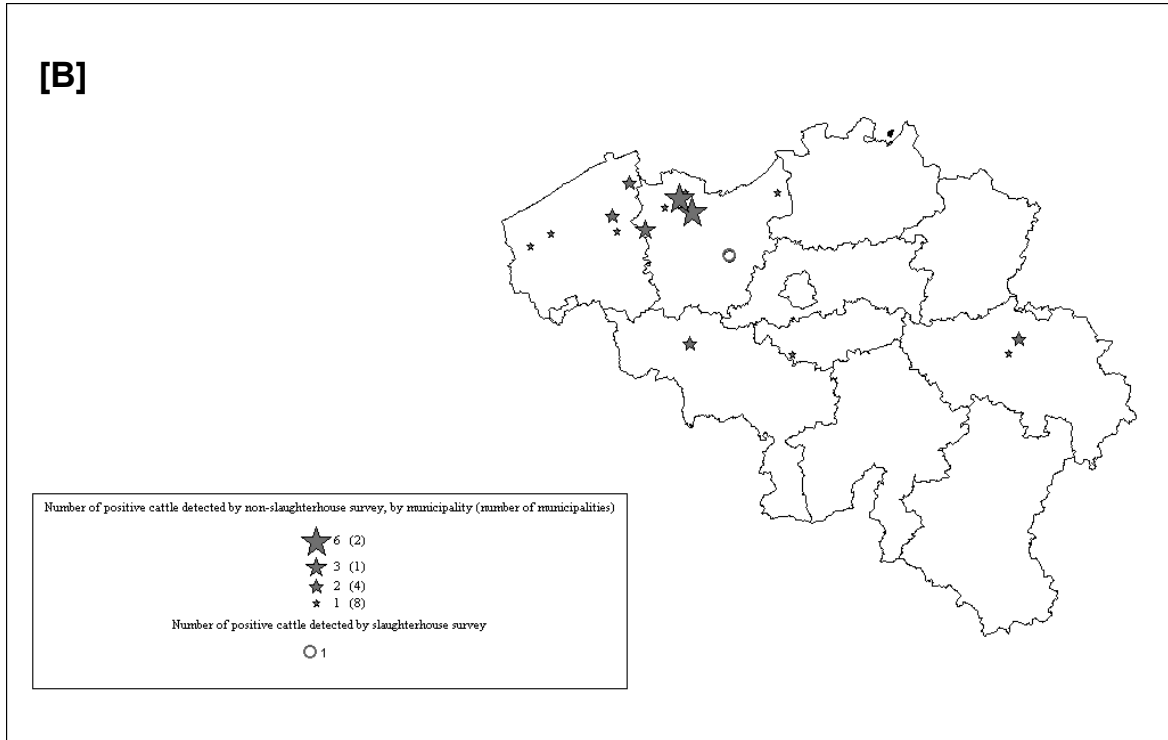
### 3. Results

#### 3.1. Bovine herds exposed to the PCB/dioxin incident in 1999

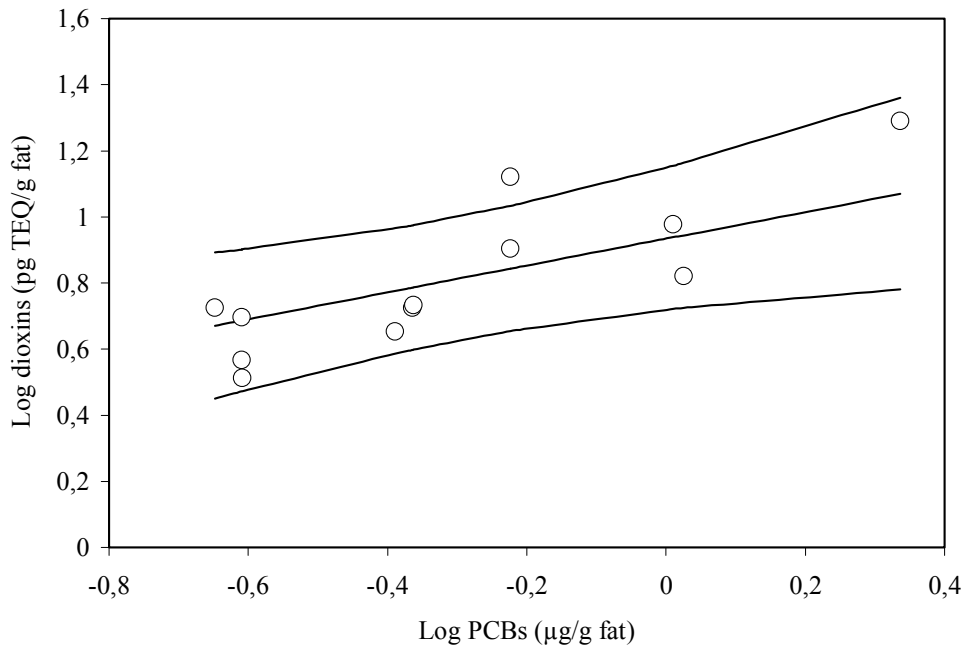
In the cattle sector, 409 herds were exposed to the risk of contaminated feed (0.81% of the Belgian cattle herds) (Figure 1a). These herds were temporarily blocked from all commercial transactions. This measure was lifted on the basis of the results of feed and epidemiological investigations, on the basis of PCB/dioxin analyses carried out on a representative sample of animal products originating from the concerned cattle herds (cut-off: 0.1 µg PCB/g milk fat, 0.2 µg PCB/g body fat, and/or 5 pg TEQ dioxin/g fat), or on the basis of stamping out and incineration of all cattle originating from the 6 herds with PCB/dioxin analyses results above the agreed cut-off. A significant correlation was observed between PCB and dioxin concentration in bovine fat ( $r = 0.842$ ;  $p = 0.0006$ , Figure 2).

Figure 1. Geographical location of cattle exposed to the PCB/dioxin incident in 1999 [A] and exposed to environmental contamination of feed [B].





**Figure 2. Correlation between concentration of PCBs and dioxins in cattle exposed to PCBs/dioxins during the incident in 1999. Dots, observed values; lines, upper limit 95% confidence interval of the prediction, predicted value and lower limit of the 95% confidence interval of the prediction.**





### 3.3. Systematic sampling of all calf-fattening centers

At the time of sampling, a total of 386 calf-fattening centers were active with an average of 450 calves per center. All samples tested negative (range: 0.01-0.04 µg PCB/g body fat), with the exception of one center which had an outlier of 0.277 µg PCB/g fat. Retesting of the same sample in another laboratory gave a result of 0.166 µg/g fat. An epidemiological, food and environmental inquiry was immediately carried out in that center and no risk factor could be identified. The center was supplied by two feed producers, one of which did receive fat from the specialized firm but not during the period of risk of contamination. A feed monitoring program performed at this producer yielded only negative results. In addition, extra samples from the center concerned as well as from the three herds where the calves were born tested negative.

### 3.4. Systematic sampling of all lots of bovines before export

Only 31 results with levels over 0.2 µg PCB/g body fat were observed (0.91%; 95% confidence interval: 0.62-1.28): 20 samples with levels between 0.2-0.5 µg/g fat (0.59%), 8 with levels between 0.5-1 µg/g fat (0.23%) and 3 with results equal to or above 1 µg/g fat (0.09%) (Figure 1b). These positive results were found in animals originating from 15 different herds. Three of the herds showed 9 bovines with results above 0.5 µg/g fat (including all results  $\geq 1$  µg PCBs/g fat, where the results of dioxin analysis were also above 5 pg TEQ/g fat). For these herds a purely environmental source of contamination was identified: ironworks and high-voltage transformers (Debongnie *et al.*, 2000). These herds were cleared by destruction of the animals and/or products (with fair compensation for the losses) followed by rehabilitation of the production site.

### 3.5. Random sampling of slaughter cattle

Only 1 out of 299 samples of body fat was found positive for PCBs: 0.837 µg/g body fat (Figure 1b). Thus, the estimated prevalence of PCBs above 0.2 µg PCBs/g body fat in Belgian slaughter cattle was 0.33% with an Enhanced Wald 95% confidence interval of 0.01% to 1.50%. The farm, where the animal in question had originated from received feed products from a feed producer that was not supplied with fat by the specialized firm. Feed quality monitoring of the feed producer yielded negative results for PCBs. The positive animal was a calf of 4 months of age, chronically infected with bovine viral diarrhea (BVD - debilitating infection, which reduces body weight and thus increases concentration of PCBs in remaining fat). In the herd of origin of this calf an epidemiological, digestive and environmental inquiry was immediately carried out and 4 additional samples of fat were analyzed for PCBs; results were negative. No source of contamination was found. The calf's mother, which was 6 yr old, had been culled

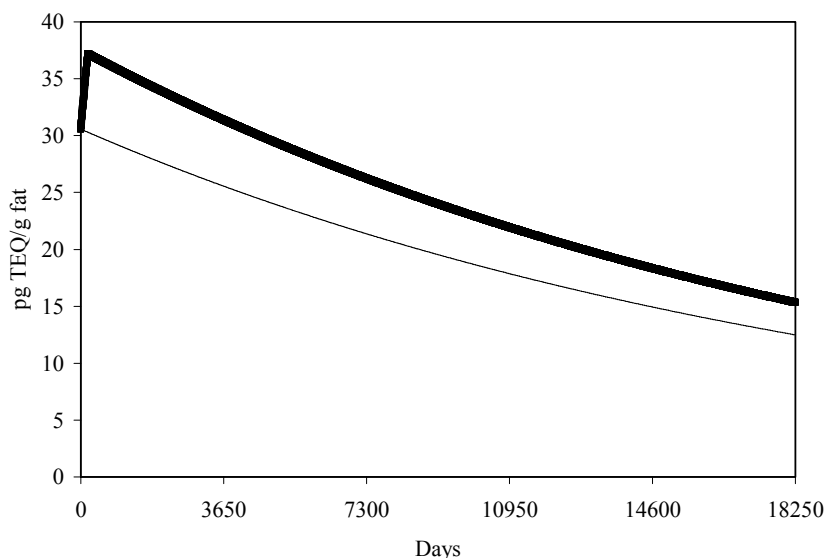
(BVD eradication program) and might have contaminated the calf. This cow was born in another farm, but this primary farm had been closed for 3 yr. In this farm a potential industrial source of contamination was identified.

### 3.6. Estimation of the potential exposure of consumers to dioxins through products of bovine origin

#### 3.6.1. Local consumption

An exposure period of 1 yr for meat products (3 frozen contaminated beef meals per week) and a period of 6 months for whole milk products (farm to consumer) were assumed. For bovine products, in view of the rapid clearance by lactating cows, it was assumed that the highest values found in culled cow meat were representative of the maximal levels attainable in dairy cows (8.41 pg TEQ/g fat), and thus in dairy products such as meat, milk, butter and cheese. Under these conditions, the TMDI of dioxins from products of bovine origin in adult humans is 374 pg TEQ/day (Table 1). With this level of exposure, an adult consumer of 60 kg experiences a maximum cumulative intake of 63,335 pg TEQ, observed after 6 months. According to the current Belgian data (Bernard & Fierens, personal communication), the increase dioxin body burden is respectively 7 pg TEQ/g fat after 6 months (maximum increase), 6 pg TEQ/g fat after 10 yr and 5 pg TEQ/g fat after 20 yr (Figure 3).

Figure 3. Evolution in time of body burden (pg TEQ/g fat) after dioxin contamination in two worst-case scenarios (local consumption = —, and supermarket purchase = —).



### 3.6.2. Supermarket consumption

Assuming an exposure period of 1 week for meat (3 beef meals per week) and half-skimmed milk products and that the highest values recorded in milk tanks is representative of the contamination, the TMDI of dioxins from single commodities of bovine origin in an adult human is 123 pg TEQ/g body fat (Table 1). After 1 week of exposure to milk and meat products the maximum cumulative intake is 644 pg TEQ. According to the current Belgian data (Bernard & Fierens, personal communication), the increase in dioxin body burden is respectively 0.07 pg TEQ/g fat after 1 week (maximum increase), 0.067 pg TEQ/g fat after 10 yr and 0.056 pg TEQ/g fat after 20 yr (Figure 3).

**Table 1. Simulated total dioxin intake in the case of local consumption (Loc) and supermarket distribution (Sup).**

	Consumption		% fat <sup>a</sup>		Fat intake (g/day)		Dioxin intake (pg TEQ/day) <sup>k</sup>	
	ml/day	g/day	Loc <sup>b</sup>	Sup <sup>c</sup>	Loc <sup>b</sup>	Sup <sup>c</sup>	Loc <sup>b</sup>	Sup <sup>c</sup>
Cattle milk	187.7 <sup>d</sup>	-	4.1 <sup>g</sup>	2.1	7.8	3.9	65.2	10.3
Cattle butter milk	5.2 <sup>d</sup>	-	0.4 <sup>h</sup>	0.4 <sup>h</sup>	0.0	0.0	0.2	0.1
Cattle chocolate milk	4.9 <sup>d</sup>	-	4.1 <sup>g</sup>	2.1	0.2	0.1	1.7	0.3
Yogurt of cow milk	25.2 <sup>d</sup>	-	4.1 <sup>g</sup>	2.1	1.0	0.5	8.8	1.4
Cow milk cream, fresh	6.0 <sup>d</sup>	-	40.0	20.0	2.4	1.2	20.3	3.2
Cow milk butter	-	9.6 <sup>d</sup>	85.0	85.0	8.2	8.2	68.5	21.6
Cow milk cheese	-	50.7 <sup>d</sup>	40.0	40.0	20.3	20.3	170.5	53.8
Cow milk cheese, melted	-	3.0 <sup>d</sup>	35.0	35.0	1.1	1.1	8.9	2.8
<i>Sub-total</i>					40.9	35.2	344.1	93.4
Cattle and veal meat	-	58.4 <sup>e</sup>	5.0 <sup>i</sup>	5.0	2.9	2.9	24.5	24.5
Edible cattle offal	-	6.0 <sup>f</sup>	10.0 <sup>j</sup>	10.0	0.6	0.6	5.05	5.1
<i>Sub-total</i>					3.5	3.5	29.5	29.6
<b>Total</b>					<b>44.4</b>	<b>38.7</b>	<b>373.6</b>	<b>123.0</b>

<sup>a</sup> based to necessary liters of whole milk with 3.91% fat for fabricate those products (Moniteur Belge 1996); <sup>b</sup> assuming whole milk and milk products ; <sup>c</sup> assuming half skimmed milk and products ; <sup>d</sup> Belgian consumption in 1998 (Confédération Belge de l'Industrie Laitière 1999) ; <sup>e</sup> Belgian consumption in 1998 (Van Hecke 2000); <sup>f</sup> regional diets (World Health Organization 1998b) ; <sup>g</sup> % fat is weighted mean of whole milk in year 1999 ; <sup>h</sup> assuming 0,4 % fat (Walstra & Jenness 1984) ; <sup>i</sup> assuming a 50% lost during cooking (Schechter *et al.* 1998) and 5 % fat in raw American filet (Absolonne 1995) ; <sup>j</sup> assuming 10 % fat in offal; range : 3 to 17 % fat (Absolonne 1995) ; <sup>k</sup> assuming a 97.5<sup>th</sup> percentile dioxin exposure level of 8.41 and 2.19 pg TEQ/ g fat for local and supermarket milk product consumption respectively and 8.41 pg for meat products and by-products

## 4. Discussion

The prevalence of PCB contamination (levels of 0.2 µg/g body fat and higher) in Belgian slaughter cattle was estimated at 0.33%. For comparison, the level for action recommended by the Food and Drug Administration for bovine and poultry meat is 3 µg/g fat for total PCBs (Boyer *et al.*, 1991), which corresponds to about 1 µg/g fat for the 7 PCB markers, a value 5 times higher than that adopted in Belgium (Bernard *et al.*, 2002). This study demonstrated that surveying the national slaughter cattle population within a short time is technically feasible under a joint multidisciplinary collaborative effort. The results of the systematic sampling surveys confirmed that the incidence of the PCB/dioxin contamination in cattle was low. This contamination resulted from environmental sources that are common in all industrialized countries (Debongnie *et al.*, 2000). The search for the source of contamination requires a multidisciplinary collaborative effort. The relevance of the current choice of seven congeners merits new consideration for the future.

The present results are objective data and were reported to the Standing Veterinary Committee to the European Commission. With this report the bovine sector was relieved from the application of decision 99/449/CE (European Commission, 1999a). The approach developed in the directive 96/23/CE (European Commission, 1996) is based mainly on a target sampling after a risk analysis of potential source of contamination in each member state. However, random sampling of slaughter cattle is indicated to estimate the PCB prevalence in an individual country, as this approach allows a comparison of prevalence levels in different countries. The validation of new tests in live animals, such as dosage of activity of Ah-receptor by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), may be considered for a detection system and may offer an opportunity for future population studies (Johnson & Van Emon, 1994); for example, in humans, plasmatic lipid PCB/dioxin levels were found to reflect body lipid levels (Ewers *et al.*, 1996).

Two scenarios were developed to estimate maximal potential exposure of consumers to dioxins through beef and dairy products: local consumption and supermarket consumption, both using worst-case assumptions. In the case of local consumption, the TMDI of dioxins is 374 pg TEQ/day for an adult. According to current Belgian dioxin data (Bernard *et al.*, 2001b; Bernard & Fierens, personal communication), a simulation with this level of TMDI results in a maximum increase in body burden of 7 pg TEQ/g fat (total body burden: 37 pg TEQ/g fat). In a 40-to-60-year old person the plasmatic lipid concentration of dioxins are in steady state (Kreuzer *et al.*, 1997). The body burden of dioxins ranged from 7 to 20 pg TEQ/g serum lipids in general

population and attained 60 pg TEQ/g serum lipids in a population with high fish intake (Ansay, 1999) and no clear evidence of an increased risk of cancer was found in the latter (Kiviranta *et al.*, 2000). It must also be noted that fish usually does not constitute a principal food item (Guo *et al.*, 2001). In our estimation, a selection bias is introduced, because for the meat products the 17 dioxins congeners were analyzed only if the PCB result was positive. This in fact constitutes the major drawback for using PCB monitoring as a surrogate for dioxin monitoring. Furthermore, a half-life of 7 years for dioxins was assumed, but this will vary from 3 to 19.6 years as a function of the congener considered and this information is not available for every congener (Flesch-Janys *et al.*, 1996, Michalek & Tripathi, 1999). According to the analysis by Cox (1999) in a normal situation, the TMDI obtained in the simulation corresponds to a fivefold increase of the daily intake originating from foodstuffs of bovine origin. Assuming that other possible ingestion sources of dioxins were constant, the total cumulative daily intake during this contamination in the worst-case scenario is 476 pg TEQ (i.e., 8 pg TEQ/kg/day), which is still below the uncorrected value of 14 pg TEQ/kg/day (lower limit of TDI, World Health Organization, 1998a). Therefore a possible health effect in pregnant women, school children and infants cannot be excluded. However, in the last sub-population the half-life is 4 months (Ansay, 1999; Kreuzer *et al.*, 1997) to six months (Maghin-Rogister *et al.*, 1999). In the case of supermarket consumption, the TMDI of dioxins from single commodities of bovine origin in adult humans was 123 pg TEQ/g body fat. According to the current Belgian dioxin data (Bernard & Fierens, personal communication), this results in a maximum increase in body burden of 0.07 pg TEQ/g fat after 1 week (total body burden: 30.3 pg TEQ/g fat). This increase is insignificant for adverse health effects. Taking into account Cox (1999) data (dioxin accumulation of 179 pg TEQ/day with 43% coming from beef and milk products), the total cumulative daily intake during this contamination was 225 pg TEQ. With this result the upper limit of WHO-TDI was reached. A cattle fat concentration of 10% (cooking meat) was assumed for the two scenarios with a loss of 50 % during cooking (Bernard *et al.*, 2002; Schechter *et al.*, 1998) together with a frequent consumption of raw minced meat with a fat concentration of 5 % (Absolonne, 1995). It was also assumed that foodstuffs were of Belgian origin. This assumption was justified because the rate of provisioning was higher than 100% for all milk and meat products with the exception of cheese (for which the principal countries of origin were France and the Netherlands).

Several problems were observed when estimating the exposure to PCB/dioxins. Firstly, there was the limit of determination (LOD) of PCBs or dioxins. For PCB/dioxins, the interpretation of a result above the cut-off depends on the individual country. For example, Belgium, France and the Netherlands apply the “lower bound principle” (if the dosage of a congener is lower than LOD, the result is negative); United Kingdom applies the “high bound principle” (if the dosage of a congener is lower than LOD, the result is equal to LOD of this congener) and Italy applies the

“half weight bound principle” (if the dosage of a congener is lower than LOD, the result is equal to half the LOD of this congener). Because of the different interpretations, the estimated mean exposure is not the same in the different countries. The European Commission has proposed the UK method for all its member states in accordance to the principle of maximum precaution (Ministry of Small Enterprises, Trade and Agriculture, 1999). The choice of the 97.5<sup>th</sup> percentile of the contamination level, used in the current study, is another possibility to standardize the level of critical exposure. By analogy, the study for pesticide residues recommends the use of the recorded 97.5<sup>th</sup> percentile consumption (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1995), but these data were not available for the 1999 incident. A second problem lies in the necessity to obtain recent data on quantities of each foodstuff consumed by adults, schoolchildren and infants. It is therefore proposed to carry out a longitudinal study to determine the consumption and its distribution in the population. The third problem is to obtain representative data of PCB/dioxin contamination in food and food products. This problem is more acute because the primary origin of these food products is not always known. The solution to this problem is a better tracing of food products and a better import control.

## **5. Acknowledgements**

The authors' thanks are due first to farmers who took part in the investigations. They also acknowledge the help from the private veterinarians, municipality authorities, staff of all provincial veterinary laboratories, private laboratories for PCBs and dioxins diagnosis, National Association of Animal Health, Center for Coordination of Veterinary Diagnostics, Ministry of Small Enterprises, Traders and Agriculture and Ministry of Protection of Consumers, Public Health and Environment that were participated in the survey. The authors also thank the two anonymous referees, whose constructive comments added to the value of this paper.

## 6. References

- ABSOLONNE J. La valeur nutritive de la viande. *Elevages Belges*, 1995, **12**, 9-16.
- ANSAY M. Les dioxins? Quels risques? *Ann. Méd. Vét.*, 1999, **143**, 365-378.
- BEERNAERT H., DE POORTER G. Intercomparison study of PCBs in feedstuffs, animal fat and foodstuffs. Brussels: Federal Ministry of Public Health and Federal Ministry of Agriculture, 1999, 1-15.
- BERNARD A., HERMANS C., BROECKAERT F., DE POORTER G., DE COCK A., HOUINS G. Food contamination by PCBs and dioxins. *Nature*, 1999, **401**, 231-232.
- BERNARD A., FIERENS S., MAIRESSE H., HERMANS C., BROECKAERT F., FOCANT J-F., DEPAUW E. Incinérateurs, crise dioxine et risques sanitaires pour la population belge. *Bulletins de la Classe de l'Académie Royale des Sciences*, 2001, **13**, 103-117.
- BERNARD A., BROECKAERT F., DE POORTER G., DE COCK A., HERMANS C., SAEGERMAN C., HALLET L., HOUINS G. The Belgian PCB/dioxin incident: analysis of the food chain contamination and health risk evaluation. *Environ. Res.*, 2002, **88**, 1-18.
- BOYER I.J., KOKOSKI C.J., BOLGER P.M. Role of FDA in establishing tolerance levels for dioxin and PCBs in aquatic organisms. *J. Toxicol. Environ. Health*, 1991, **33**, 93-101.
- CANNON R.M., ROE R.T. Livestock disease surveys. A field manual for veterinarians. Bureau of rural science, Department of primary industry, Canberra, Australian Government Publishing Service, 1982, 1-35.
- CONFEDERATION BELGE DE L'INDUSTRIE LAITIERE. Situation économique dans le secteur laitier en 1998. Perspectives pour 1999, 1999, 1-48.
- COX D. Achtergronden puntblootstelling van de Belgische bevolking aan dioxins. Thesis voorgelegd in het raam van het GGS milieudeskundige, Free University of Brussels, 1999.
- DEBONGNIE P., HALLAUX B., ETIENNE F., PUSSEMIER L. Environmental PCB contaminations. In Proceedings of the 8th annual meeting of the Flemish society for veterinary epidemiology and economics, held on 26 October 2000 in Brussels, Belgium, 2000, 72-73.
- DELAUNOIS A. Le rôle du médecin vétérinaire dans l'évaluation du risque toxicologique. *Ann. Méd. Vét.*, 1998, **142**, 307-317.



EUROPEAN COMMISSION. Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animals products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/ECC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. *Official Journal of the European Communities*, 1996, **L 125**, 10-32.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Decision 1999/449/EC of 9 July 1999 on protective measures with regard to contamination by dioxins of certain products of animal origin intended for human or animal consumption. *Official Journal of the European Communities*, 1999a, **L 175**, 70-82.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Decision 1999/551/EC of 6 August 1999 amending Decision 1999/449/EC on protective measures with regard to contamination by dioxins of certain products of animal origin intended for human or animal consumption. *Official Journal of the European Communities*, 1999b, **L 209**, 42-49.

EUROPEAN COMMISSION. La contamination d'aliments pour animaux par les dioxines. Rapport de la Délégation Belge sur le secteur bovin. Comité vétérinaire permanent du 21-22 septembre 1999, Bruxelles, 1999c, 1-65.

EUROPEAN COMMISSION. Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the dioxin contamination of feeding stuffs and their contribution to the contamination of food of animal origin. Brussels: Health and Consumer Protection Directorate-General 6 November 2000, 2000a, 105 pages.

EUROPEAN COMMISSION. Opinion of the Scientific Committee on Food on the risk assessment of dioxins and dioxin-like PCBs in food. Brussels: Health and Consumer Protection Directorate-General Document SCF/CS/CNTM/DIOXIN/8, adopted on 22 November 2000, 2000b, 115 pages.

EWERS U., WITTSIEPE J., SCHREY P., SELENKA F. Levels of PCDD/PCDF in blood fat as indices of the PCDD/PCDF body burden in humans. *Toxicol. Lett.*, 1996, **1-3**, 327-334.

FLESCHE-JANYS D., BECHER H., GUNN P., JUNG D., KONIETZKO J., MANZ A., PAPKE O. Elimination of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in occupationally exposed persons. *J. Toxicol. Environ. Health*, 1996, **47**, 363-378.

GUO X., LONGNECKER M.P., MICHALEK J.E. Relation of serum tetrachlorodibenzo-p-dioxin concentration to diet among veterans in the Air Force Health Study with background-level exposure. *J. Toxicol. Environ. Health*, 2001, **63**, 159-172.

JENSEN D.J., HUMMEL R.A., MAHLE N.H., KOCHER C.W., HIGGINS H.S. A residue study on beef cattle consuming 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J. Agric. Food Chem.*, 1981, **29**, 265-268.

JENSEN D.J., HUMMEL R.A. Secretion of TCDD in milk and cream following the feeding of TCDD to lactating dairy cows. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1982, **29**, 440-446.

JOHNSON J.C., VAN EMON J.M. Development and evaluation of a quantitative enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for polychlorinated biphenyls. EPA Document EPA/600/SR-94/112, 1994, 5 pages.

KAVLOCK R.J., DASTON G.P., DE ROSA C., FENNER-CRISP P., GRAY L.E., KAATTARI S., LUCIER G., LUSTER M., MAC M.J., MACZKA C., MILLER R., MOORE J., ROLLAND R., SCOTT G., SHEEHAN D.M., SINKS T., TILSON H.A. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the US EPA-sponsored workshop. *Environ. Health. Persp.*, 1996, **104**, 715-810.

KIVIRANTA H., VARTIAINEN T., VERTA M., TUOMISTO J.T., TUOMISTO J. High fish-specific dioxin concentrations in Finland. *Lancet*, 2000, **355**, 1883-1885.

KREUZER P.E., CSANADY G.A, BAUR C., KESSLER W., PAPKE O., GREIM H., FILSER J.G. 2,3,7,8- Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and congeners in infants. A toxicokinetic model of human lifetime body burden by TCDD with special emphasis on its uptake by nutrition. *Arch. Toxicol.*, 1997, **71**, 383-400.

MAGHIN-ROGISTER G., DELAUNOIS A., DE PAUW E., GUSTIN P. La pollution de la chaîne alimentaire par la dioxine. *Ann. Méd. Vét.*, 1999, **143**, 379-392.

MANN P.C. Selected lesions of dioxins in laboratory rodents. *Toxicol. Pathol.*, 1997, **25**, 72-79.

MARTINS S.W., MEEK A.H., WILLEBERG P. *Veterinary Epidemiology: Principles and Methods*, Ames, Iowa State University Press, 1987, 343 pages.

MATTHEWS H.B., DEDRICK R.L. Pharmacokinetics of PCBs. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1984, **24**, 85-103.

MCGREGOR D.B., PARTENSKY C., WILBOURN J., RICE J.M. An IARC evaluation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans as risk factors in human carcinogenesis, *Environ. Health Perspect.*, 1988, **106**, 755-760.

MICHALEK J.E., PIRKLE J.L., CAUDILL S.P., TRIPATHI R.C, PATTERSON D.G., NEEDHAM L.L. Pharmacokinetics of TCDD in veterans of Operation Ranch Hand: 10-year follow-up. *J. Toxicol. Environ. Health*, 1996, **47**, 209-220.

MICHALEK J.E., TRIPATHI R.C. Pharmacokinetics of TCDD in veterans of Operation Ranch Hand: 15-year follow-up. *J. Toxicol. Environ. Health*, 1999, **57**, 369-378.

MINISTRY OF PUBLIC HEALTH. Consumers Protection and Environment. Annex 2 of the Royal Decree of 25 April 1990, Moniteur belge, Brussels, Belgium, July 18, 1990.

MINISTRY OF AGRICULTURE. Fisheries and Food. Pesticide Safety Directorate. UK methods for the estimation of dietary intakes of pesticide residues, London, United Kingdom, 1995, 1-20.

MINISTRY OF SMALL ENTERPRISES, TRADE AND AGRICULTURE. Rapport relatif aux normes PCBs dans les substances destinées à l'alimentation animale, Brussels, Belgium, 1999, 1-4.

MONITEUR BELGE. Royal Decree of 2 October 1996 concerning the application of supplementary taking in the milk and milk products sector, Moniteur belge, Brussels, Belgium, October 22, 1996.

PÄPKE O. PCDD/PCDF : human background data for Germany, a 10-year experience. *Environ. Health Perspect.*, 1998, **106**, 723-731.

PIRKLE J.L., WOLFE X.H., PATTERSON D.G., NEEDHAM L.L., MICHALEK J.E., MINER J.C., PETERSON M.R. Estimates of the half-life of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Vietnam Veterans of Operation. *J. Toxicol. Environ. Health*, 1989, **27**, 165-171.

SCHECTER A., DELLARCO M., PÄPKE O., OLSON J. A comparison of dioxins, dibenzofurans and coplanar PCBs in uncooked and broiled ground beef, catfish and bacon. *Chemosphere*, 1998, **37**, 1723-1730.

SCHECTER A., CRAMER P., BOGGESS K., STANLEY J., PÄPKE O., OLSON J., SILVER A., SCHMITZ M. Intake of dioxins and related compounds from food in the U.S. population. *J. Toxicol. Environ. Health*, 2001, **63**, 1-18.

STATA CORP. *Stata Statistical Software. Release 6.0*. College Station, TX : Stata Corporation, 1999.

STEENLAND K., PIACITELLI L., DEDDENS J., FINGERHUT M., CHANG L. Cancer, heart disease, and diabetes in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1999, **91**, 779-786.

TUOMISTA J., VARTIAINEN T., TUOMISTO J.T. Synopsis on dioxins and PCBs. Kuopio, Publication of the National Public Health Institute of Finland, 1999.

VAN DEN BERG M., BIRNBAUM L., BOSVELD A.T.C., BRUNSTROM B., COOK P., FEELEY M., GIESY J.P., HANBERG A., HASEGAWA R., KENNEDY S.W., KUBIAK T., LARSEN J.C., VAN LEEUWEN F.X., LIEM A.K., NOLT C., PETERSON R.E., POELLINGER L., SAFE S., SCHRENK D., TILLIT D., TYSKLIND M., YOUNES M., WAERN F., ZACHAREWSKI T. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect*, 1998, **106**, 775-792.

VAN HECKE A. *Agriculture Info 21*. Brussels, Agrinfo Edition, 2000.

VAN LEEUWEN F.X.R., YOUNES M.M. Consultation on assessment of the health risk of dioxins : re-evaluation of the tolerable daily intake (TDI). Executive summary. *Food Addit. Contamin.*, 2000, **17**, 223-240.

WALSTRA P., JENNESS R. Dairy Chemistry and Physics 1-77. New York: Wiley-Interscience Publication, 1984.

WEBER L.W.D., GREIM H. The toxicity of brominated and mixed-halogenated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans: an overview. *J. Toxicol. Environ. Health*, 1997, **50**, 195-215.

WILLET. L.B. Excretory behavior of polychlorinated biphenyls in lactating cows fed normal and thyroprotein containing rations. Abstracts of Papers to be presented at the Seventh Annual Meeting of the American Dairy Science Association. *J. Dairy Sci.*, 1975, **58**, 765.

WORLD HEALTH ORGANISATION. Levels of PCBs, PCDDs and PCDFs in human milk. Environmental Health in Europe n° 3. Bilthoven: WHO European Centre For Environment and Health, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Executive summary. Assessment of health risk of dioxins: re-evaluation of the tolerable daily intake, 1998a, 1-19.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food safety issues. Gems/food regional diets. Document WHO/FSF/FOS/98.3, 1998b, 1-18.

## **Chapitre 5**

### **Etude de la disparition d'un événement rare**

#### **L'éradication de la brucellose bovine couplée à la mise en évidence des réactions sérologiques faussement positives**

*About brucellosis:*

*« The diversity of serological tests available reflects the inherent difficulties of serological diagnosis, and in some cases it would be more profitable to make better use of existing procedures than to continue to develop new ones »*

*Chappel R.J., 1989*

## Préambule

Les tests utilisables en vue du diagnostic d'une maladie ressortent des acquis de la compréhension de la réponse immunitaire spécifique. Ils doivent répondre à un certain nombre de critères qui peuvent être hiérarchisés de la façon suivante : être sensibles (dépister le maximum d'animaux infectés), être spécifiques (dépister seulement les animaux infectés) et être d'un prix de revient tel qu'ils soient compatibles avec les nécessités d'une intervention massive et répétée dans le temps. Dans le cas particulier des pays en développement, un test ne nécessitant pas ou peu d'infrastructures de laboratoire s'avère d'une grande utilité.

Dans les années 1990, le taux de prévalence de la brucellose bovine était très faible en Belgique, sans que la brucellose bovine ne soit éradiquée pour autant. Cette situation épidémiologique a permis de mettre en évidence l'apparition de « réactions sérologiques faussement positives » (RSFP) dans les tests de détection de la brucellose chez les bovins (Saegerman et Pelzer, 1992 ; Dufey, 1992 ; Weynants *et al.*, 1996; Saegerman *et al.*, 1997). L'étiologie la plus probable présidant à ce phénomène (sans être vraisemblablement unique) est une infection à *Yersinia enterocolitica* O:9 (Weynants *et al.*, 1996; Saegerman *et al.*, 1997). Dans ce contexte, la valeur prédictive d'un résultat positif était très faible (confiance que l'on peut accorder dans le résultat positif d'un test de diagnostic). Cependant, débusquer les derniers animaux infectés et, en particulier les animaux infectés latents (animaux classifiés comme négatifs par les tests sérologiques classiques) restait une nécessité absolue. Dès lors, de nouveaux outils de diagnostic devaient être développés et évalués en vue de pouvoir dépister un faible nombre d'animaux infectés par *Brucella abortus* et de les différencier, sans ambiguïté, d'animaux infectés par *Yersinia enterocolitica* O:9.

Notre travail a consisté au développement, à la validation et à l'évaluation, en conditions expérimentale et de terrain, de trois tests de mesure de l'immunité à médiation humorale, hautement sensibles, ciblant la détection des isotopes IgG<sub>1</sub> et/ou d'IgG<sub>2</sub> [tests i-ELISAs (article 5)] et d'un test de mesure de l'immunité à médiation cellulaire, hautement spécifique [test cutané au brucellergène (article 6)].

Depuis que la Belgique a été reconnue officiellement indemne de brucellose bovine le 29 juin 2003 (décision 467/2003/CE ; Anonyme, 2003), la stratégie de testage repose toujours sur les outils développés dans le cadre de cette thèse.

## **Article 5**

**Evaluation de trois tests ELISAs indirects pour sérum utilisant des anticorps monoclonaux et la protéine G comme conjugué couplé à la peroxydase pour le diagnostic de la brucellose bovine**



## **Evaluation of three serum i-ELISAs using monoclonal antibodies and protein G as peroxidase conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis**

C. Saegerman<sup>1</sup>, L. De Waele<sup>2</sup>, D. Gilson<sup>2</sup>, J. Godfroid<sup>3</sup>, P. Thiange<sup>4</sup>, B. Limbourg<sup>4†</sup>,  
Vo T.K.-O.<sup>2</sup>, J. Limet<sup>2</sup>, J-J. Letesson<sup>2</sup>, D. Berkvens<sup>5</sup>

1. Federal Agency for the Safety of the Food Chain, Administration of Control Policy, Secretariat of the Scientific Committee, Word Trade Centre III, avenue Simon Bolivar 30, B-1000 Bruxelles, Belgium
2. University of Namur, Faculty of Veterinary Medicine, URBM, rue de Bruxelles 61, 5000 Namur, Belgium
3. Veterinary and Agrochemical Research Centre, Groeselenberg 99, 1180 Uccle, Belgium
4. Veterinary Investigation Centre, Allée des Artisans 2, Cinagro-Biron, 5590 Ciney, Belgium
5. Prince Leopold Institute of Tropical Medicine, Department of Animal Health, Nationalestraat 155, 2000 Antwerpen, Belgium

† This paper is dedicated to the memory of Dr. Bernard Limbourg, who was the first to isolate *Y. enterocolitica* O:9 in Belgian cattle in 1990.

***Veterinary Microbiology*, 2004, 100, 91-105.**

## Résumé

Trois tests ELISAs indirects utilisant le lipopolysaccharide, le composant immunologique dominant de *Brucella abortus*, ont été développés avec trois conjugués différents : les anticorps monoclonaux 1C8 (anti-IgG1 bovine) et 3H3 (essentiellement spécifique de l'IgG2 bovine mais qui réagit également avec l'IgG1) et la protéine G (qui réagit avec les deux sous-classes d'IgG). En utilisant une valeur seuil de 2,5 U/ml, le test ELISA avec le conjugué 3H3 avait une spécificité (IC 95% : 98,32-99,63) qui était significativement plus élevée que le même test avec le 1C8 (IC 95% : 96,08-98,26) ou la protéine G (IC 95% : 95,83-98,09%). Dans des régions où les réactions sérologiques faussement positives (RSFP) étaient fréquentes, la spécificité des tests ELISAs indirects diminuait significativement. La spécificité des tests ELISAs indirects augmentait avec l'âge des animaux testés quelque soit le conjugué. La spécificité des tests ELISAs indirects et des tests traditionnels a aussi été examinée en utilisant des séras provenant d'animaux infectés par voie orale avec des bactéries qui présentaient un LPS similaire à celui de *Brucella*. Il est apparu que les infections à *Yersinia enterocolitica* O:9, *Xanthomonas maltophilia* et *Salmonella urbana* induisaient des RSFP dans les tests ELISAs indirects comme dans les tests traditionnels mais le test avec le 3H3 induisait significativement moins de RSFP que les tests avec le 1C8 et la protéine G. Les tests ELISAs indirects étaient les plus sensibles, permettant une détection précoce et étaient plus persistants que les tests sérologiques traditionnels tant chez des animaux infectés expérimentalement que naturellement par *Brucella*. Le suivi hebdomadaire par un test ELISA indirect de génisses gestantes infectées expérimentalement (préalablement vaccinées ou non) a permis de prédire l'avortement. De plus, le test avec le 1C8 a montré des titres significativement plus élevés quelque soit le jour après l'infection et le statut vaccinal des animaux. L'exactitude du test pourrait être améliorée par l'utilisation d'information additionnelle (par exemple : l'âge des animaux ou le conjugué utilisé) et la sélection de seuils de positivité appropriés sur base de la situation épidémiologique qui prévaut. Les tests ELISAs indirects apparaissent comme un choix approprié pour maintenir le statut officiellement indemne de brucellose du fait de leur sensibilité, leur détection précoce et leur longue persistance et, pour les mêmes raisons, semble être d'une valeur particulière pour détecter des animaux porteurs latents (animaux classifiés comme négatifs par les tests sérologiques classiques) parmi les animaux importés.

## Abstract

Three i-ELISAs using LPS, the immunodominant component of *Brucella abortus*, were developed with three different conjugates: monoclonal antibodies 1C8 (anti-bovine IgG<sub>1</sub>) and 3H3 (mainly specific for IgG<sub>2</sub> but also reacting with IgG<sub>1</sub>) and protein G (reacts with both IgG subclasses). Using a cut-off value of 2.5 U/ml, the i-ELISA with 3H3 as conjugate had a specificity (95% CI: 98.32 – 99.63%) that was significantly higher than the same assay with 1C8 (95% CI: 96.08 – 98.26%) or PG (95% CI: 95.83 – 98.09%). In areas where false positive serological reactions (FPSR) were common, the specificity of the i-ELISAs decreased significantly. The specificity of the i-ELISAs increased with the age of the animals tested, irrespective of the conjugate. The specificity of the i-ELISAs and traditional tests was also examined using sera from animals infected per os with bacteria bearing LPS similar to the *Brucella* LPS. It appeared that *Yersinia enterocolitica* O:9, *Xantomonas maltophilia* and *Salmonella urbana* infections induced FPSR both in the i-ELISAs and in the traditional tests, but the 3H3 assay was significantly less prone to produce false positive reactions than the 1C8 and PG assays. The i-ELISAs were more sensitive, allowed an earlier detection and were more persistent than the traditional serological tests both in experimentally and naturally *Brucella*-infected animals. Weekly i-ELISA monitoring of experimentally infected pregnant heifers (previously vaccinated or not) allowed a prediction of abortion. Furthermore, the 1C8 assay showed significantly higher titres irrespective of day post-infection and vaccination status. The accuracy of the assay could be improved by making use of additional information (e.g. animal age or conjugate) and by selecting appropriate cut-off points on the basis of the prevailing epidemiological situation. The i-ELISAs appear an appropriate choice in order to maintain an official brucellosis-free status because of their sensitivity, early detection and long persistence and, for the same reasons, seem especially valuable for the detection of latent carriers (i.e. animals classified negative by classical serological tests) among imported animals.

## 1. Introduction

Detection of anti-*Brucella* antibodies is a useful method for bovine brucellosis diagnosis in many countries in the final phase of an eradication program and it is still used for monitoring when they were certified officially free of brucellosis. The most commonly used tests include agglutination and complement fixation assays performed in serial or parallel testing strategies (Fensterbank, 1986; Saravi *et al.*, 1995). The slow agglutination test has for example shown its efficacy in several countries now declared officially free of brucellosis (Fensterbank, 1986; Emmerzaal, 2002; Anonymous, 2003). The results, obtained when only one serological test is used, are not always easy to interpret and a combination of several tests is often required to ensure effective diagnosis of brucellosis (Fensterbank, 1986; Dohoo *et al.*, 1986; Rooney, 1993; Saegerman *et al.*, 1999). The smooth lipopolysaccharide (S-LPS) is the immunodominant component of *Brucella* (Cherwonogrodzky *et al.*, 1990) and LPS antibodies are implicated in all traditional tests used for brucellosis diagnosis (FAO/WHO Expert Committee, 1986; MacMillan, 1990). The various traditional tests detect one or more categories of immunoglobulines (Levieux, 1974; FAO/WHO Expert Committee, 1986; MacMillan, 1990; Garin-Bastuji, 1993; Nielsen, 2002). IgM antibodies are the least specific antibodies but EDTA eliminates about 75-80% of the non-specific reactions (Scheibner, 1976; Nielsen *et al.*, 1979; Trap *et al.*, 1985) resulting in a considerably more specific agglutination in *Brucella abortus* infections (Garin *et al.*, 1985).

Total IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2</sub> serum titres are roughly equal and are usually high in adult ruminants, despite considerable variation depending on genetic, pathological and physiological factors (e.g. IgG<sub>1</sub> titres are lowered immediately before and after parturition) (Levieux, 1990). The half-life of IgG is longer than that of IgA and IgM and values of, respectively, 14 days and 20 days have been obtained for IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2</sub> (Levieux, 1990). The half-life of total IgG increases with increasing serum titres, contrary to what is observed for IgA and IgM (Fougeron et Bazin, 1990). The total concentration of IgG<sub>2</sub> increases with age. In case of *Brucella* infection, the concentration of anti-*Brucella* total IgG<sub>2</sub> increases with the level of antigen exposure (FAO/WHO Expert Committee, 1986). Thus, the monitoring of IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2</sub> anti-*Brucella* antibody levels is relevant for the detection of *Brucella*-infected cattle (Lawman *et al.*, 1986; Hall *et al.*, 1988). The i-ELISAs with purified S-LPS from *Brucella* were developed to assay antibodies in bovine serum and milk (i.e. Kerkhofs *et al.*, 1990; Nielsen *et al.*, 1996, 2002; Vanzini *et al.*, 1998, 2001; Samartino *et al.*, 1999; Emmerzaal *et al.*, 2002). In milk, the concentration of IgG<sub>1</sub> is 10-100 fold the concentration of IgG<sub>2</sub> (Levieux, 1990; Naessens and Godderis, 1998), hence the superiority of the 1C8 monoclonal antibody (anti-bovine IgG<sub>1</sub> MAAb)

with respect to the 3H3 anti-bovine IgG<sub>2</sub> MAb (which slightly cross-reacts with IgG<sub>1</sub>) was clearly demonstrated when used as a milk assay (Kerkhofs *et al.*, 1990). Protein G (PG), which reacts with IgG subclasses, was also used as conjugate of broad specificity towards the IgG of different host species (human, bovine, sheep, goat and pig) (Godfroid *et al.*, 1994).

Cross-reactivity in traditional brucellosis serological tests was observed between *Brucella* S-LPS and S-LPS of other bacteria such as *Francisella tularensis*, *Escherichia coli* serogroup O:157 and serogroup O:116, *Salmonella* serotypes of Kaufmann-White group N, *Xantomonas maltophilia*, *Vibrio cholerae* and *Yersinia enterocolitica* serotype 0:9 (Corbel, 1985; FAO/WHO Expert Committee, 1986; Alton and Jones, 1988). Potentially, *Yersinia enterocolitica* presents the most serious source of confusion in the serological diagnostic of brucellosis because the immunodominant O-chain of S-LPS of *Y. enterocolitica*, serotype 0:9 and *Brucella* species are identical (Caroff *et al.*, 1984). Indeed, it is becoming increasingly clear that false positive serological reactions (FPSR) in the diagnosis of brucellosis in animals and humans are caused by *Y. enterocolitica*, serotype O:9 (Ahvonen *et al.*, 1969; Saegerman and Pelzer, 1992; Saegerman *et al.*, 1997; Dufey, 1992; Hilbink *et al.*, 1995; MacMillan, 1995; Weynants *et al.*, 1996; Gerbier *et al.*, 1997; Kittelberger *et al.*, 1998; Pouillot *et al.*, 1998; Godfroid *et al.*, 2002). FPSR are of particular concern for countries officially free from bovine brucellosis (Rooney, 1993; MacDiarmid, 1994; Hilbink *et al.*, 1995; Emmerzaal *et al.*, 2002; Godfroid *et al.*, 2002).

Besides the identification of FPSR, the detection of “latent” carriers (i.e. animals classified negative by traditional brucellosis serological tests) after importation of breeding animals still remains a priority task in these countries.

Therefore three different serum i-ELISAs respectively with 1C8 (anti-bovine IgG<sub>1</sub>), 3H3 (anti-bovine IgG<sub>2</sub> with slight cross-reactions with IgG<sub>1</sub>) and PG (anti-total IgG) conjugates were compared with standard serological tests: (i) both in experimentally and naturally infected cattle (acute and chronic infection), (ii) in the detection of latent carriers and (iii) in the context of the FPSR phenomena. The effect of the animal age was also investigated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains

*B. abortus* strain 544, *B. abortus* strain 99 and *B. melitensis* Rev 1 were a kind gift of J.M. Verger (Laboratoire de Pathologie Infectieuse et d'Immunologie, INRA, Nouzilly, France). For the experimental infections, *S. urbana* and *X. maltophilia* strains were collection strains from the Veterinary and Agrochemical Research Centre in Brussels. *E. coli* O:157 and *Y. enterocolitica* 0:9 strains were isolated in the field by the Veterinary Investigation Centre of Ciney. The laboratory strain of *Y. enterocolitica* 0:9 was kindly provided by Prof. G. Cornélis of the Catholic University of Louvain (Kaniga *et al.*, 1992).

### 2.2. Bacteriology

Pertinent organs and fluids (sampled at abortion, calving and slaughter) from *B. abortus* infected animals were subjected to bacterial examination, according to standard protocols (Alton *et al.*, 1988). For the isolation of *Yersinia*, the faeces were seeded on Columbia Agar, Brain Heart 64014 (Diagnostic Pasteur, Paris, France) supplemented with Agar L11 and 5% defibrinated sheep blood both from Oxoid (isolation of hemolytic bacteria), on Gassner Agar or Mac-Conkey (isolation of the gram negative bacteria and tested for the capacity to use lactose) and on a *Yersinia* selective agar basis (C.I.N., CM653 supplemented with *Yersinia* selective SR109 E, both from Oxoid). For the isolation of *Yersinia*, the incubation was performed overnight at 37°C. All the pink colonies on the C.I.N. medium were seeded again on the same medium to obtain a pure culture. Gram(-), catalase(+), oxydase(-) colonies were identified using diagnosis Rosco tablets and characterisation of *Yersinia* spp. are performed using routine biochemical technics (Rosco diagnostica, Taasrup, Denmark). The biochemical identification was completed by antigenic analysis using *Y. enterocolitica* O:3- and O:9-specific antisera (Sanofi-Pasteur, Paris, France).

### 2.3. Serology

#### 2.3.1. Traditional tests

Micro-agglutination test with EDTA (MAT-EDTA) with or without prior dithiothreitol (DTT) treatment of the serum, complement fixation Test (CFT) and the Rose Bengal plate test (RBPT) were performed as described previously (Alton *et al.*, 1988; MacMillan, 1990; Thiange *et al.*, 1992). The officially EU accepted cut-offs for MAT-EDTA and CFT are, respectively, 30 and 20

IU/ml (Anonymous, 2000). A result was considered positive if a positive titre was observed for at least one test (Anonymous, 1964). For the RBPT any degree of agglutination was considered positive (Anonymous, 2000). For the DTT test, the cut-off was defined at 12.5 IU/ml.

### **2.3.2. i-ELISAs**

#### **2.3.2.1. LPS extraction**

Thirty grams (wet weight) of heat inactivated bacteria were resuspended in 1200 ml of Tris-HCL 0.0625 M buffer pH 6.8 containing 1% SDS preheated in a water bath at 100°C. The mixture was incubated for 1 h at 60°C, after which the temperature was reduced to 50°C. Four millilitres of a 2% Proteinase K (Boehringer Mannheim, Germany) solution in water was then added and the lysed bacteria incubated under agitation for 2 h at 50°C and overnight at 37°C. A same volume of a saturated phenol solution was added to the bacterial lysate and after a vigorous agitation the solution was centrifuged for 15 min at  $16,000 \pm 1000 \times g$ . The phenol phase was collected and filtered on a Whatman paper number 3 filter. Three volumes of a methanol solution containing 1% of saturated sodium acetate were added to the phenol phase. The mixture was left overnight at 4°C. The supernatant was discarded and the remaining liquid was centrifuged to recover the LPS as a pellet that was resuspended in 200 ml of distilled water and stirred for at least 3 h at room temperature. This solution was centrifuged at  $10,000 \times g$  at 4°C for 30 min. The supernatant containing the solubilised LPS was collected. The pellet was resuspended in a same volume of water, stirred overnight and centrifuged again. The supernatants were pooled. NaOH was added to the solubilised LPS up to a final concentration of 0.25 N and incubated for 1 h at 56°C. The pH was adjusted to 8.5 by addition of powdered boric acid. The solution was dialysed for two days against water (four changes). The LPS was lyophilised and stored at room temperature in a dark bottle in a dessicator. A 1 mg/ml LPS stock solution was prepared in water, sonicated and stored frozen at -20 °C.

#### **2.3.2.2. Peroxydase Conjugates**

Three conjugates were used: Protein G peroxydase (PG, by BioRad, Belgium) which binds to both sub-classes of IgG and two MAbs produced by Letesson *et al.* (1985), 1C8, a bovine IgG<sub>1</sub>-specific MAb and 3H3 which reacts mainly with IgG<sub>2</sub> but also IgG<sub>1</sub>. These MAbs were produced as ascitic fluid in BALB/c/NMRI mice and purified by immuno-affinity on a commercial protein A Sepharose column (Pharmacia, Uppsala, Sweden) according to the protocol of the producer and coupled to peroxydase as described by Nakane and Kawaoi (1974).

### 2.3.2.3. Reagents

The following reagents were used: Glycine Buffer Saline (GBS; 0.17 M NaCl, 0.1 M Glycine and 6 mM NaN<sub>3</sub>, pH 9.2), GBS-EDTA-Tw (same buffer containing 50 mM EDTA and 0.1% Tween 20, final pH 9.2), Casein hydrolysate (25 g of milk casein, Fluka, Buchs, Switzerland, were dissolved in 800 ml of 0.3 N NaOH and incubated overnight at 37 °C; the solution was then neutralised with HCL to pH 7 and the volume adjusted to one litre; the protein solution was finally filtered on a coffee filter), PBS-casein (Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.4 containing 4% (V/V) of the casein hydrolysate - 1 mg/ml), Citrate-Phosphate buffer (0.051 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.024 M citric acid, pH 5), NaCl-Tw (0.15 M NaCl containing 0.01% Tween 20).

### 2.3.2.4. Coating

Microtitre plates were coated by an overnight incubation at 37 °C with a mixture (1/1) of *B. melitensis* Rev1 LPS (antigenic determinants M > A) and *B. abortus* W99 LPS (antigenic determinants A > M) at a final concentration of 1 µg/ml in fivefold diluted GBS in water. This choice was justified by the results of a preliminary trial in an outbreak of *B. abortus* biotype 9 (epitope M dominant). In this herd, the use of LPS W99 only (epitope A dominant) gave false negative results for some animals whereas the use of a mixture of LPS avoids this lack of sensitivity (unpublished results).

### 2.3.2.5. Method

After six washings with NaCl-Tw, plates were saturated 3 h at 37 °C with 150 µl of PBS-casein. Serum samples were diluted 50-fold in GBS-EDTA-TW and dispensed into the wells. Plates were incubated for 1 h at room temperature. Binding of antibodies to S-LPS was revealed by using peroxydase conjugated anti-bovine IgG, either 1C8, 3H3 or PG, diluted in GBS-EDTA-Tw containing 4% (V/V) casein hydrolysate. The conjugate was incubated for 1 h at room temperature. Between each incubation, six washings with NaCL-Tw removed excess reagents using an automatic washer (Microplate washer M96, Titertek). The washer was programmed as follows: maximum speed of liquid injection and 2 mm distance between the bottom of the well and the dispensing needle during the aspiration, no soaking and a final wash with lateral displacement. The settings of the washer significantly affect the results in terms of maximum intensity, background and false positive reactions. The current settings gave results equivalent to those observed with the manual Immunowash (Nunc, Gibco, Gent, Belgium). O-phenylenediamine (0.4%, W/V) and 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in citrate-phosphate buffer were used to visualize peroxydase activity. The difference of light absorbance at 492 nm - 620 nm was read with a Bio Kinetics Reader EL-340 (Biotek Instruments, Vermont, USA). Results were expressed as antibody units in comparison with a standard serum. The reference serum presented a titre of 1200 IU when titrated in CFT using the second international standard serum



of 1000 units as calibrator. Negative control serum, positive control serum and dilution buffer were added on each plate as controls. The conversion of the optical densities into arbitrary units per ml (U/ml) for unknown tests was done by comparison, using eight final dilutions of the reference serum to establish a calibration curve (1/1000-1/128,000). Curve fitting and interpolation were performed using the Delta Soft II.3 software developed by Biometallics for Apple Macintosh. A four parameter logistic model was found to give the best fit. The cut-off value was defined at 2.5 U/ml following the methodology described previously (Limet *et al.*, 1988).

## **2.4. Skin test**

The Skin testing was performed with Brucellergen batch 96G091 (Merial, Lyon, France) as described previously (Saegerman *et al.*, 1999). Briefly, the intra-dermal injection was performed using the traditional tuberculin syringe with a 4 mm needle. Hair was removed with an electric shaver and the increase of skin thickness was measured 72 h later with a spring skin meter. An increase of at least 1.1 mm of the skin fold thickness was considered as positive.

## **2.5. Animals and sera**

### **2.5.1. Evaluation of test specificity**

#### **2.5.1.1. Field sera**

Nine hundred and thirty six sera were collected from animals of 24 farms located in a region near the German border, which has been officially free from brucellosis since at least 10 years. A skin test was performed with brucellergen as described above. None of the 562 animals tested presented a positive skin test. The absence of brucellosis was substantiated for a period of 4 years after these tests.

In addition, 16 sera originating from heifers, naturally infected with *Yersinia enterocolitica* O:9 and without clinical signs, risk factors or history of brucellosis, were selected for final comparison. *Yersinia enterocolitica* O:9 was isolated from the faeces of three of these animals.

#### **2.5.1.2. Sera from experimentally infected animals**

Fifteen heifers, housed at the Veterinary and Agrochemical Research Centre (VAR) in Brussels, were infected orally with different bacteria bearing LPS similar to *Brucella* LPS as described in Table 4. Blood samples were collected weekly during the four months following infection.

## **2.5.2. Evaluation of test sensitivity**

### **2.5.2.1. Sera from experimentally infected animals**

Thirty-two 5-month pregnant Holstein heifers imported from brucellosis-free areas in France (Morbihan and Finistère) were housed at VAR and were infected conjunctively with  $16.6 \times 10^6$  *B. abortus* strain 544. Three months before the infection, respectively 12 and 15 heifers were vaccinated subcutaneously with  $150 \times 10^6$  cells of *B. abortus* strain 19 or 9 mg SDS-I fraction in 2 ml of BG adjuvant (sub-unit vaccine) (Saegerman *et al.*, 1994). Five pregnant heifers were used as controls. Blood samples were collected weekly during the 5 months following infection or vaccination.

### **2.5.2.2. Sera from experimentally vaccinated and non-infected animals**

The 12 heifers referred to in the previous section were used before infection with the additional of two other non-pregnant heifers.

### **2.5.2.3. Field sera**

A total of 12 sera originating from animals naturally infected with *B. abortus* biovar 3 (acute infection) and a total of 48 sera originating from non-pregnant females, naturally infected with *B. abortus* biovar 3 or 9 and housed 3 months after in a fattening centre (chronic infection), were selected. These animals were considered truly infected according to either a positive skin test, and/or the isolation of *Brucella*.

## **2.6. Statistical analyses**

Statistical analyses were carried out in STATA/SE 8 (StataCorp, 2003).

### 3. Results

#### 3.1. Specificity

The specificity of the three i-ELISAs was evaluated from the results obtained with the 936 sera from the officially brucellosis-free region (Table 1). The distribution of the 30 sera presenting values above 2.5 U/ml (irrespective of the i-ELISA) is the following: 8 sera were positive for the three conjugates, 14 for both 1C8 and PG assays, 3 for 1C8 assay alone and 5 for the PG assay alone. No serum was positive in the 3H3 assay alone. New blood samples of 23 animals were taken the following year (seven animals had been slaughtered between the two samplings). Seven FPSR persisted, three with the tree assays, one with 1C8 and PG assays and three only with the PG assay. Again, no FPSR was observed with 3H3 assay alone. No cross-reacting bacteria were isolated from the 18 faeces samples analysed from these animals (only two *Yersinia frederiksenii* serotype O:39, not known to induce FPSR, were isolated from one herd).

As expected, the test specificity increased with increasing cut-off (Poisson regression,  $p < 0.001$ ), irrespective of the conjugate used. The 1C8 and PG assays yielded identical test specificity values, whereas the 3H3 conjugate offered a significantly higher specificity (Poisson regression,  $p < 0.001$ ).

**Table 1. Specificity of the three brucellosis indirect enzyme-linked immunosorbent assay (i-ELISA) (N = 936).**

Cut-off (U/ml)	Conjugate of i-ELISA					
	1C8		3H3		PG	
	N <sub>T+</sub> <sup>a</sup>	Specificity in % (95% CI)	N <sub>T+</sub>	Specificity in % (95% CI)	N <sub>T+</sub>	Specificity in % (95% CI)
2.5	25	97.33 (96.08-98.26)	8	99.14 (98.32-99.63)	27	97.12 (95.83-98.09)
5	7	99.25 (98.47-99.70)	2	99.79 (99.23-99.97)	9	99.04 (98.18-99.56)
7.5	2	99.79 (99.23-99.97)	0	100 (99.68-100) <sup>b</sup>	3	99.68 (99.07-99.93)

<sup>a</sup> number of positive sera; <sup>b</sup> one sided 95% confidence interval

### 3.1.1. Specificity in function of animal age

The age of the female animals had an effect of i-ELISA specificity (Table 2). At a cut-off value of 2.5 U/ml, the test specificity increased significantly with animal age for conjugate 1C8 (random-effect logistic regression,  $P = 0.013$ ) and conjugate PG (random-effect logistic regression,  $P = 0.031$ ). Because of the low number of FPSR obtained with 3H3, this effect only became obvious for this conjugate when lowering the cut-off value to 1 U/ml (random-effect logistic regression,  $P = 0.028$ ).

**Table 2. Age statistics (in months) of seronegative and false seropositive female animals in function of i-ELISA used (cut-off at 2.5 U/ml).**

	1C8		3H3		PG	
	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive
Number of observations	870	24	886	8	868	26
Average age ( $\pm$ S.E.)	45.4 ( $\pm$ 1.0)	29.9 ( $\pm$ 4.1)	44.9 ( $\pm$ 1.0)	42.5 ( $\pm$ 10.1)	45.3 ( $\pm$ 1.0)	21.4 ( $\pm$ 4.2)
Median age	37	23	37	32	37	25
Minimum age	4	10	4	12	4	10
Maximum age	182	83	182	83	182	83

### 3.1.2. Specificity with regards to bacteria that induce cross-reactions

#### 3.1.2.1. Field sera

Results obtained with the 16 *Y. enterocolitica* O:9 FPSR sera are given in Table 3. The i-ELISA titres rose to reach high titres (20 and 40 U/ml) for the 1C8 and PG assays. The number of FPSR with the tree conjugates was higher than in the case of CFT. The three assays were also applied to 169 individual FPSR field sera (Table 3). Those 169 FPSR sera can be classified into two groups: 23 Class I sera (negative DTT assay) and 146 Class II sera (positive DTT assay). The i-ELISAs were negative in more than 74% of Class I sera (87% with 3H3 conjugate) and in case of positive results the observed values were low. FPSR (Class I) are therefore mainly due to IgM antibodies. Among these 146 Class II sera, respectively 10, 103 and 29 sera presented positive results for MAT-EDTA alone, CFT alone and both MAT-EDTA and CFT. About 95% of these sera were positive in the i-ELISAs whatever the conjugate used. Thus, this suggests that the FPSR (Class II) are mainly due to IgG antibodies.

**Table 3. Number of positive test results of three i-ELISA and traditional tests evaluated on sera originating from cattle with different brucellosis status.**

Cut-off value (I.U./ml)	Number of positive sera											
	Traditional tests <sup>a</sup>			i-ELISA (conjugate)								
	MAT-EDTA (only 30)	CFT (only 20)	MAT-EDTA and CFT (30 and 20)	1C8			3H3			PG		
			2.5	5	7.5	2.5	5	7.5	2.5	5	7.5	
<b>Experimental conditions</b>												
<b>5 pregnant cows infected with <i>Brucella abortus</i> 544 (16.6 10<sup>6</sup> cells)</b>												
2 weeks before infection	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1 week before infection	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1 week after infection	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2 weeks after infection	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3 weeks after infection	1	0	0	4	3	2	4	2	2	4	3	
4 weeks after infection	3	0	0	5	4	2	4	2	2	4	3	
5 weeks after infection	2	3	0	5	5	5	5	5	5	5	5	
<b>14 cattle vaccinated subcutaneously with the live <i>B. abortus</i> B 19 vaccine (150 x 10<sup>6</sup> cells)</b>												
1 week before vaccination	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1 week after vaccination	1	0	13	9	2	1	2	1	0	9	8	
2 weeks after vaccination	0	0	14	14	12	10	12	11	9	14	14	
3 weeks after vaccination	0	0	14	14	14	14	14	14	14	14	14	
1 month after vaccination	0	0	14	14	14	14	n.d. <sup>b</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
2 months after vaccination	0	8	5	14	13	13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
3 months after vaccination <sup>c</sup>	0	6	1	12	12	11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
<b>Field conditions</b>												
<b>12 cattle sera from 2 brucellosis outbreaks <sup>d</sup> (acute infection)</b>												
	0	2	2	12	9	9	11	8	5	12	9	
<b>48 unvaccinated beef cattle sera from infected brucellosis outbreaks <sup>d</sup> (chronic infection)</b>												
	2	1	0	48	23	15	33	11	6	46	26	
<b>16 <i>Brucella abortus</i> free cattle sera from <i>Yersinia</i> infected cattle</b>												
	0	3	0	16	7	5	14	10	7	16	10	
<b>23 cattle sera with false positive serological reaction of Class I (DTT-) <sup>f</sup></b>												
	15	1	6	6	2	1	3	1	1	6	2	
<b>146 cattle sera with false positive serological reaction of Class II (DTT+) <sup>g</sup></b>												
	10	103	29	140	137	124	140	135	120	141	137	

<sup>a</sup> Interpretation according to European directive 64/432/EC; <sup>b</sup> Not done; <sup>c</sup> Data available for twelve animals; <sup>d</sup> *B. abortus* biovar 3 was isolated; <sup>e</sup> *B. abortus* biovar 3 or biovar 9 were isolated; <sup>f</sup> One anti-complementary serum; <sup>g</sup> Four anti-complementary sera.

### 3.1.2.2. Sera from orally experimental infected heifers

No false positive response was detected for the two animals infected with *E. coli* O:157 whatever the tests used (Table 4), whereas sera of some animals, experimentally infected with *Y. enterocolitica* O:9, *S. urbana* or *X. maltophilia* contained antibodies that were detected in some tests. In fact only two animals infected with *S. urbana*, one with *Y. enterocolitica* O:9 and one with both  $\beta$ -haemolytic *E. coli* and *Y. enterocolitica* O:9 were classified positive with the

traditional tests. For the traditional tests, the DTT was the most specific. For the i-ELISAs, the 3H3 assay yielded fewer FPSR than 1C8 and PG assays. The duration of FPSR in the traditional tests and the i-ELISAs varied from 2 weeks to 4 months.

**Table 4. Brucellosis serology in cattle experimentally infected with cross-reacting bacteria: maximum observed values.**

N <sub>i</sub> <sup>a</sup>	Bacterium	Dose infection (per os)	N <sub>T+</sub> <sup>b</sup>	Traditional tests <sup>c</sup>				i-ELISA <sup>d</sup>		
				MAT-EDTA	DTT	RBPT	CFT	1C8	3H3	PG
2	<i>E. coli</i> O:157	1.8 x 10 <sup>12</sup>	0	.	.	.	.	.	.	.
2	<i>X. maltophilia</i>	1.05 x 10 <sup>12</sup>	1	12.5	0	1	0	31	16	12
3	<i>Salmonella urbana</i>	0.725 x 10 <sup>12</sup>	2	100 100	25 0	4 3	50 25	46 0	13 0	40 0
2	<i>Y. enterocolitica</i> O:9 (field strain)	10 <sup>12</sup>	1	25	0	1	20	9	0	4
4	<i>Y. enterocolitica</i> O:9 (KNG1024 strain) <sup>e</sup>	10 <sup>12</sup>	4	12.5 25 0 0	0 0 0 0	0 3 0 1	0 15 0 0	4 4 3 3	0 0 0 3	3 4 3 3
2	<i>Y. enterocolitica</i> O:9 and β-hemolytic <i>E. coli</i> (field strains)	10 <sup>12</sup>	2	12.5 100	0 0	1 3	0 25	9 4	0 0	3 3

<sup>a</sup> Number of animals infected; <sup>b</sup> Number of serologically positive animals; <sup>c</sup> MAT-EDTA and DTT: value expressed as IU/ml of serum; CFT: value expressed as IU/ml; RBPT: intensity of reaction expressed as 0 (absence of agglutination), 1-4 (degree of agglutination); <sup>d</sup> Indirect enzyme-linked immunosorbent assay: value expressed as U/ml of serum; <sup>e</sup> KNG1024 strain previously described by Kaniga *et al.*, (1992).

### 3.2. Sensitivity

The sensitivity of the traditional serological tests and the i-ELISAs 26, 37, 50 and 64 days after experimental infection is shown in Table 5. Irrespective of the vaccination status of animals and days post-infection, the i-ELISAs were more sensitive than traditional tests at detecting antibodies to *Brucella* in infected pregnant heifers. In heifers, previously vaccinated at 2 months of pregnancy with a reduced dose of B19, the PG i-ELISAs was slightly less sensitive for detecting *Brucella* infected animals. The i-ELISA with 1C8 conjugate yielded significantly higher titres than the other assays irrespective of day post-infection and vaccination status (random-effect negative binomial regression,  $P = 0.0076$  after Bonferroni correction) (Figure 1). The increase in median value of tests results indicates an active infection that was confirmed by the

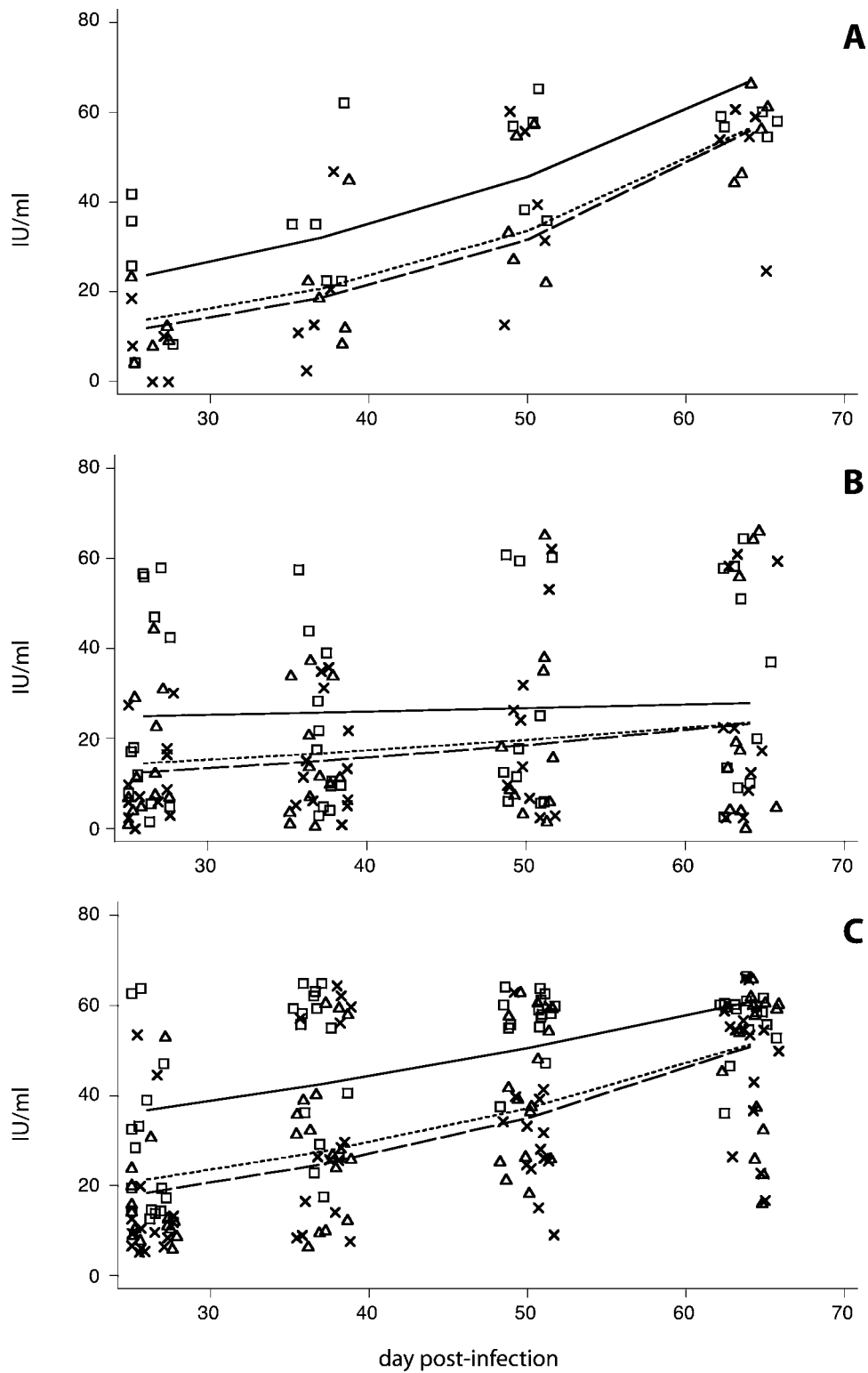
clinical and bacteriological findings shown in Table 6. At 26 days post-infection, the skin test was also more sensitive than the traditional tests.

**Table 5. Number of positive animals in brucellosis diagnostic tests <sup>a</sup> after experimental infection of pregnant heifers <sup>b</sup> either not vaccinated, or vaccinated with B19 or SDS-I.**

Group	Test	Cut-off	26 dpi <sup>c</sup>	37 dpi	50 dpi	64 dpi	Score <sup>d</sup>
Control (N = 5)	MAT-EDTA	30 IU/ml	0	3	2	4	9
	DTT	12.5 IU/ml	3	5	4	5	17
	RBPT	1	4	5	4	5	18
	CFT	20 IU/ml	4	5	5	5	19
	1C8	2.5 U/ml	5	5	5	5	20
	3H3	2.5 U/ml	4	5	5	5	19
	PG	2.5 U/ml	4	5	5	5	19
	ST	1.1 mm	5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B19 (N = 10)	MAT-EDTA	30 IU/ml	1	2	2	3	8
	DTT	12.5 IU/ml	7	8	7	8	30
	RBPT	1	8	10	5	9	32
	CFT	20 IU/ml	7	9	7	7	30
	1C8	2.5 U/ml	10	10	10	9	39
	3H3	2.5 U/ml	10	10	9	10	39
	PG	2.5 U/ml	8	9	9	10	36
	ST	1.1 mm	9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SDS-I (N = 15)	MAT-EDTA	30 IU/ml	0	5	10	12	27
	DTT	12.5 IU/ml	14	15	15	15	59
	RBPT	1	12	15	15	15	57
	CFT	20 IU/ml	12	15	15	15	57
	1C8	2.5 U/ml	15	15	15	15	60
	3H3	2.5 U/ml	15	15	15	15	60
	PG	2.5 U/ml	15	15	15	15	60
	ST	1.1 mm	14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

<sup>a</sup> MAT-EDTA (MAT in presence of EDTA), DTT (MAT after treatment with dithiothreitol in presence of rheumatoid factor), RBPT (Rose Bengal; expression of the results was previously described in Table 4), CFT (Complement Fixation Test), 1C8 (i-ELISA with 1C8 conjugate), 3H3 (i-ELISA with 3H3 conjugate), PG (i-ELISA with protein G conjugate), ST (skin test with brucellergene); <sup>b</sup> Panel of pregnant heifers, both non-vaccinated control ( $n = 5$ ) and vaccinated with 9 mg SDS-I fraction in 2 ml of BG adjuvant ( $n = 15$ ) or  $150 \times 10^6$  cells of Buck 19 ( $n = 10$  heifers sampled all four times). This panel was infected in the fifth month of pregnancy with  $16.6 \times 10^6$  *B. abortus* strain 544 by conjunctival route (88 days post-vaccination); <sup>c</sup> Days post-infection; <sup>d</sup> A value of one was attributed for each positive tested animal at each time and the score of each test is defined as their sum.

Figure 1. i-ELISA serotitres in function of vaccination status, conjugate and day post-infection.



(A) unvaccinated animals ( $n = 5$ ), (B) B19-vaccinated animals ( $n = 12$  at 26, 37 dpi and  $n = 10$  at 50, 64 dpi), (C) SDS-I vaccinated animals ( $n = 15$ );  $\square$  = 1C8 observed,  $\Delta$  = 3H3 observed,  $\times$  = PG observed; — = 1C8 predicted, ..... = 3H3 predicted, - - = PG predicted.



**Table 6. Clinical and bacteriological results after experimental infection of pregnant heifers <sup>a</sup> either not vaccinated, or vaccinated with B19 or SDI-I.**

		Control (N = 5)	B19 (N = 10)	SDS-I (N = 15)
Abortion	Number	5	4	14
	Range dpi <sup>b</sup> (mean)	46-87 (77)	46-87 (77)	49-99 (82)
Calving	Number	-	6	1
	Range dpi (mean)	-	110-127 (122)	115
Number of positive cultures in heifers	At abortion or calving	5	9	14
	In milk and/or vaginal mucus <sup>c</sup>	4	9	14
	At slaughter house <sup>d</sup>	4	5	14

<sup>a</sup> Panel of pregnant heifers, both control and vaccinated with 9 mg SDS-I fraction in 2 ml of BG adjuvant or 150 x 10<sup>6</sup> cells of Buck 19. This panel was infected in the fifth month of pregnancy with 16.6 x 10<sup>6</sup> *B. abortus* strain 544 by conjunctival route (88 days post-vaccination); <sup>b</sup> Days post-infection; <sup>c</sup> Weekly during the first month after abortion of calving; <sup>d</sup> Up to 6 months after abortion or calving.

### 3.3. Early detection and persistence of serological titres

#### 3.3.1. Sera from experimentally infected animals

With a cut-off value of 2.5 U/ml, four in five infected animals of the control group were detected by i-ELISAs 3 weeks after infection, whatever the conjugate (Table 3). All animals were detected with the 1C8 assay 4 weeks after infection. After 5 weeks the three assays and the traditional tests (when used in parallel) detected the five infected animals.

#### 3.1.2. Sera from experimentally vaccinated and non-infected heifers

The traditional tests (used in parallel) appeared to detect the vaccine response 1 week after the vaccination (reduced dose), whereas the i-ELISAs detected all animals after 3 weeks (Table 3). The MAT-EDTA and RBPT tests presented very high titres, indicating that large amounts of IgM antibodies were produced at the beginning of the vaccine response, which were not detected by i-ELISAs using anti-bovine IgG. Delays to positive titre were shorter for 1C8 and PG assay than for 3H3 assay. Significant titres persisted longer with the i-ELISAs ( $\leq 20$  U/ml for most of the animals, 3 months after vaccination) than with the traditional tests, whereas within the traditional tests CFT yielded detectable titres longer ( $\leq 60$  IU/ml).

#### 3.1.3. Field sera

At a cut-off value of 2.5 U/ml, i-ELISAs yielded a positive result earlier than the traditional tests (Table 3). In case of an acute *B. abortus* infection, all sera positive with 3H3 and/or PG were

also positive with 1C8. In case of chronic infections, quite a number of sera were found to be negative with the traditional tests and positive with i-ELISAs. Despite the fact that the 3H3 assay was the least sensitive of the i-ELISAs (particularly in chronic infection), it was still significantly more sensitive than the traditional tests.

## 4. Discussion

The i-ELISAs with purified S-LPS from *Brucella* were developed originally to allow large-scale assaying of antibodies in bovine serum and milk. They appear to be a very useful tool in the diagnosis of bovine brucellosis as they offer several major advantages over other serological tests because of a less complex standardisation process, because they can be used with haemolysed sera, because they measure reactivity objectively and because automation is possible (Saravi, 1995; Uzal *et al.*, 1996).

Traditionally, these assays are evaluated in experimental conditions for sensitivity and under field conditions for specificity. In field conditions, isolation of *B. abortus* at slaughter is the most commonly used tool for the determination of infection status in brucellosis (Stemshorn *et al.*, 1985; Dohoo *et al.*, 1986; Hornitzky and Searson, 1986). Therefore, our study suggests that bacteriological results obtained in heifers at a long delay post-abortion or calving (i.e. at slaughter) have to be cautiously interpreted. Hence, in field conditions, post-abortion or calving time-points have to be taken into account in order to have a correct sensitivity assessment.

In the field, the 3H3 conjugate yielded the highest specificity. The present study shows that the FPSR phenomena drastically decrease the specificity of i-ELISA, as demonstrated previously by Saegerman *et al.* (1999): e.g. in areas where FPSR are known to occur, the specificity of the i-ELISA with 1C8 conjugate at a cut-off value of 5 U/ml decreased significantly from 99.25% to 98.19%, demonstrating once more that the specificity of these tests depends on the area in which they are used. The fact that the specificity of the i-ELISA assays increased with the age of the animals irrespective of the conjugate may be related to the age effect in the case of Class II FPSR, an effect that was previously described by Saegerman *et al.* (1997) and Pouillot *et al.* (1998).

The experimental infection with *Y. enterocolitica* O:9, *X. maltophilia* or *S. urbana* induced a transient IgG antibody response interfering with the traditional tests and the i-ELISAs. Sera from the animals, experimentally infected with cross-reacting bacteria, influenced the 3H3 assay less than the 1C8 and PG assays, resulting in a significantly higher specificity for this conjugate. An individual variability in type of response was noted, some animals developed both IgM and IgG antibodies, others mainly either IgM or IgG. Two types of FPSR seem to occur in the field. The first class, tentatively termed Class I, corresponds to production of mainly IgM antibodies. The second class (Class II) seems to correspond to a production of mainly IgG antibodies displaying important cross reactivity. The experimental per os infections indicated that *Y. enterocolitica* O:9 and *S. urbana* are capable of inducing such a response in a limited

number of animals. Since the bacterial strain and the route of infection were the same and the dose similar for all animals, the difference in response is probably linked to parameters governing the immunological competence of the animal. In the field, only Corbel and Wray (1975) have isolated *S. urbana* and in Belgium, so far, no case has been reported. However, several strains of *Y. enterocolitica* O:9 have been isolated from animals presenting Class II FPSR or living in the same environment, without history of brucellosis (Saegerman and Pelzer, 1992, Saegerman *et al.*, 1997; Weynants, 1996). In the field, a strain of  $\beta$ -haemolytic *E. coli* was isolated in several animals before or concurrent with *Y. enterocolitica* O:9. Although this *E. coli* strain did not induce cross-reactions when used to infect mice (data not shown), it could still modify the evolution of a concomitant or subsequent infection by *Y. enterocolitica* O:9. *Y. enterocolitica* O:9 thus seems to be a very likely cause of Class II reactions. Nevertheless, the origin of the 30 false positive reactions observed in the i-ELISAs for the sera of animals from the brucellosis-free regions remains unclear: no *Y. enterocolitica* O:9 was isolated from the faeces of these animals. Seven false positive reactions persisted the following year in animals up to 36 months of age. The persistence of antibodies induced by cross-reacting bacteria is in general shorter, more than 90% of the false positive reactions disappearing in traditional tests within three months (Saegerman *et al.*, 1997).

In the field, the i-ELISAs were negative in more than 74% of Class I sera (87% with 3H3 conjugate) at the cut-off of 2.5 U/ml. For Class II, about 95% of the sera were positive in the i-ELISAs whatever the conjugate used. At the moment, Class II sera are in fact less frequently observed than Class I FPSR and more attention should be paid to Class II FPSR, because the serological picture is more similar to *Brucella* infection. Furthermore, in the field, the results obtained when using a single traditional test are not always easy to interpret; the combination of several tests is often required to ensure effective serological diagnosis. For example, MAT-EDTA followed by i-ELISA results in an effective serological diagnosis in Belgium with sufficient sensitivity but this combination does not solve the Class II FPSR, necessitating the use of a brucellosis skin test as a confirmation test in non-vaccinated cattle herds (Saegerman *et al.*, 1992, 1999; Pouillot *et al.*, 1997; Godfroid *et al.*, 2002).

The principal merit of the i-ELISA assays lies in the fact that they are more sensitive, give positive results sooner after infection and are more persistent than the traditional serological tests in both experimentally and naturally infected animals (acute and chronic infection in case of pregnancy or not). Weekly i-ELISA monitoring of pregnant heifers experimentally infected (previously vaccinated or not) allowed a prediction of abortion, allowing preventive elimination of animals that could become sources of contamination. Figure 1 demonstrates that, firstly, the i-ELISA with 1C8 conjugate yielded significantly higher titres than the other assays irrespective of day post-infection and vaccination status and, secondly, repeated serological testing may

yield information on the efficacy of a vaccination protocol (either experimental or in the field). Indeed, the slope of the regression line in Figure 1 is invariably twice as steep for the control and SDS-I groups compared to the B19 group and more abortions were observed in the former two groups.

Accuracy of the assay can be improved by incorporating other information such animal age or conjugate (as shown by our results) and herd size and by selecting appropriate cut-off points provided such an i-ELISA still fulfils OIE requirements (Anonymous, 2000), on the basis of the prevailing epidemiological situation, as suggested by Omer *et al.* (2001). When confronted with a positive serological reaction, an epidemiological inquiry should be performed into possible risk factors for brucellosis. In the presence of such risk factors (e.g. pregnant animals, purchased animals, contact with possible source of contamination), the animals concerned should be skin-tested and/or slaughtered for bacteriological examination. An i-ELISA is the appropriate choice in the context of maintaining an officially disease-free status in a country because of its sensitivity, early detection and extended persistence, which are especially valuable for a successful detection of latent carrier cattle among imported animals.

However, according to the epidemiological situation (e.g. vaccination, FPSR) different i-ELISAs detecting IgG<sub>1</sub> and/or IgG<sub>2</sub> antibodies may have different merits and hence the decision to allow only i-ELISAs detecting antibodies of the IgG<sub>1</sub> class (Anonymous, 2000; Nielsen, 2002) should be reconsidered.

## **5. Acknowledgements**

This work was supported by grants from the then Federal Ministry of Agriculture (Convention IRSIA 5387A), the then Central Animal Health Association and the Ministry of Agriculture of the Walloon Region. The authors' thanks are due first to the anonymous farmers who took part in the investigations. They also acknowledge the help they received from the URBM staff, from the staff of the Veterinary and Agrochemical Research Centre experimental station and from the staff of the then Veterinary Research Centres at Loncin and Ciney. Finally, they would particularly like to thank Dr. Moutschen, Dr. Cormann, Dr. Czaplicki, P. Michel, K. Desmedt and N. Petit for their logistic help.

## 6. References

AHVONEN P., JANSSON E., AHO K. Marked cross-agglutination between brucellae and a subtype of *Yersinia enterocolitica*. *Acta path. Microbial. Scand.*, 1969, **75**, 291-295.

ALTON G.G., JONES L.M., ANGUS R.D., VERGER J.M. Techniques for the brucellosis laboratory. 1st edn. INRA, Paris, France, 1988, 190 pp.

ANONYMOUS. Council Directive 64/432/EEC of 26 June 1964 on animal health problems affecting intra-Community trade in bovine animals and swine, *Official Journal of the European Communities*, 1964, **P 121**, 1977-2012.

ANONYMOUS Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Fourth edn. Office International des Epizoties, Paris, France, 2000, 957 pp.

ANONYMOUS 2003. Commission decision of 23 June 2003 establishing the official tuberculosis, brucellosis, and enzootic-bovine-leukosis-free status of certain Member States and regions of Member States as regard bovine herds. *Official Journal of the European Union*, **L156**, 74-78.

CAROFF M., BUNDLE D.R.B., PERRY M.B. Structure of the O-chain of the phenol-phase soluble cellular lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9. *Eur. J. Biochem.*, 1984, **139**, 195-200.

CHERWONOGRODZKY J.W., DUBRAY G., MORENO F., MAYER H. Antigens of *Brucella*, p. 19-64. In: Nielsen, K., Ducan, R. (Eds), *Animal Brucellosis*, CRC Press, Orlando, 1990.

CORBEL M.J. Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross-reactions. *Vet. Bul.*, 1985, **55**, 927-942.

CORBEL M.J., WRAY C. The effect of natural infection with *Salmonella urbana* on the serological status of cattle in relation to tests for brucellosis. *Br. Vet. J.*, 1975, **131**, 324-334.

DOHOO I., WRIGHT P., RUCKERBAUER G., SAMAGH B., ROBERTSON F., FORBES L. A comparison of five serological tests for bovine brucellosis. *Can. J. Vet. Res.*, 1986, **50**, 485-493.

DUFEY J. Le dépistage confronté aux réalités du terrain. *Ann. Méd. Vét.*, 1992, **136**, 281-283.

EMMERZAAL A., DE WIT J.J., DIJKSTRA T., BAKKER D., VAN ZIJDERVELD F.G. The Dutch *Brucella abortus* monitoring programme for cattle: the impact of false-positive serological reactions and comparison of serological tests. *Vet. Quart.*, 2002, **24**, 40-46.

FENSTERBANK R. 1986. Brucellose des bovines et des petits ruminants : diagnostic, prophylaxie et vaccination. *Rev. sci. techn. Off. Int. Epiz.*, 1986, **5(3)**, 587-603.

FOOD AGRICULTURAL ORGANIZATION AND WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Committee on brucellosis. Sixth report. *WHO Tech. Rep. Ser.*, 1986, **740**, 145 pp.

FOUGEREAU M., BAZIN H. Immunoglobulines, p. 81-104. In: Pastoret, P-P., Govaert, A., Bazin, H. (Eds), *Immunologie animale*, Medecine-Sciences Flammarion, Paris, 1990.

GARIN-BASTUJI B. Le dépistage de la brucellose des ruminants et ses difficultés. Le cas des sérologies atypiques en brucellose bovine. *Point. Vét.*, 1993, **25(152)**, 115-124.

GARIN B., TRAP D., GAUMONT R. Assessment of the EDTA seroagglutination test for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. Rec.*, 1985, **117**, 444-445.

GERBIER G., GARIN-BASTUJI B., POUILLOT R., VERY P., CAU C., BERR V., DUFOUR B., MOUTOU F. False-positive serological reactions in bovine brucellosis: evidence of the role of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 in a field trial. *Vet. Res.*, 1997, **28**, 375-383.

GODFROID J., MICHEL P., UYTTERHAEGEN L., DE SMEDT C., RASSENEUR F., BOELAERT F., SAEGERMAN C., PATIGNY X. Brucellose enzootique à *Brucella suis* biotype 2 chez le sanglier (*Sus scrofa*) en Belgique. *Ann. Méd. Vét.*, 1994, **138**, 263-268.

GODFROID J., SAEGERMAN C., WELLEMANS V., WALRAVENS K., LETESSON J.-J., TIBOR A., MACMILLAN A., SPENCER S., SANAA M., BAKKER D., POUILLOT R., GARIN-BASTUJI B. How to substantiate the freedom of bovine brucellosis when aspecific serological reactions emerge in brucellosis tests ? *Vet. Microbiol.*, 2002, **90**, 461-477.

HALL S.M., CONFER A.W., PATTERSON J.M. *Brucella abortus*-specific immunoglobulin isotypes in serum and vaginal mucus from cattle vaccinated with strain 19 and challenge exposed with virulent strain 2308. *A. J. Vet. Res.*, 1988, **49(6)**, 840-846.

HILBINK F., FENWICK S.G., THOMPSON E.J., KITTELBERGER R., PENROSE M., ROSS G.P. Non-specific seroreactions against *Brucella abortus* in ruminants in New Zealand and the presence of *Yersinia enterocolitica* O:9. *New Zeal. Vet. J.*, 1995, **43(5)**, 175-178.



HORNITZKY M., SEARSON J. The relationship between the isolation of *Brucella abortus* and serological status of infected, non-vaccinated cattle. *Aus. Vet. J.*, 1986, **63(6)**, 172-174.

KANIGA K., SORY M-P., DELOR I., SAEGERMAN C., LIMET J.N., CORNELIS G. Monitoring of *Yersinia enterocolitica* in murine and bovine feces on the basis of the chromosomally integrated luxAB marker gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, **58(3)**, 1024-1026.

KERKHOF P., BOTTON Y., THIANGE P., DEKEYZER P., LIMET J.N. Diagnosis of bovine brucellosis by enzyme immunoassay of milk. *Vet. Microbiol.*, 1990, **24**, 73-80.

KITTELBERGER R., BUNDESEN P.G., CLOECKAERT A., GREISER-WILKE I., LETESSON J.-J. Serological cross-reactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9: IV. Evaluation of the M- and C-epitope antibody response for the specific detection of *B. abortus* infections. *Vet. Microbiol.*, 1998, **60**, 45-57.

LAWMAN M.J.P., BALL D.R., HOFFMANN E.M., DESJARDIN L.E., BOYLE M.D.P. Production of *Brucella abortus*-specific protein a-reactive antibodies (IgG<sub>2</sub>) in infected and vaccinated cattle. *Vet. Microbiol.*, 1986, **12**, 43-53.

LETESSON J.-J., LOSTRIE-TRUSSART N., DEPELCHIN A. Production d'anticorps monoclonaux spécifiques d'isotypes d'immunoglobulines bovines. *Ann. Méd. Vét.*, 1985, **129**, 131-141.

LEVIEUX D. Immunoglobulines bovines et brucellose. 2. Activité des IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> et IgM du sérum dans les réactions d'agglutination, de Coombs, de fixation du complément et dans le test au Rose Bengale. *Ann. Rech. Vét.*, 1974, **5**, 343-353.

LEVIEUX D. Immunoglobulines et transmission de l'immunité passive chez les ruminants, p. 596-599. *In*: Pastoret, P-P., Govaert, A., Bazin, H. (Eds), Immunologie animale, Medecine-Sciences Flammarion, Paris, 1990.

LIMET J.N., KERKHOF P., WIJFFELS R., DEKEYSER P. Le diagnostic sérologique de la brucellose bovine par ELISA. *Ann. Méd. Vét.*, 1988, **132**, 565-575.

MACDIARMID S.C. Bovine brucellosis eradication in New-Zealand. *Surveillance*, 1994, **21**, 18-21.

MACMILLAN A. Conventional serological tests, p. 153-197. *In*: Nielsen, K., Ducan R. (Eds), Animal Brucellosis, CRC Press, Orlando, 1990.

MACMILLAN A. Reactions sérologiques non spécifiques en brucellose bovine à Guernesey. In Proceedings : Acquis de la recherche sur les reactions serologiques non spécifiques en brucellose, Colloque national du 11 janvier 1995, CNEVA Maisons-Alfort, Paris, 1995, 25-26.

NAESSENS J., GODDEERIS B. Immunoglobulines, p. 456-459. In: Pastoret, P.-P., Griebel, P., Bazin, H., Govaerts, A. (Eds), Handbook of vertebrate immunology, Academic Press, California, 1998.

NAKANE P.K., KAWAÏ A. Peroxydase-labelled antibody, a new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.*, 1974, **22**, 1084-1091.

NIELSEN K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet. Microbiol.*, 2002, **90**, 447-459.

NIELSEN K.H., SAMAGH B.S., SPECKMANN G., STEMSHORN B. The bovine immune response to *Brucella abortus*. II. Elimination of some sporadic serological reactions by chelation of divalent cations. *Can. J. Comp. Med.*, 1979, **43**, 420-425.

NIELSEN K., SMITH P., GALL D., PEREZ B., COSMA C., MUELLER P., TROTTIER J., COTE G., BOAG L., BOSSE J. Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in milk. *Vet. Microbiol.*, 1996, **52**, 165-173.

OMER M.K., SKJERVE E., MACMILLAN A.P., WOLDEHIWET Z. Comparison of three serological tests in the diagnosis of *Brucella* infection in unvaccinated cattle in Eritrea. *Prev. Vet. Med.*, 2001, **48**, 215-222.

POUILLOT R., GARIN-BASTUJI B., GERBIER G., COCHE Y., CAU C., DUFOUR B., MOUTOU F. The Brucellin skin test as a tool to discriminate false positive serological reactions in bovine brucellosis. *Vet. Res.*, 1997, **28**, 365-374.

POUILLOT R., LESCOAT PH., GARIN-BASTUJI B., REPIQUET D., TERRIER P., GERBIER G., BENET J.J., SANAA M. Risk factors for false-positive serological reactions for bovine brucellosis in Saône-et-Loire (France). *Prev. Vet. Med.*, 1998, **35**, 165-179.

ROONEY K. Brucellosis investigation – Taranaki. *Surveillance*, 1993, **20(2)**, 15-18.

SAEGERMAN C., PELZER P. Les réactions sérologiques faussement positives dans la cadre du dépistage de la brucellose bovine dans la 18<sup>ème</sup> circonscription vétérinaire. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de diplômé en épidémiologie animale appliquée, Ecole Nationale Vétérinaire, Maisons-Alfort, France, 1992, 63 pp.

SAEGERMAN C., WEYNANTS V., VO T. K-O., DE WAELE L., TIBOR A., DENOEL P.A., GODFROID J., MICHEL P., SAMAN E., LETESSON J.-J., LIMET J.N. Evaluation de l'activité protectrice de la fraction de la paroi de *Brucella* insoluble dans le SDS et identification d'antigènes de *Brucella* utilisables pour le diagnostic, p. 221-233. In: AUPELF-UREF Edition, Biotechnologies du Diagnostic et de la Prévention des Maladies Animales. John Libbey Eurotext, Paris, 1994.

SAEGERMAN C., THIANGE P., LIMBOURG B., CONOTTE G., PETIT N., THIRY G., BOTTON Y., PELZER P., MULLIER P., GODFROID J., DUFEY J. Etude épidémiologique descriptive et identification de facteurs de risque des réactions sérologiques faussement positives en brucellose bovine dans le sud de la province de Namur (Belgique). VIII Symposium International d'Epidémiologie et d'Economie Vétérinaire, Paris, 8-11 juillet, 1997. *Epidémiol. santé anim.*, 1997, **32**, 08.04.1-08.04.3.

SAEGERMAN C., VO T. K-O., DE WAELE L., GILSON D., BASTIN A., DUBRAY G., FLANAGAN P., LIMET J.N., LETESSON J.-J., GODFROID J. Bovine brucellosis diagnosis by skin test : conditions for its use and evaluation of its performance. *Vet. Rec.*, 1999, **145**, 214-218.

SAMARTINO L., GALL D., GREGORET R., NIELSEN K. Validation of enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. Microbiol.*, 1999, **70**, 193-200.

SARAVI M.A., WRIGHT P.F., GREGORET R.J., GALL D.E. Comparative performance of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and conventional assays in the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1995, **47**, 93-99.

SCHEIBNER E. Spezifitätsgrenzen de brucellose langsamagglutination. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 1976, **89**, 300-302.

STATACORP. Stata Statistical Software: Release 8. College Station, TX: Stata Corporation, 2003.

STEMSHORN B.W., FORBES L.B., EAGLESOME M.D., NIELSEN K.H., ROBERTSON F.J., SAMAGH B.S. A comparison of standard serological tests for the diagnosis of bovine brucellosis in Canada. *Can. J. Comp. Med.*, 1985, **49**, 391-394.

THIANGE P., SAEGERMAN C., BOTTON Y., LIMET J.N. Brucellose bovine : le test d'agglutination en présence du facteur rhumatoïde après traitement du sérum par le dithiothréitol, dans la différenciation des animaux vaccinés et infectés. *Ann. Méd. Vét.*, 1992, **136**, 471-476.

TRAP D., GARIN B., MOUTOU F., GAUMONT R. Brucellose bovine : élimination des séroagglutinations non spécifiques par l'emploi de l'EDTA et de l'agglutination à 56°C. *Revue Med. Vét.*, 1985, **130 (5)**, 399-409.

UZAL F.A., CARRASCO A.E., NIELSEN K., DE ECHAIDE S., CABRERA R.F. An indirect ELISA using a monoclonal anti IgG<sub>1</sub> enzyme conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. Microbiol.*, 1996, **52**, 175-1980.

VANZINI V.R., AGUIRRE N., LUGARESII C.I., DE ECHAIDE S.T., DE CANAVESIO V.G., GUGLIELMONE A.A., MARCHESINO M.D., NIELSEN K. Evaluation of an indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle in Argentina. *Prev. Vet. Med.*, 1998, **36**, 211-217.

VANZINI V.R., AGUIRRE N.P., VALENTINI B.S., TORIONI D., DE ECHAIDE S., LUGARESII C.I., MARCHESINO M.D., NIELSEN K. Comparaison of an indirect ELISA with the Brucella milk ring test for detection of antibodies to *Brucella abortus* in bulk milk samples. *Vet. Microbiol.*, 2001, **82**, 55-60.

WEYNANTS V., TIBOR A., DENOEL P.A., SAEGERMAN C., GODFROID J., THIANGE P., LETESSON J-J. Infection of cattle with *Yersinia enterocolitica* O:9 a cause of the false positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic tests, *Vet. Microbiol.*, 1996, **48**, 101-112.

## **Article 6**

**Diagnostic de la brucellose bovine  
à l'aide du test cutané :  
conditions d'utilisation du test et  
évaluation de ses performances**

## Résumé

Le Brucellergene OCB (Rhône-Mérieux, Lyon, France) a été utilisé comme allergène pour définir les paramètres intrinsèques du test cutané et pour comparer ses propriétés avec le diagnostic sérologique de la brucellose bovine. Le test cutané a également été évalué pour sa capacité à résoudre des problèmes associés aux réactions sérologiques faussement positives. Le délai optimal de lecture du test cutané était de 72 heures. L'intensité de la réaction allergique lors de brucellose était 2 à 3 fois moins importante que la réaction allergique lors de tuberculose. Une augmentation égale ou supérieure à 1,1 mm de l'induration du pli de peau a été considérée comme un seuil adéquat. La spécificité calculée pour 1192 animaux officiellement indemnes de brucellose (incluant des animaux provenant de troupeaux officiellement indemnes de brucellose où des réactions sérologiques faussement positives avaient été enregistrées) était de 99,83 % (intervalle de confiance 95 % [IC95 %] : 99,40 - 99,98 %). La sensibilité déterminée au départ de 27 génisses infectées expérimentalement variait de 93 % (IC95 % : 76-100 %) à 78 % (IC95 % : 58-91 %) quand elle était mesurée respectivement 1 à 6 mois après l'infection. Les réactions allergiques peuvent être détectées chez les animaux vaccinés jusqu'à 4,5 années après la vaccination. D'un autre côté, aucune sensibilisation des animaux naïfs n'a été enregistrée après 8 injections mensuelles de l'allergène. Dans cette étude, le test cutané a donné des informations de valeur, lorsqu'il était utilisé en combinaison avec les tests sérologiques, dans le cas d'infection brucellique aiguë et chronique. Le test cutané discriminait clairement la brucellose de réactions sérologiques faussement positives dues à des infections par *Yersinia enterocolitica* O:9.

**Diagnosis of bovine brucellosis by skin test:  
conditions for the test and  
evaluation of its performance**

C. Saegerman<sup>1</sup>, T-K. O. Vo<sup>1</sup>, L. De Waele<sup>1</sup>, D. Gilson<sup>1</sup>, A. Bastin<sup>1</sup>, G. Dubray<sup>2</sup>,  
P. Flanagan<sup>3</sup>, J.N. Limet<sup>1</sup>, J-J. Letesson<sup>1</sup>, J. Godfroid<sup>3</sup>

1. Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, 61 rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgium
2. Institut national de la recherche agronomique, Laboratoire de pathologie et immunologie, F-37380 Nouzilly, France
3. Veterinary and Agrochemical Research Center, 99 Groeselenberg, B-1180 Bruxelles, Belgium

***The Veterinary Record*, 1999, 145, 214-218.**

## Abstract

Brucellergene OCB (Rhône-Mérieux, Lyon, France) was used as an allergen to define the intrinsic parameters of a skin test and to compare its properties with serology for the diagnosis of bovine brucellosis. The skin test was also evaluated for its capacity to solve problems associated with false positive reactions in serological tests. The optimal reading delay for the skin test was 72 hours. The brucellosis allergic reaction was two to three times less intense than the tuberculosis allergic reaction. A increase of 1.1 mm or more skin thickness was therefore considered to be an adequate cut-off. The specificity calculated for 1192 brucellosis-free animals (including animals from brucellosis-free herds in which false positive serological reactions had been reported) was 99.83 per cent (95 per cent confidence interval [CI]: 99.40-99.98 per cent). The sensitivity determined from 27 experimentally infected heifers ranged from 93 per cent (95 per cent CI 76 to 100 per cent) to 78 per cent (95 per cent CI 58 to 91 per cent) when measured respectively one and six months after the infection. Allergic reactions could be detected in vaccinated animals up to four-and-a-half years after the vaccination. On the other hand, no sensitisation has been recorded in naïve animals after as many as eight monthly injections of the allergen. The skin test gave valuable information, in combination with serological tests, in both acute and chronic brucellosis. The skin test discriminated clearly brucellosis from false positive serological reactions due to infections with *Yersinia enterocolitica* O:9.



## 1. Introduction

*Brucella* allergens have been used for the diagnosis of brucellosis in sheep, goats and cattle (Cunningham and others, 1980; Fensterbank 1986; Bercovich and others, 1989; Blasco and others, 1994; Pouillot and others, 1997). Several preparations have been described, but only the Brucellergene OCB (Rhône-Mérieux) (the commercial equivalent of the brucellin, and developed at the National Institute of Agronomic Research, Nouzilly, France) is widely used (Plommet, 1984). Observations in cattle indicated that the skin test (ST) can complement the serological tests and should be used as a supplementary test to test animals which are introduced into uninfected herds, to improve the detection of infected animals during acute outbreaks, and to resolve ambiguous serological results (Fensterbank 1977; Cunningham and others, 1980; Bercovich and others, 1989). Since 1990, unusually high rates of positive reactions have been observed in bovine brucellosis serological tests in the European Union (EU) (MacMillan, 1990; Dufey, 1992; Pouillot and others, 1997) and in New Zealand (Hilbink and others, 1995). As a result of the absence of epidemiological, clinical or bacteriological link with a *Brucella abortus* infection, these reactions were termed false positive serological reactions (FPSR). At present, no single serology test can discriminate these FPSR from *B. abortus*-induced reactions (Kittleberger and others, 1995); tests based on the cellular immune response may partly solve this problem (Weynants and others, 1995; Pouillot and others, 1997), but these tests are not officially recognized in the EU.

The present study presents data for optimising the ST using Brucellergene OCB as allergen for brucellosis diagnosis. The allergic reactions to bovine tuberculosis and bovine brucellosis were compared. Factors, such as the reading delay, the possible sensitisation of naïve animals, and the interpretation of the allergic reactions in the context of brucellosis infections, vaccinations or FPSR, were investigated. The sensitivity and specificity of the ST and the optimum time for detecting a *B. abortus* infection were evaluated either in the field or in experimentally infected animals. Finally, the results of ST were compared with serological results, including the results of enzyme-linked-immunosorbent assays (ELISA).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Skin testing procedure and allergens

Ten square centimetres of healthy, clean skin on the side of the neck was sheared with scissors or electric clippers. A tuberculin syringe with a 4 mm needle was used to inject 100  $\mu$ l of Brucellergene OCB intradermally. The reaction was read three days after the injection. Palpation of the injection site was the primary technique for evaluating the reaction. The visible and/or palpable reaction was quantified by measuring the diameter of the swelling. A spring skin meter (Aesculap, Tuttlingen, Germany) was used to compare the difference in skin thickness at the injection site with a fold of healthy skin adjacent to the site.

Brucellergene OCB (batch 96G091, kindly provided by Rhône-Mérieux, Lyon, France), prepared from *Brucella melitensis* B115 rough strain, is composed mainly of cytoplasmic proteins but contains some lipopolysaccharide (LPS) antigen (Cloekaert and others, 1992). The protein content, estimated by the Lowry technique was 1.4 mg/ml.

Bovine PPD tuberculin from *Mycobacterium bovis* Vallée strain (batch 89J05) was a gift from Dr. Desmecht (Veterinary and Agrochemical Research Centre in Brussels, Belgium).

### 2.2. Serology

#### 2.2.1. Classical tests

The standard tube agglutination test in the presence of EDTA (SAW-EDTA) and the complement fixation test (CFT) were performed as previously described (Alton and others, 1988). In the EU the legal cut-off for the SAW-EDTA and CFT are 30 IU/ml and 20 EECU/ml, respectively.

#### 2.2.2. Indirect ELISA

The protocol for the iELISA has been described by Limet and others (1988). The results are expressed in antibody units. The optical densities were converted into U/ml by interpolating eight dilutions (1/1000 to 1/128,000) of a national reference serum (1200 EECU/ml in the CFT) to draw a calibration curve. The curves were fitted and values interpolated by using DeltaSoft II.3 software (Biometallics, Princeton, USA). A four-parameter logistic equation gave the best fit and the most accurate calculation. Titres in i-ELISA equal to or greater than 2.5 U/ml were considered to be positive.

## 2.3. Bacterial strains

For the experimental infections, *Pasteurella multocida*, *Salmonella urbana* and *Xanthomonas maltophilia* were obtained from the Veterinary and Agrochemical Research Center in Brussels. Field strains of *Escherichia coli* O:157 and *Yersinia enterocolitica* O:9 strains were isolated by B. Limbourg of faeces from animals in herds in which FPSR had been recorded.

## 2.4. Animals

### 2.4.1. Experimentally infected animals

Forty-two Holstein heifers imported from brucellosis-free areas of France (Morbihan and Finistère) were experimentally infected. Fifteen heifers were infected either intranasally or orally with *E. coli* O:157 ( $n = 2$ ), *P. multocida* ( $n = 2$ ), *X. maltophilia* ( $n = 2$ ), *S. urbana* ( $n = 3$ ) and *Y. enterocolitica* O:9 ( $n = 6$ ). Twenty seven pregnant heifers were infected by the conjunctival route with  $16.6 \times 10^6$  *B. abortus* strain 544; 10 of them had been vaccinated with the *B. abortus* B19 vaccine three months they were infected.

### 2.4.2. Feedlot animals

Non pregnant heifers and cows entering the feedlots ( $n = 206$ ) originated from 29 brucellosis field outbreaks. Most of these animals were not vaccinated.

### 2.4.3. Field animals

Brucellosis-free animals ( $n = 562$ ), originating from brucellosis-free herds in regions which had been brucellosis-free for at least 10 years, brucellosis-free animals ( $n = 609$ ) originating from 16 officially brucellosis-free herds located in a region where FPSR were common and 21 animals, displaying FPSR, originating from 10 other officially brucellosis-free herds were used to determine the cut-off and the specificity of the ST and to compare the results of the serological tests and the ST. Seventy-five animals were vaccinated with the B19 vaccine to evaluate the duration of sensitisation in the ST. *B. abortus* infected animals ( $n = 612$ ) originating from 39 brucellosis outbreaks, where abortions due to *B. abortus* biotype 3 or 9 occurred, were used to determine the optimal reading delay of the ST, to compare the intensity of the allergic reaction and to determine the sensitivity of the ST. Finally, these animals were used to measure the correlation between the serology results and the ST and to validate the cut-off of the ST.

*Mycobacterium bovis* infected animals ( $n = 39$ ) originating from a herd, where *M. bovis* had been isolated from slaughtered animals, were used to compare the intensity of the allergic reaction.

### 3. Results

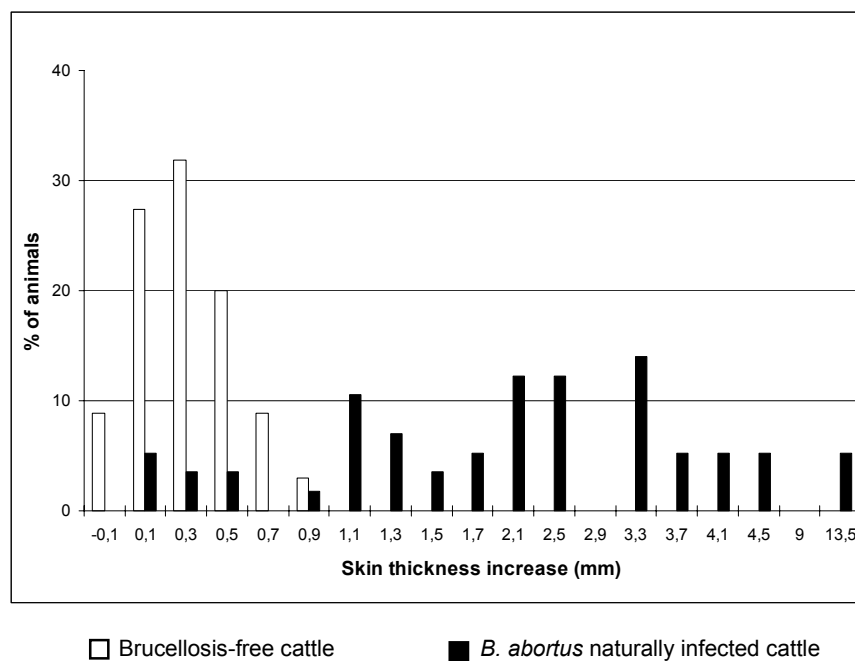
#### 3.1. Optimisation and cut-off of the ST

The optimal delay for reading the allergic reaction was analysed in animals naturally infected with *B. abortus*. The ST was performed one to five times in 67 pregnant cows at monthly intervals. The reaction was read daily for four days. Both the size of the reaction and the number of animals with a positive reaction reached maximum values 72 hours after injection (data not shown).

The changes in skin thickness, 72 hours after the intradermal injection of 100 µl sterile saline solution were recorded for 138 brucellosis-free animals. The skin thickening was compared for 135 brucellosis-free and 57 *B. abortus* infected animals. After being injected with sterile saline solution, one animal out of 111 Belgian White-Blue and two animals out of 27 Holstein presented skin thickness increases of 1 mm. Regardless of the breed, more than 80% of the animals had skin increases of less than 0.5 mm.

The distribution of the observed values for 135 non-infected animals and for 57 naturally infected animals is depicted in figure 1. An increase of 1.1 mm or more appears to be an adequate cut-off because no false positive reactions were observed although not all infected animals were classified as positive.

**Figure 1. Increases in skin thickness observed in 135 brucellosis-free cattle and in 57 cattle naturally infected with *B. abortus*.**



The allergic reaction induced by Brucellergene OCB in *B. abortus* infected animals was more difficult to read than the reaction induced by bovine PPD tuberculin in *M. bovis* infected animals. The increase in skin thickness to the brucellosis-specific reaction was one-half to one-third that of the tuberculosis-specific reaction (Table 1).

**Table 1. Means and 95 per cent confidence interval of increases in skin thickness for positive PPD tuberculin and Brucellergene OCB skin tests.**

Tuberculosis (PPD Tuberculin)	Brucellosis (Brucellergene OCB)			
	Experimental infection	Feedlot	3 infected herds	Vaccinated herds
Field outbreak				
39 dairy cattle	27 heifers (3)	206 animals (4)	125 animals	75 animals
Np = 31 (1)	Np = 25	Np = 170	Np = 8	Np = 40
Mean = 7.04 mm CI95% (2): (5.22-8.86 mm)	Mean = 4.16mm CI95%: (3.43-4.89 mm)	Mean = 3.62 mm CI95%: (3.39-3.85 mm)	Mean = 2.32 mm CI95%: (1.43-3.21 mm)	Mean = 2.67 mm CI95%: (2.33-3.01 mm)

(1) Number of positive results; (2) Confidence interval 95 per cent ; (3) The ST was performed 26 days after the experimental infection ; (4) These animals were tested from one to eight times. Successive ST were always performed at one month intervals. A total of 922 ST were performed

### 3.2. Absence of sensitisation in naïve animals

No sensitisation was recorded in 103, 20, 22, 13, 11, 3, 7 and 10 brucellosis-free animals that were tested 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 times, respectively. Indeed, these repeated intradermal injections did not induce detectable anti-LPS antibodies demonstrated by the negative serology results, and the absence of sensitisation of T cells as demonstrated by the absence of an allergic reaction in the ST.

### 3.3. Determination of the intrinsic values of the skin test

#### 3.3.1. Specificity

All field animals originated from a region which had been officially brucellosis-free for at least 10 years. According to the serological reactions, the herds were divided in two groups: herds without a history of FPSR and herds with episodes of FPSR. None of the 562 animals from 11 herds with no FPSR, developed an allergic reaction (1.1 mm), 72 hours after the injection. The absence of brucellosis in this region was confirmed for the 4 following years; thus, the specificity for this group was 100 per cent (95 per cent CI 99.47 to 100 per cent). Among the 609 animals originating from 16 herds located in a region where FPSR were common, three

animals presented FPSR but none showed an allergic reaction. Four years later, these herds were still brucellosis-free. On the other hand, two ST positive animals originating from two different herds were seronegative. A retrospective study showed that the animal with the strongest allergic reaction (2.2 mm) was bought from a farm where all animals had been vaccinated. The remaining ST reactor was born in a farm where no vaccination had been done. The specificity for this group is 99.67 per cent (95 per cent CI 98.82 to 99.96 per cent). None of the 21 FPSR animals (originating from 10 other herds) showed an allergic reaction. The specificity of the ST for these 1192 animals was estimated to be 99.83 per cent (95 per cent CI 99.40 to 99.98 per cent).

Holstein heifers ( $n = 15$ ) were infected experimentally with different bacteria known to induce serological cross-reactions with the *B. abortus* S-LPS (Corbel, 1985) (Table 2). *E. coli* O:157 and *S. urbana* induced an induration limited to the injection site. The reaction in *X. maltophilia* was clinically different from the true allergic reaction induced in *Brucella* infected cattle, because an acute inflammatory reaction was already observed after only 24 hours, and the reaction was more intense after 24 hours than after 48, 72 or 96 hours, although an increase in the skin thickness of 2 mm was recorded after 72 hours. None of the 6 animals infected with *Y. enterocolitica* O:9 showed an allergic reaction.

**Table 2. Increases in skin thickness as a result of experimental infection with cross-reacting bacteria.**

Number of Holstein heifers	Bacteria inoculated	Dose (billions of cells)	Inoculation route	Number of ST per animal (1)	Number of ST positive results	Skin thickness increase (mm)
2	<i>E. coli</i> O:157	1800	per os	1	1	2.0
1	<i>X. multocida</i>	240	per os	1	0	-
1	<i>X. multocida</i>	660	intranasal	4	0	-
2	<i>X. maltophilia</i>	1050	intranasal	4	1	1.4
2	<i>S. urbana</i>	600	per os	1	1	1.6
1	<i>S. urbana</i>	725	per os	4	1	1.7
4	<i>Y. enterocolitica</i> O:9	725	per os	2	0	-
2	<i>Y. enterocolitica</i> O:9	1000	per os	4	0	-

(1) Animals were tested from one to four times. Successive ST were always performed at one month intervals.

### 3.3.2. Sensitivity

Sensitivity was determined on 27 *Brucella* experimentally infected heifers. The sensitivity decreased from 93 per cent (95 per cent CI 76 to 100 per cent) to 78 per cent (95 per cent CI 58 to 91 per cent) from 26 to 187 days post-infection (cut-off: 1.1 mm) (Table 3).

**Table 3. Sensitivity of the skin test in 27 experimentally infected animals ( $16.6 \times 10^6$  *B. abortus* strain 544 via the conjunctival route) assessed at four different cut-off values.**

Days after infection	Sensitivity (%) of the ST (95% confidence interval)			
	Cut-off (mm)			
	1.0	1.1	1.5	2.0
26	96 (81-100)	93 (76-100)	93 (76-100)	85 (66-96)
117	96 (81-100)	89 (71-98)	85 (66-96)	70 (50-86)
187	81 (62-94)	78 (58-91)	63 (45-81)	52 (33-71)

### 3.4. Persistence of the allergic reaction induced by vaccination

Charolais heifers and cows ( $n = 180$ ) were vaccinated at different ages by subcutaneous injection or by conjunctival instillation with the B 19 vaccine at different doses (Table 4). Positive reactions were observed for up to 19 months in up to 61.5 per cent of the animals subcutaneously vaccinated when they were more than 12 months old. Positive reactions were even recorded in three out of six animals vaccinated 55 months previously. The intensity of the reaction decreased more rapidly in animals vaccinated when they were younger than 6 months of age. Generally, subcutaneous vaccination resulted in allergic reactions that were more intense and longer lasting than the conjunctival vaccinations.

**Table 4. Persistence of the allergic reaction after vaccination with the live *B. abortus* B19 vaccine.**

Delay after vaccination	Number of animals tested	Number (%) of positive animals	Mean of skin thickness increase (> 1.1 mm)	Standard deviation
<b>Subcutaneous vaccination</b>				
<i>a) 4 to 6 months old heifers (<math>3 \times 10^9</math> cells)</i>				
2 months	10	5 (50 %)	2.98	1.93
5 months	10	6 (60 %)	2.25	0.75
14 months	32	11 (34.4 %)	2.39	1.21
17 months	19	9 (47.4 %)	2.28	1.13
40 months	4	1*	2.70	-
53 months	3	1*	7.80	-
<i>b) more than 12 months old heifers and cows (<math>0.65 \times 10^9</math> cells)</i>				
16 months	28	15 (53.6 %)	2.98	1.01
19 months	26	16 (61.5 %)	3.00	0.90
55 months	6	3*	5.17	2.47
<b>Conjunctival vaccination in heifers and cows</b>				
<i>first vaccination (<math>3 \times 10^9</math> cells), boost 4 months later (<math>5 \times 10^9</math> cells)</i>				
16 months	21	6 (29 %)	2.07	0.99
19 months	20	9 (45 %)	2.74	1.46
54 months	1	1*	3.5	-

\*: all serology results were negative

### 3.5. Correlation between the skin test and the serological results

The frequencies observed for the different combinations of positive results in the serology tests and the ST are depicted in table 5 for three groups of animals: feedlot animals, animals in infected herds, and animals in herds with FPSR.

Of the 309 positive results from the feedlot animals (latent or chronic infection), nearly 15 per cent were positive for all tests; 16 per cent were positive for the ST alone; 11 per cent were positive for both classical tests and iELISA; and nearly 30 per cent were positive for the iELISA alone. The ST was positive in 25 per cent of the cases with a positive iELISA result and a negative classical serology result. In acutely infected herds the distribution of the results was slightly different, with more animals uniquely positive to iELISA. However, in these herds, the agreement between the ST and the classical serology tests results was high (Kappa coefficient: 0.70) and low when the infection was latent or chronic (Kappa coefficient: 0.27). Compared with the classical serology tests, the ST alone detected more infected animals.

In brucellosis-free herds, the ST was always negative for animals presenting FPSR, contrary to what is observed in groups of animals where a *B.abortus* infection occurred. There was no agreement between the ST and the classical serology tests results in these herds (Kappa coefficient: < 0).

Moreover, twenty-six days after experimental infection, all the 27 animals were positive for the iELISA, 25 were positive for the ST and only 22 were positive for the classical serology tests.

**Table 5. Correlation between the serological results and the results of the skin test**

			non pregnant females in feedlots		7 infected herds		16 herds with FPSR serology	
			922 observations (3)		363 animals		609 animals	
Number of positive tests			309		88		27	
Combinaison of positive test(s) observed								
C.T. (1)	iELISA (2)	ST	n	%	n	%	n	%
+	+	+	46	14.9	32	36.4	0	0
-	+	-	92	29.8	33	37.5	22	81.5
-	+	+	79	25.6	11	12.5	0	0
-	-	+	50	16.2	6	6.82	2*	7.4
+	+	-	36	11.7	6	6.82	3	11.1
+	-	-	4	1.3	0	0	0	0
+	-	+	2	0.6	0	0	0	0

(1) Classical tests: SAW-EDTA (cut-off: 30 UI/ml) and CFT (cut-off: 20 EECU/ml) ; (2) iELISA (cut-off: 2.5 U) ; (3) 206 animals were tested from one to eight times. Successive ST were always performed at one month intervals. A total of 922 ST were performed ; \*: The 2 ST positive animals were classified as negative in the serology tests



## 4. Discussion

An ideal allergen should not modify the immune status of the animal in a way which could interfere with future diagnosis. Contrary to what has been observed by others, using other *Brucella* allergens (Cunningham and others, 1980; Bercovich and others, 1996), when Brucellergene OCB was injected monthly for as many as 8 times, it did not induce any detectable anti-LPS antibodies demonstrated by the negative serology results, nor sensitisation of T cells demonstrated by the absence of allergic reaction in the ST.

The allergic reaction induced by Brucellergene OCB in *B. abortus* infected animals was 2 to 3 times less intense than the reaction induced by PPD tuberculin in *M. bovis* infected animals. Under field circumstances, our results suggest that all visible and/or palpable reactions should be considered positive for the ST as suggested previously (Plommet, 1984).

True ST positive and negative reactions can be rapidly classified by simple observation of the injection site and by palpation. However, for some doubtful cases and in order to quantify the reaction, the measurement of skin thickening with a spring skin meter is recommended. Although a cut-off of 2 mm is legally prescribed for the tuberculosis ST and has been proposed for a brucellosis ST (Bercovich and others, 1993), this value is not suitable for the Brucellergene OCB ST which has a very low sensitivity at this level, ranging from about 85 per cent one month after experimental infection to 52 per cent after six months (Table 3).

According to the cut-off of 1.1 mm defined in this work, the specificity calculated for a total of 1192 brucellosis-free animals (with or without FPSR) was 99.83 per cent (95 per cent CI 99.40 to 99.98 per cent). However, few positive results remained for animals experimentally infected with *E. coli* O:157, *S. urbana* and *X. maltophilia*. The sensitivity of the ST varied from 93 per cent (95 per cent CI 76 to 100 per cent) to 78 per cent (95 per cent CI 58 to 91 per cent) according to the testing delay after experimental infection. These values for the specificity and the sensitivity agree with published results (MacDiarmid, 1987, Pouillot and others, 1997).

It is known that *B. abortus* infected animals with elevated serological results may be unreactive in the ST (Bercovich and others, 1989). In our study, this phenomenon was also observed in 10 out of 35 animals where values equal to or greater than 100 EECU in the CFT were recorded and in 17 out of 70 animals where values equal to or greater than 30 U in the iELISA were recorded.

In a previous study, sensitisation in vaccinated animals were reported to last for about 2 years (Plommet and Fensterbank, 1976). In our study, reactions were observed more than four years

after vaccination, regardless of the age of the animals or the vaccination route. Thus, the vaccination status of the animal should always be included in the interpretation of the ST.

Other parameters that could cause variations in the results were also investigated. In particular, differences in measurement techniques and operators were considered. The concordance with the 1.1 mm cut-off was excellent regardless of which reading method was used (192 results, Kappa coefficient 0.81) and who did the reading (207 results, 6 readers, Kappa coefficient 0.86).

In this study, the Brucellergene OCB ST was found to be specific, providing important information in FPSR cases as reported in France (Pouillot and others, 1997). The ST complements serology tests. Indeed, although the greatest number of experimentally infected animals or infected animals originating from naturally infected herds as well as from the feedlots was detected by the iELISA, more animals were detected by the ST than by the classical serological tests.

Altogether, our results suggest, as proposed previously, that the ST is a good herd test to monitor the disease in an area with a low disease prevalence, if the herd size is sufficient (Cunningham and others, 1980; MacDiarmid, 1987). These data provide support for the implementation of the ST as an official herd test for brucellosis (European Directive 64/432/EEC), particularly when monitoring is made difficult in the context of FPSR.

## **5. Acknowledgments**

This work was supported by a grant from the Ministère fédéral de l'agriculture (IRSIA, convention 5387 A), the Association centrale de santé animale and the Ministère de la région wallone pour l'agriculture. The authors's thanks are first for anonymous farmers who took part in our investigations. We also acknowledge the help we received from the staff of the veterinary laboratories at Erpent, Loncin, Marloie, and Mons and from the staff of the experimental station of the Veterinary and Agrochemical Research Centre. Finally, we would particularly like to thank Dr. Moutschen, Dr. F. Moreau, J-L. Delaunay, N. Petit, C. Maudoux, P. Scohy, G. Herman and S. Mahoudens for their logistic help.

## 6. References

ALTON G.G., JONES L.M., ANGUS R.D., VERGER J.M. Techniques for the brucellosis laboratory, 1st ed. Paris, INRA, France, 1988, 190 pp.

BERCOVICH Z., LAGENDIJK W., BOKHOUT B.A. Evaluation of a delayed-type hypersensitivity test for the diagnosis of *Brucella abortus* infection in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1989, **21**, 213-218.

BERCOVICH Z., HAAGSMA J., VAN LIPZIG J. H., TAAIJKE R. Specificity of the skin delayed-type hypersensitivity test in brucellosis free cattle tested with a *Brucella* allergen. *Zentralblatt-Veterinarmedizin-B*, 1993, **40**, 582-588.

BERCOVICH Z., MUSKENS J. A. The sensitizing effect of a *Brucella abortus* antigen in cattle after repeated intradermal inoculations. *Veterinary Microbiology*, 1996, **51**, 85-93.

BLASCO J. M., MARIN C., JIMENEZ DE BAGUES M., BARBERAN M., HERNANDEZ A., MOLINA L., VELASCO J., DIAZ R., MORIYON I. Evaluation of allergic and serological tests for diagnosing *Brucella melitensis* infection in sheep. *Journal of Clinical Microbiology*, 1994, **32**, 1835-1840.

CLOECKAERT A., ZYGMUNT M. S., NICOLLE J-C., DUBRAY G., LIMET J.N. O-chain expression in the rough *Brucella melitensis* strain B115: induction of O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies and intracellular localization demonstrated by immunoelectron microscopy. *Journal of General Microbiology*, 1992, **138**, 1211-1219.

CORBEL M. J. Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross-reaction. *Veterinary Bulletin*, 1985, **55**, 927-942.

CUNNINGHAM B., MILER J.J., DOLAN L., McKEON F., O'MEARA M. Immunological characteristics in cattle of allergens derived from smooth *Brucella abortus* S99. *Veterinary Record*, 1980, **107**, 369-375.

DUFEY J. Le dépistage confronté aux réalités du terrain. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 1992, **136**, 281-283.

FENSTERBANK R. Allergic diagnosis of bovine brucellosis. 2. Use of the allergic test in infected herds. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1977, **8**, 195-201.

FENSTERBANK R. Brucellose des bovins et des petits ruminants: diagnostic, prophylaxie et vaccination. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, 1986, **5**, 587-603.

HILBINK F., FENWICK S. G., THOMPSON E. J., KITTELBERGER R., PENROSE M., ROSS G. P. Non-specific seroreactions against *Brucella abortus* in ruminants in New-Zealand and the presence of *Yersinia enterocolitica* O:9. *New Zealand Veterinary Journal*, 1995, **43**, 175-178.

KITTELBERGER R., HILBINK F., HANSEN F., PENROSE M., de LISLE G. W., LETESSON J-J., GARIN-BASTUJI B., SEARSON J., FOSSATI C. A., CLOECKAERT A., SCHURIG G. Serological crossreactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9. Immunoblot analysis of the antibody response to *Brucella* protein antigens in bovine brucellosis. *Veterinary Microbiology*, 1995, **47**, 257-270.

LIMET J.N., KERKHOFS P., WIJFFELS R., DEKEYSER P. Le diagnostic sérologique de la brucellose bovine par ELISA. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 1988, **132**, 565-575.

MACDIARMID S.C. A theoretical basis for the use of a skin test for brucellosis surveillance in extensively-managed cattle herds. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, 1987, **6**, 1029-1035.

MACMILLAN A. Conventional serological tests. In *Animal Brucellosis*: Eds K. Nielsen, J.R. Duncan, Boca Raton, CRC Press, 1990, 153-197.

PLOMMET M. Les dernières étapes de la prophylaxie de la brucellose bovine. *Bulletin de la Société Vétérinaire Pratique de France*, 1984, **68**, 507-520.

PLOMMET, M., FENSTERBANK R. Vaccination against bovine brucellosis with a low dose of strain 19 administered by the conjunctival route. III. Serological response and immunity in the pregnant cow. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1976, **7**, 9-23.

POUILLOT R., GARIN-BASTUJI B., GERBIER G., COCHE Y., CAU C., DUFOUR B., MOUTOU F. The Brucellin skin test as a tool to discriminate false positive serological reactions in bovine brucellosis. *Veterinary Research*, 1997, **28**, 365-374.

WEYNANTS V., GODFROID J., LIMBOURG B., SAEGERMAN C., LETESSON J-J. Specific bovine brucellosis diagnosis based on in vitro antigen-specific gamma interferon production. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, **33**, 706-712.

## **Chapitre 6**

### **Identification d'un indicateur du stade épidémiologique d'un événement rare**

### **Choix d'un indicateur de la courbe épidémique de l'encéphalopathie spongiforme bovine**

*« Tout ce qui est simple est faux.*

*Tout ce qui est compliqué est inutilisable »*

*Paul Valéry*

## Préambule

L'article 7 décrit l'identification d'un nouvel indicateur de la courbe épidémique de l'encéphalopathie spongiforme bovine dans un pays. L'obtention et le calcul de cet indicateur sont aisés et ne nécessitent pas la mise à disposition d'un catalogue exhaustif de tous les cas d'ESB. Cette contribution repose, d'une part, sur l'analyse des informations cliniques et épidémiologiques disponibles et, d'autre part, sur la discussion d'hypothèses scientifiques plausibles. Elle apporte une meilleure compréhension de l'ESB. L'efficacité d'un réseau d'épidémiosurveillance ne peut être appréciée qu'à travers des évaluations régulières et/ou l'élaboration et le suivi en continu d'indicateurs de performance.



## **Article 7**

**L'évolution de l'âge à la détection des bovins atteints  
d'encéphalopathie bovine spongiforme :  
un bon indicateur de la courbe épidémique**

## Résumé

Avant le 1<sup>er</sup> janvier 2004, 118 cas d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) ont été recensés en Belgique. Nous analysons l'évolution de l'âge à la détection de ces cas et nous essayons d'utiliser ce paramètre comme un outil de prédiction robuste du statut épidémique actuel dans le pays. Les variables indicatrices suivantes ont été considérées : la date de naissance, la race, la date et le mode de détection, le nombre mensuel et l'âge des animaux abattus et délivrés au clos d'équarrissage. L'âge à la détection en fonction de la date de naissance est un très pauvre indicateur épidémiologique. Nous concluons que l'augmentation de l'âge des cas d'ESB au moment de la détection est due à la diminution du nombre de cas (absence de nouvelles infections et les cas détectés deviennent ainsi plus âgés) et qu'il s'agit d'un indicateur fiable du début de la décroissance de la courbe épidémique en Belgique. Ce paramètre peut être utilisé dans les situations où le nombre absolu de cas ne peut être déterminé avec exactitude.

## **Trends in age-at-detection in Bovine Spongiform Encephalopathy cases: a useful indicator of the epidemic curve**

### **Article original**

Claude Saegerman<sup>1</sup>, Niko Speybroeck<sup>2</sup>, Emmanuel Vanopdenbosch<sup>3</sup> and Dirk Berkvens<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Secretariat of the Scientific Committee, Administration of Control Policy, Federal Agency for the Safety of the Food Chain, World Trade Center III, avenue Simon Bolivar 30, B-1000 Brussels, Belgium

<sup>2</sup> Department of Animal Health, Institute of Tropical Medicine, Nationalestraat 155, B-2000 Antwerp, Belgium

<sup>3</sup> Veterinary and Agrochemical Research Center, Groeselenberg 99, B-1180 Uccle, Belgium

*Journal of General Virology*, soumis pour publication en juin 2004.

## **Abstract**

There were 118 BSE cases in Belgium before 1 January 2004. We analyze trends in age at time of detection and attempt to use this parameter as a robust predictor for the current status of the BSE epidemic in the country. The following indicator variables were considered: date of birth, breed, date of detection, mode of detection, monthly number and age of animals slaughtered and rendered. Age at detection in function of date of birth is a very poor epidemiological indicator. We conclude that the increasing age of BSE cases at time of detection is due to the depletion of cases (no new infections and thus detected cases become older) and that it is a reliable indicator of the onset of a decrease in the epidemic curve in Belgium. This parameter may be of use in those situations where absolute numbers of cases cannot be determined accurately.

## 1. Introduction

Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) represent a group of neurodegenerative diseases characterised by a very long incubation period in regard to the life of the host species and for which the archetype is scrapie in sheep (Lasmézas, 2003). The interest of these diseases was increased following the emergence of a novel clinical entity in 1986, namely bovine spongiform encephalopathy (BSE) (Wells *et al.*, 1987). BSE started a dramatic chain of events in the United Kingdom and subsequently in other countries (Prince *et al.*, 2003). The peak of interest was the discovery of its potential zoonotic character after the first description of a new variant of Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) in 1996 (Bruce *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 1999). Now, the evolution of the BSE incidence in many European countries is in decline but it is difficult to interpret this because, firstly, in the past, the reported cases coming from different epidemiosurveillance networks and, secondly, for several countries, BSE remains a rare event. In this context, it is very important to choose a robust epidemiological indicator to monitor the true trend when absolute numbers of BSE cases cannot be determined accurately.

Since 1990, a clinical epidemiosurveillance network for transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) in ruminants has been operational in Belgium and TSEs in ruminants became notifiable (Brochier *et al.*, 1992; Vanopdenbosch *et al.*, 1998). This network became truly operational on 1 May 1997 (Saegerman *et al.*, 1999). The first case of bovine spongiform encephalopathy (BSE) was diagnosed in October 1997 (Vanopdenbosch *et al.*, 1998). With passive surveillance, clinically suspected cases on the farm, at the market or in the slaughterhouse were sent to the reference laboratory for TSE examination of the brain using the EU approved tests: histopathology, immunohistochemistry and scrapie associated fibril examination (Vanopdenbosch *et al.*, 1998). Reporting of clinically suspected cattle currently remains the most cost-effective approach for detecting BSE cases (Saegerman *et al.*, 2004) but passive surveillance underestimates the incidence of the disease (Martin *et al.*, 1987; Toma *et al.*, 2001). Rapid tests for the detection of protease-resistant prion protein in brain tissue became available in 1999 and made it possible to test large numbers of samples, even those of poor quality, in a short period of time (e.g. Moynagh and Schimmel, 1999; Schaller *et al.*, 1999) and may also be able to detect the infection three to four months before the onset of clinical signs (Grassi *et al.*, 2001; Doherr *et al.*, 2001). In general a diagnostic sensitivity of 50% at 6 months before clinical onset can be assumed (Arnold and Wilesmith, 2003). In accordance with European legislation (European Commission, 2000), a purchase scheme with the aim to slaughter and completely destroy all purchased animals (exceptional support measures for the

beef market) without testing was used in Belgium from 1 January to 30 June 2001. In addition, BSE systematic diagnostic testing of slaughtered cattle with the rapid Bio-Rad Platelia ELISA test was implemented (recently replaced by Bio-Rad Te Se E test) according to the European regulation 999/2001 (European Parliament and Council, 2001). This test offers a level of assurance with regards to the detection of the presence of infection that is at least comparable with that provided by the conventional mouse bioassay and should help to eliminate previously undiagnosed BSE affected animals (Deslys *et al.*, 2001). Screening started on 1 January 2001 with two categories of adult cattle: cattle subject to emergency slaughter older than 24 months and routinely slaughtered cattle older than 30 months (Pastoret *et al.*, 2001). In fallen stock, a limited randomised sample was tested from the same date (35 samples per day, two days per week). Since 1 September 2001 all cattle older than 24 months are tested. In addition, a succession of BSE preventive measures to protect both human and animal health were taken at Belgian and EU level, the most important of which are: (i) the ban on feeding ruminant-derived protein (MBM ban) to ruminants in 27 July 1994 (European Commission, 1994; Saegerman *et al.*, 1999), (ii) the MBM safety production which implicates that all animal waste is treated since 1 April 1997 at 133°C, 3 bars, 20 minutes, 100% relative humidity (European Commission, 1996), (iii) the specific risk materials ban (SRM ban) that is applicable in Belgium since 1 February 1998 (all SRM is collected, transported separately and incinerated) (European Commission, 1997; Saegerman *et al.*, 2001) and (iv) finally the total ban on mammalian meat and bone meal (MMBM ban) installed since January 2001 (European Council, 2000). The objective of this short communication is to describe trends in age of the 118 BSE cases at time of detection in Belgium before 1 January 2004 and use them to estimate the current trend of the BSE epidemic in the country. Possible predisposing risk factors were explored for the BSE cases detected in 2002 and 2003. The possible influence of the mode of detection on the rapid test results (optical densities) for the same period was tested. The statistical analyses were carried out in Stata/SE 8 (StataCorp., 2003). The following indicator variables were considered: date of birth, breed, date of detection, number and age of animals slaughtered and rendered per month and mode of detection.

## 2. Results and discussion

Table 1 gives the number of BSE cases detected per month during 2002 and 2003. The preponderance of cases during the months September-March cannot be explained entirely by the fact that more animals (especially dairy animals) are BSE tested during these months (negative binomial regression, LR chi-square = 280.84, df = 8,  $p < 0.001$ ). After correcting for the above biases in numbers tested, the following risk factors are retained (Poisson regression, LR chi-square = 50.12, df = 4,  $p < 0.001$ ): there were fewer cases in 2003 compared to 2002 (incidence rate ratio [IRR] = 0.42), there were more cases from September to March than between April and August (IRR = 2.62), there were more cases in dairy animals than in beef animals (IRR = 3.83) and there were more cases in the age-group > 72 months than in the age group 48-72 months (IRR = 2.85).

**Table 1. Number of slaughtered and fallen stock animals tested<sup>1</sup> per month in function of breed (Belgium, years 2002-2003)**

Months	2002				2003			
	Tested		BSE cases		Tested		BSE cases	
	Dairy <sup>2</sup>	Other	Dairy	Other	Dairy	Other	Dairy	Other
January	8,295	10,300	2	1	9,606	10,871	2	
February	7,428	10,239	2	2	7,530	9,935		
March	9,154	11,908	5	1	8,071	11,550	3	1
April	6,440	10,933			7,150	11,530		
May	6,212	11,656		1	6,812	11,600	1	
June	6,978	11,371	1		6,125	9,669		
July	5,835	10,558	2	1	6,223	9,116	2	
August	6,895	12,182			6,752	9,761		
September	7,499	10,808	3	1	8,420	9,613		
October	8,391	12,420	2	1	8,834	9,678	1	
November	8,423	12,401	3	1	8,904	9,937	2	1
December	7,853	11,026	4		7,816	9,207	1	1

<sup>1</sup> if indicator variables were completely available

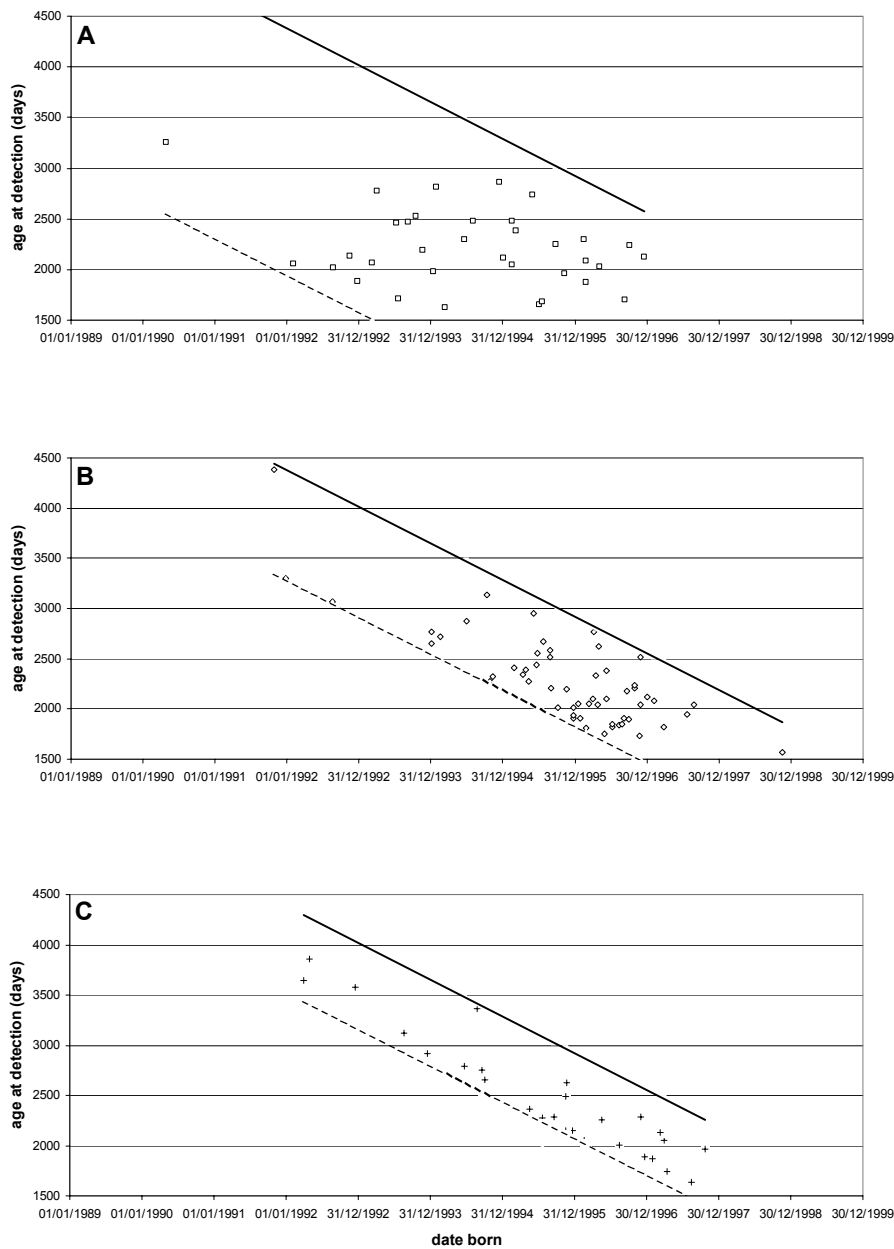
<sup>2</sup> based on coat colour (red white, white red, black white, white black)

We thus conclude that also in Belgium dairy animals and older animals have a higher risk to develop BSE, as was already well established in the United Kingdom (Wilesmith, 1998; Wilesmith *et al.*, 1992). We cannot readily explain the higher risk of BSE detection during the 'fall-winter' months (September-March). An explanation may be the more intense supervision of the animals by their keepers during that period, resulting in easier detection of the first signs (weight loss, decrease in milk yield) and subsequent culling of the animal, as also proposed by Wilesmith (1998). Another possible hypothesis might be that a higher risk of detection during the fall-winter months reflects a higher probability of infection during the same period (calving peak in Belgium is February-April and assuming infection at roughly the same young age and a constant incubation period). Further detailed research is required to confirm and explain or infirm this finding. Lastly, it might also be possible that clinical BSE becomes apparent during the peri-parturient period, as has been recorded for metabolic and infectious diseases (Goff and Horst, 1997).

The age of BSE cases decreases progressively with increasing date of birth, irrespective of the mode of detection (Figure 1). This phenomenon is an artefact in the dataset due to the limits (both lower and upper) on the date of detection. The apparent clustering of cases, detected as fallen stock, against the lower limit (Figure 1C) is also fortuitous, as most cases were observed immediately after the start of this screening in September 2001, during a period when there was a peak in detection, again irrespective of the method of detection. Age at detection in function of date of birth is thus a very poor epidemiological indicator, as already remarked by Wilesmith (1998). The age of BSE cases increases in function of date of detection whatever the mode of detection (Figure 2; Cox proportional hazard regression chi-square = 10.47, df = 1, p = 0.0012).

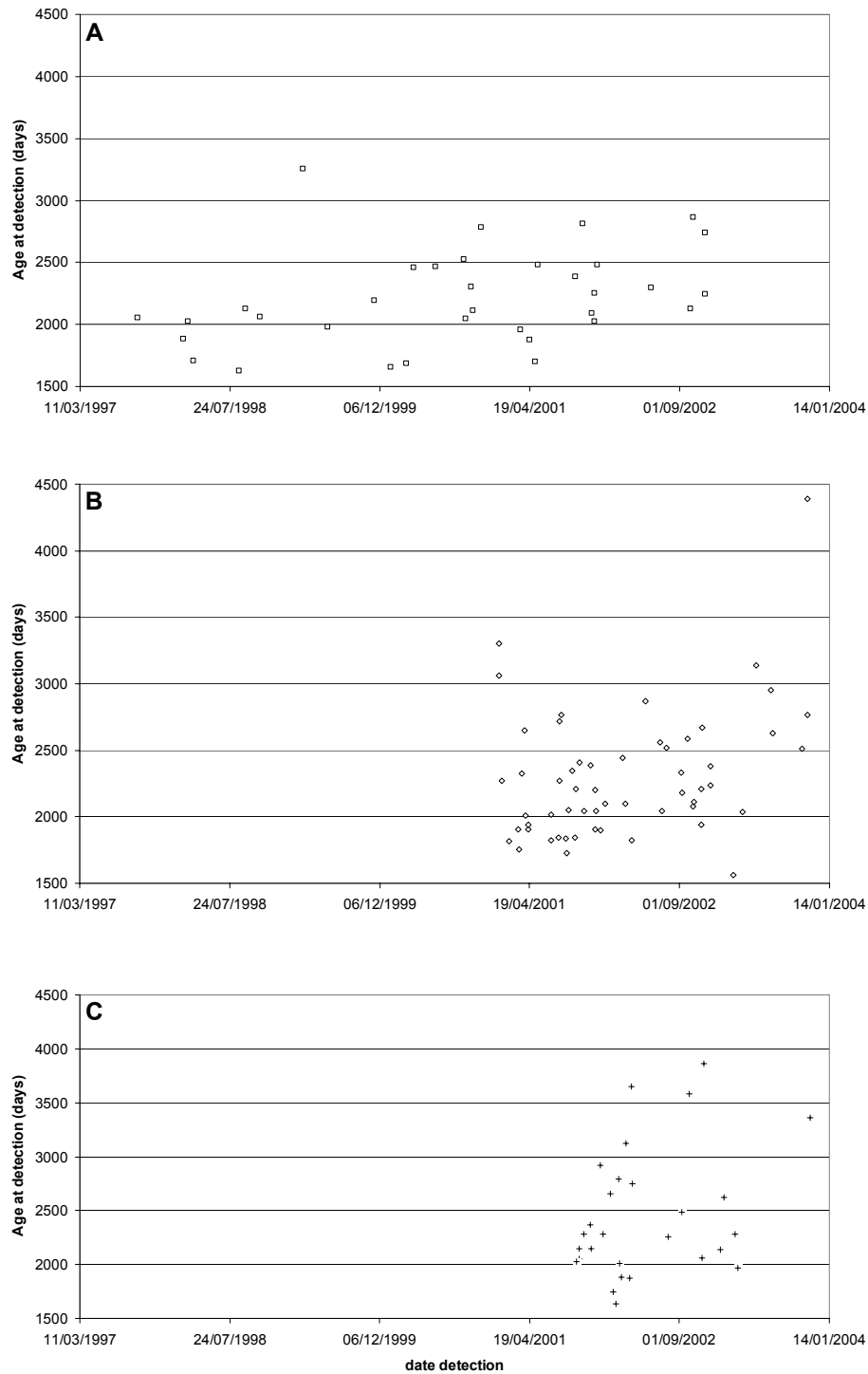


Figure 1. Age trends of 118 BSE affected cows in function of date born (Belgium, 1997-2003).



A. clinical epidemiosurveillance; B. slaughtered screening; C. fallen stock screening;  $\square$  clinical BSE cases ( $N = 34$ ),  $\diamond$  slaughtered BSE cases ( $N = 56$ ),  $+$  BSE cases in fallen stock ( $N = 28$ ); — December 31<sup>st</sup> 2003 minus date born; --- beginning date depending of mode detection minus date born (beginning date: May 1<sup>st</sup> 1997 in case of clinical epidemiosurveillance or January 1<sup>st</sup> 2001 in case of slaughtered screening or September 1<sup>st</sup> 2001 in case of fallen stock screening).

Figure 2. Age trends of 118 BSE affected cows in function of date detection (Belgium, 1997-2003).

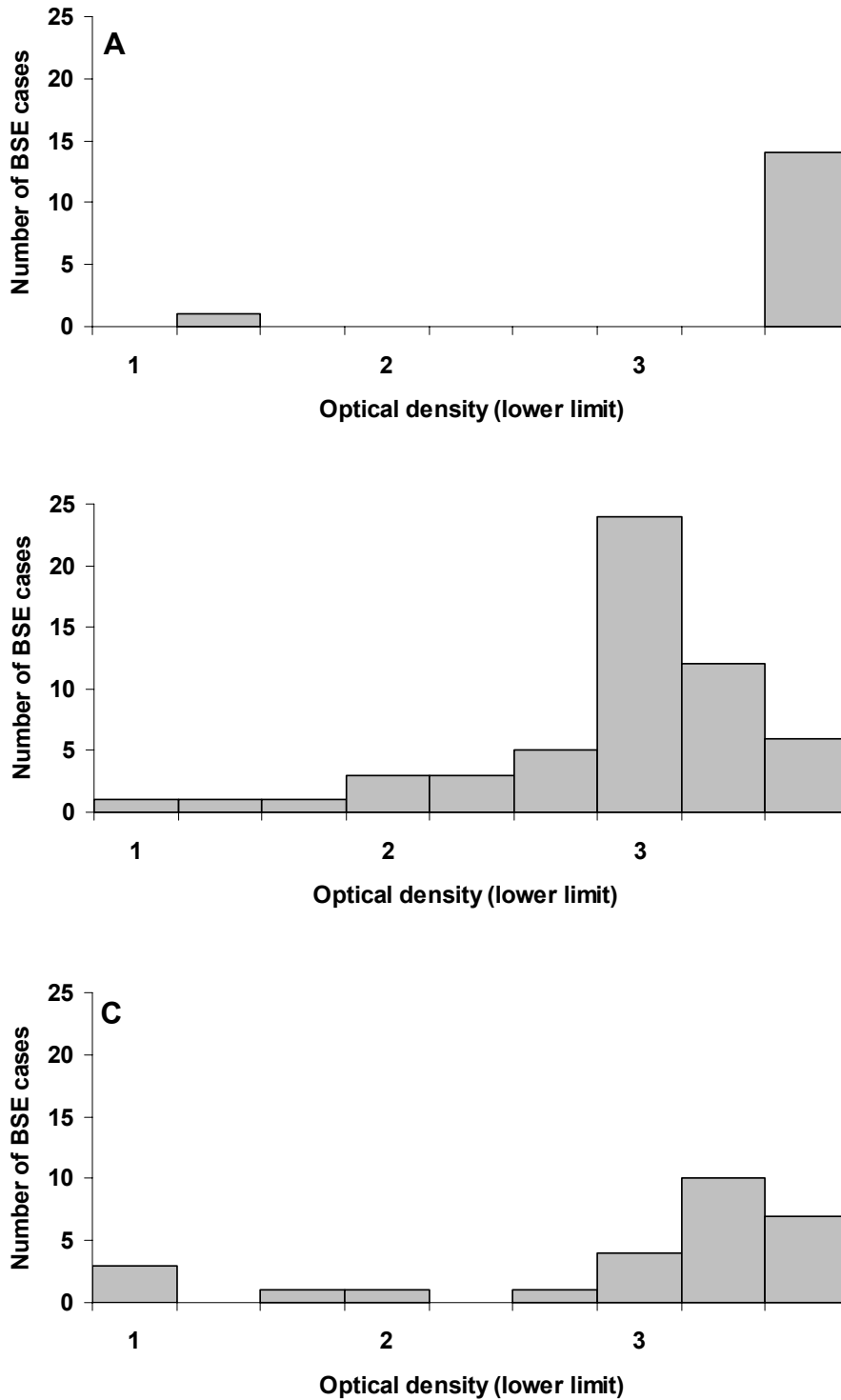


A. clinical epidemiosurveillance; B. slaughtered screening; C. fallen stock screening;  $\square$  clinical BSE cases ( $N = 34$ ),  $\diamond$  slaughtered BSE cases ( $N = 56$ ), + BSE cases in fallen stock ( $N = 28$ ).

Three hypotheses can be formulated to explain this observation: (i) the mode of detection had an influence, (ii) there exists a sub-clinical or a-clinical infection (latent carrier) and (iii) the BSE epidemic curve is on the decrease. Changes in mode of detection do not explain the observed increase in age-at-detection. In the present study the mean age-at-detection is not significantly different in clinical BSE cases, in slaughtered BSE cases and in fallen stock BSE cases (Cox proportional hazard regression chi-square = 2.01, df = 1, p = 0.3656). Several lines of evidence have suggested that sub-clinical forms of prion diseases exist with important animal and public health (Race *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 2000 and 2003). In prion diseases, infections titres in the brain rise progressively throughout prolonged, clinically silent periods that precede the onset of disease. The neuro-invasion occurs about halfway during the incubation period in natural scrapie sheep (Hadlow *et al.*, 1982) and assuming infection at younger age (Fergusson *et al.*, 1997) and a similar mechanism in cattle, the nervous system of animals older than 26 months should be prion-infected. The mean Bio-Rad test values in clinically detected BSE cases were higher than both in slaughtered and in fallen stock cases and no difference was found between the latter two classes (Kruskal- Wallis test, chi-square = 28.31, df = 2, p < 0.001) (Figure 3). The enzymatic reaction of the Bio-Rad test is proportional to the quantity of PrP<sup>Sc</sup> initially introduced into the assay (Crassi *et al.*, 2001). A few cases of older animals were recorded at the start of the screening at slaughter (Figure 2B), possibly providing evidence for the purported a-clinical form. However this hypothesis on its own does not suffice, as no significant difference in age was noted between clinically detected cases and cases detected at slaughter or rendering.

We thus conclude that the increasing age of BSE cases at time of detection is due to the depletion of cases (no new infections and thus detected cases become older) and that it is a reliable indicator of the onset of a decrease in the epidemic curve in Belgium. This parameter may be of use in those situations where absolute numbers of cases cannot be determined accurately. It must be noted that the decrease BSE risk to which cohorts born after the reinforced feed ban of 1 January 2001 (European Council, 2000) and the age distribution of the BSE tested cattle, including whether born before or after the reinforced ban, as well as the likely age distribution of Belgium's adult cattle in the next 5 years, could influence the future age-at-detection in BSE cases.

Figure 3. Distribution of the optical density of the BSE cases detected by the Bio-Rad test in function of the mode detection (Belgium, 1997-2003).



A. clinical épidémiologie (N = 15); B. slaughtered screening (N = 56); C. fallen stock screening (N = 27).

### **3. Acknowledgments**

We thank all members of the Federal Agency for the Safety of the Food Chain (FASFC), the Veterinary Agrochemical Research Centre (VAR) and the private laboratories who cooperated in this study. We particularly thank S. Roels (VAR), P. Dechamps, J.-M. Robijns, J. Dufey, G. Torck and S. Verbraeken from FASFC for access to data.

## 4. References

ARNOLD M., WILESMITH J. Modelling studies on bovine spongiform encephalopathy occurrence to assist in the review of the over 30 months rule in Great Britain. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **270**, 2003, 2141-2145.

BROCHIER B., VANOPDENBOSCH E., COPPENS P., THOONEN H., COSTY F., COIGNOUL F., LACAEYSE D., PASTORET P.-P. Réseau d'épidémiosurveillance des encéphalopathies spongiformes en Belgique : premiers résultats. *Ann. Med. Vet.*, 1992, **136**, 245-247.

BRUCE M.E., WILL R.G., IRONSIDE J.W., MCCONNELL I., DRUMMOND D., SUTTIE A., MCCARDLE L., CHREE A., HOPE J., BIRKETT C., COUSENS S., FRASER H., BOSTOCK C.J. Transmissions to mice indicate that "new variant" CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, 1997, **389**, 498-501.

DESLYS J.P., COMOY E., HAWKINS S., SIMON S., SCHIMMEL H., WELLS G., GRASSI J., MOYNAGH J. Screening slaughtered cattle for BSE. *Nature*, 2001, **409**, 476-478.

DOHERR M.G., HEIM D., FATZER R., COHEN C.H., VANDEVELDE M., ZURBRIGGEN A. Targeted screening of high-risk cattle populations for BSE to augment mandatory reporting of clinical suspects. *Prev. Vet. Med.*, 2001, **51**, 3-16.

EUROPEAN COMMISSION. Decision of 27 June 1994 concerning certain protection measures with regard to bovine spongiform encephalopathy and the feeding of mammalian derived protein. *Official Journal of the European Communities*, 1994, **L172**, 23-24.

EUROPEAN COMMISSION. Decision 96/449/EC of July 18<sup>th</sup> 1996 on the approval of alternative heat treatment systems for processing animal waste with a view to the inactivation of spongiform encephalopathy agents. *Official Journal of the European Communities*, 1996, **L184**, 43-46.

EUROPEAN COMMISSION. Decision 97/534/EC of July 30<sup>th</sup> 1997 on the prohibition of the use of material presenting risks as regards transmissible spongiform encephalopathies. *Official Journal of the European Communities*, 1997, **L216**, 95-98.

EUROPEAN COUNCIL. Decision 2000/766/EC of December 4<sup>th</sup> 2000 concerning certain protection measures with regard to transmissible spongiform encephalopathies and the feeding of animal protein. *Official Journal of the European Communities*, 2000, **L306**, 32-33.

EUROPEAN COMMISSION. Regulation 2000/2777/EC of December 18<sup>th</sup> 2000 adopting exceptional support measures for the beef market. *Official Journal of the European Communities*, 2000, **L321**, 47-51.

EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL. Regulation (EC) N° 999/2001 of 22 May 2001 laying down rules the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. *Official Journal of the European Communities*, 2001, **L147**, 1-40.

FERGUSON N.M., DONNELLY C.A., WOOLHOUSE M.E.I., ANDERSON R.M. (1997). The epidemiology of BSE in cattle herds in Great Britain. II. Model construction and analysis of transmission dynamics. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.*, 1997, **352**, 803-838.

GOFF J.P., HORST R.L. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.*, 1997, **80**, 1260-1268.

GRASSI J., COMOY E., SIMON S., CREMINON C., FROBERT Y., TRAPMAN S., SCHIMMEL H., HAWKINS S.A., MOYNAGH J., DESLYS J.P., WELLS G.A. Rapid test for the preclinical postmortem diagnosis of BSE in central nervous system tissue. *Vet. Rec.*, 2001, **149**, 577-582.

HADLOW W.J., KENNEDY R.C., RACE R.E. Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *J. Infect. Dis.*, 1982, **146**, 657-664.

HILL A.F., DESBRUSBAIS M., JOINER S., SIDLE K.C.L., GOWLAND J., COLLINGE L., DOEY L.J., LANTOS P. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, 1997, **389**, 448-450.

HILL A.F., JOINER S., LINEHAN J., DESBRUSLAIS M., LANTOS P.L., COLLINGE J. Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, **97**, 10248-10253.

HILL A.F., COLLINGE J. Subclinical prion infection in humans and animals. *Br. Med. Bull.*, 2003, **66**, 161-170.

LASMÉZAS C.I. The transmissible spongiform encephalopathies. *Rev. sci. techn. Off. Int. Epiz.*, 2003, **22(1)**, 23-36

MARTIN S.W., MEEK A.H., WILLEBERG P. *Veterinary Epidemiology. Principles and Methods.* Ames, United States: Iowa State University Press, 1987, 343 p.

MOYNAGH J., SCHIMMEL H. Tests for BSE evaluated. Bovine spongiform encephalopathy. *Nature*, 1999, **409**, 105.

PASTORET P.P., GOUFFAUX M., SAEGERMAN C., ROELS S., DECHAMPS P., THIRY E., VANOPDENBOSCH E. Le diagnostic immunologique rapide des encéphalopathies spongiformes transmissibles. *Ann. Med. Vet.*, 2001, **145**, 164-173.

PRINCE M.J., BAILEY J.A., BARROWMAN P.R., BISHOP K.J., CAMPBELL G.R., WOOD J.M. Bovine spongiform encephalopathy. *Rev. sci. techn. Off. Int. Epiz.*, 2003, **22(1)**, 37-60

RACE R., RAINES A., RAYMOND G.J., GAUCHEY B., CHESEBRO B. Long-term subclinical carrier state precedes scrapie replication and adaptation in a resistant species : analogies to bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease in humans. *J. Virol.*, 2001, **75**, 10106-10112.

SAEGERMAN C., SPEYBROECK N., ROELS S., VANOPDENBOSCH E., THIRY E., BERKVENS D. Decision support tools for clinical diagnosis of disease in cows with suspected bovine spongiform encephalopathy. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, **42**, 172-178.

SAEGERMAN C., DECHAMPS P., ROELS S. & 21 OTHER AUTHORS. Epidémiologie de l'encéphalopathie spongiforme bovine en Belgique : bilan de l'année 1999. *Ann. Méd. Vét.*, 2001, **145**, 47-58.

SAEGERMAN C., DECHAMPS P., VANOPDENBOSCH E. & 20 OTHER AUTHORS. Epidémiologie de l'encéphalopathie spongiforme bovine en Belgique : bilan de l'année 1998. *Ann. Méd. Vét.*, 1999, **143**, 423-436.

SCHALLER O., FATZER R., STACK M. & 9 OTHER AUTHORS. Validation of a Western immunoblotting procedure for bovine PrP<sup>Sc</sup> detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Acta Neuropathol.*, 1999, **98**, 437-443.

SCOTT M.R., WILL R., IRONSIDE J., NGUYEN H.-O.B., TREMBLAY P., DEARMOND S.J., PRUSINER S. Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, **96**, 15137-15142.

STATA CORP. Stata Statistical Software: Release 8.0. College Station, TX : Stata Corporation, 2003.

TOMA B., DUFOUR B., SANAA M., BENET J.J., SHAW A., MOUTOU F., LOUZA A. Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures. Edité par l'Association pour l'Etude de l'Epidémiologie des maladies Animales, Maisons-Alfort, 2001, 696 p.

VANOPDENBOSCH E., DECHAMPS P., SAEGERMAN C. & 9 OTHER AUTHORS. Le premier cas d'encéphalopathie spongiforme bovine diagnostiqué en Belgique. *Ann. Méd. Vét.*, 1998, **142**, 111-118.

WELLS G.A.H., SCOTT A.C., JOHNSON C.T., GUNNING R.H., HANDOCK R.F., JEFFREY M., DAWSON M., BRADLEY R. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.*, 1987, **121**, 419-420.



WILESMITH J.W. Manual on bovine spongiform encephalopathy. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 1998, 51 p.

WILESMITH J.W., RYAN J.B.M., HUESTON W.D., HOINVILLE L.J. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological features 1985 to 1990. *Vet. Rec.*, 1992, **130**, 90-94.

## **Chapitre 7**

### **Discussion générale, Conclusions et perspectives**

*« Ce n'est pas parce que les choses sont difficiles que nous n'osons pas ;  
c'est parce que nous n'osons pas qu'elles sont difficiles »*

*Lucius Annaeus Seneca*

## Discussion générale, conclusions et perspectives

Les travaux qui sont présentés dans cette thèse constituent un ensemble de réponses apportées à des problèmes identifiés sur le terrain. Ils ont été organisés en vue de proposer un canevas commun d'épidémiosurveillance des événements rares chez les bovins en Belgique. Ces événements ont été approchés selon leurs états possibles<sup>1</sup> (émergence, persistance et disparition) et un indicateur d'état, ne nécessitant pas un catalogue exhaustif de tous les cas enregistrés, a été recherché. La rareté peut s'apprécier différemment en fonction des événements rencontrés (agents pathogènes, agents non conventionnels, contaminants) ou de l'unité épidémiologique considérée (par exemple, un événement peut être fréquent à l'échelle des troupeaux et rare à l'échelle des animaux comme c'est le cas pour les RSFP en ce qui concerne le dépistage de la brucellose bovine) et dès lors, il est très difficile de définir le seuil maximal en dessous duquel un événement peut être qualifié de rare. Des fréquences relatives inférieures à 1 % (ou des événements ne survenant que sporadiquement) peuvent être qualifiés de rares (Toma, 1998). En santé publique et en santé publique vétérinaire, la détection d'événements rares est, bien sûr, plus difficile que celle d'événements fréquents. Elle repose sur les signes cliniques et/ou sur l'application de tests de dépistage. Il s'agit à chaque fois de tests de diagnostic. Une interprétation correcte de ceux-ci est nécessaire avant toute décision ou action et repose sur la compréhension de l'histoire naturelle des maladies et des troubles de la santé, de l'immunologie, de l'épidémiologie, des statistiques et de l'évaluation des risques. En raison d'une origine parfois indéterminée, un test de dépistage peut ne pas être disponible lorsqu'une maladie émerge comme ce fût le cas pour l'ESB (Saegerman *et al.*, 2003).

### 1. Emergence d'un événement rare

L'ESB a été reconnue cliniquement et définie comme une nouvelle entité pathologique neurodégénérative au RU en 1986 (Wells *et al.*, 1987). La dispersion spatiale et l'augmentation d'incidence de l'ESB a conduit à la qualifier de maladie émergente (Pattison, 1998 ; Brown, 2001 ; Saegerman *et al.*, 2003 ; Toma & Thiry, 2003).

La détection clinique d'une maladie émergente comme l'ESB peut être rendue difficile pour plusieurs raisons (liste non exhaustive) : (i) une prévalence intra-troupeau très faible, en particulier en Europe continentale, (ii) un temps d'incubation long, (iii) une durée variable des signes cliniques, (iv) l'existence de périodes de rémission, (v) l'absence de signe clinique pathognomonique et (vi) la nécessité d'une confirmation par des tests de référence validés

---

<sup>1</sup> D'autres classifications sont possibles telle que, par exemple, la prise en compte du caractère nouveau, existant (à bas bruit ou non reconnu) ou ancien des événements rares.

mais ne pouvant être réalisés que post-mortem sur du tissu de l'encéphale (Saegerman *et al.*, 2003). Par ailleurs, les tests rapides de dépistage de l'ESB n'ont été disponibles que tardivement (plus de 14 années après sa réussite émergente). Ils permettent de réduire les manipulations et de dépasser la limite de temps inhérente aux délais d'obtention des résultats des examens conventionnels de confirmation. Toutefois, seule leur réalisation post-mortem est envisageable actuellement (Commission européenne, 1999 ; 2003). Ceci nous a amené à privilégier l'amélioration de la détection clinique de l'ESB. Elle permet d'augmenter la prévalence de l'ESB dans la sous-population à risque des bovins cliniquement suspects par rapport à la population générale et ainsi d'augmenter la valeur prédictive d'un résultat positif à un test de diagnostic de confirmation. Par ailleurs, un grand nombre de pays non européens ont importé des farines de viandes et d'os, provenant du RU, susceptibles d'être contaminées (Heim *et al.*, 2001 ; Heim & Kreysa, 2002). Parmi ceux-ci, figure un nombre non négligeable de pays en développement. En raison des coûts inhérents à l'application des tests rapides de dépistage de l'ESB, seule la détection clinique s'avère pertinente pour ces pays.

Deux contributions originales ont apporté des éléments permettant d'améliorer la détection et la décision clinique de l'ESB : une étude épidémiologique rétrospective des troubles à expression nerveuse chez les ruminants avant la première déclaration de l'ESB en Belgique et le développement d'un outil d'aide à la décision clinique d'une maladie, basé sur les données se rapportant aux années 1998-2000, période comprise entre la détection du premier cas clinique et la mise en place des tests rapides de dépistage de l'ESB (chapitre 3).

### **1.1. Etude rétrospective des troubles d'expression nerveuse chez les ruminants avant la déclaration du premier cas d'ESB en Belgique**

Très peu d'études épidémiologiques rétrospectives documentaires et/ou portant sur l'analyse ciblée d'échantillons historiques archivés sont disponibles actuellement en ce qui concerne les TEN (Hill, 1994 ; Heim *et al.*, 1997). Ces études sont pourtant fondamentales pour appréhender le diagnostic différentiel de l'ESB et pour connaître le taux moyen d'incidence annuelle des TEN et, parmi ceux-ci, ceux qui sont suspects d'être une ESB. De telles informations constituent des pré-requis indispensables pour calculer un nombre minimum d'encéphales à analyser pour détecter l'ESB avec un niveau de confiance de 99 %, si elle représentait 1 % des cas de maladies nerveuses chez les bovins (OIE, 2003).

Les études rétrospectives permettent de vérifier les conditions de l'émergence : (i) l'existence ou l'inexistence antérieure et (ii) l'évolution spatio-temporelle de l'incidence de l'événement rare étudié. Elles permettent également d'assurer une épidémiosurveillance dans les zones géographiques les moins bien surveillées ou dans les zones géographiques les plus à risque. Elles sont d'un faible coût. Leur puissance est assez faible mais pourrait être significativement

améliorée par un archivage correct des données enregistrées (Laboratory Information Management System, LIMS) et un archivage de prélèvements d'intérêt (par exemple, des blocs d'encéphale pour les maladies nerveuses). Nos travaux ont permis de dresser un inventaire précis du fonctionnement des laboratoires de diagnostic vétérinaire en Belgique, d'en connaître les faiblesses et les forces. Ils ont permis d'apprécier les marges de progrès possibles du réseau d'épidémiosurveillance (par exemple, le calcul de la valeur prédictive d'un diagnostic clinique présomptif constitue un point de référence). Les résultats de nos travaux ont permis de sensibiliser, d'informer et de former les principaux acteurs du réseau d'épidémiosurveillance de l'ESB que sont les éleveurs, les vétérinaires, le personnel des laboratoires et les responsables de l'Autorité compétente.

Les résultats de nos travaux permettent d'entrevoir : (i) pour les années où les données sont incomplètes (1980-91), le développement d'un modèle permettant d'estimer le taux d'incidence des TEN et, parmi ceux-ci, ceux qui sont suspects d'EST et (ii) l'extension de l'étude avant 1980, au sein de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège, où des documents et des prélèvements archivés sont encore disponibles. Bien que la chance de trouver un cas d'ESB confirmé avant 1980 soit faible, une telle découverte appuierait magistralement l'hypothèse de l'existence de cas spontanés d'ESB.

Enfin les résultats de nos travaux pourraient être extrapolés à d'autres pays ayant un système de production animale similaire au nôtre.

## **1.2. Description des premiers cas cliniques d'ESB**

En raison même de la rareté d'un événement, la description détaillée et standardisée des premiers cas déclarés d'ESB a été déterminante pour identifier le plus rapidement possible des paramètres ayant un intérêt clinique (Vanopdenbosch *et al.*, 1998 ; Saegerman *et al.*, 1999 ; 2001). Il s'agit d'une étape préalable indispensable au développement d'outils d'aide à la décision clinique.

## **1.3. Développement d'un outil d'aide à la décision clinique d'une maladie**

Nos travaux ont permis de développer un outil d'aide à la décision clinique qui peut être adapté à d'autres maladies ou troubles de la santé. Celui-ci est caractérisé par : (i) son aspect exploratoire et interactif, (ii) son indépendance par rapport à la taille de l'échantillon et à la prévalence de la maladie ou du trouble de la santé, ce qui est particulièrement indiqué pour l'épidémiosurveillance des événements rares (outil basé sur les odds ratio) et (iii) son universalité (adaptation possible aux modifications du profil clinique de la maladie susceptibles d'être observées au cours du temps et adaptation possible à d'autres maladies ou troubles de la santé).

Plus globalement, l'amélioration drastique de la détection clinique d'une maladie ou d'un trouble de la santé permet également aux médecins, vétérinaires, agronomes de mieux appréhender l'anormalité de la normalité et, de ce fait, d'identifier plus rapidement une maladie émergente ou ré-émergente. Cette détection pro-active permet d'entreprendre des mesures précoces de gestion (par exemple : la mise en place d'une vaccination ou d'un traitement approprié ou l'abattage d'un nombre limité d'animaux lorsque celui-ci est requis).

Les résultats de nos travaux permettent aussi de proposer un concept novateur susceptible de réduire drastiquement le nombre d'animaux à tester dans le cadre du développement et de la production de produits biologiques et pharmaceutiques en médecine vétérinaire (essais cliniques en laboratoire ou sur le terrain). Ce concept permettrait la prise en compte « holistique » des informations recueillies lors des essais cliniques par le mélange de variables catégorielles et continues et permettrait de proposer des arbres de décision appropriés. Pour autant que le nombre de variables étudiées ne soit pas trop grand, la puissance de la méthode développée permettrait d'obtenir, plus rapidement, des informations cliniques pertinentes et nécessiterait l'observation d'un plus faible nombre d'animaux pour aboutir aux résultats escomptés.

Les aspects sociétaux de l'approche développée doivent également être mis en lumière puisqu'il s'agit d'un travail multidisciplinaire et d'une mise en réseau des expériences des cliniciens. Ces aspects sont fondamentaux pour le développement de professions libérales telle que la nôtre.

En raison de la taille de notre pays, nos travaux ont été menés sur un faible nombre d'observations. Dès lors, une étude de validation<sup>2</sup> de l'outil proposé, à l'échelle européenne, s'avère utile. Elle nécessite la mise en œuvre d'un essai multicentrique<sup>3</sup> qui tient compte, en particulier : (i) du rapport entre les nombres de cas cliniques suspects d'ESB confirmés et non confirmés et (ii) de la taille des bases de données disponibles. Ceci permettrait de vérifier l'indépendance de l'outil développé vis-à-vis de la taille de l'échantillon et de la prévalence de la maladie et de définir des conditions d'utilisation de l'outil développé. Après quoi, sa généralisation dans le cadre de l'ESB pourrait être envisagée. L'intérêt d'un tel développement est renforcé dans le sens où le dépistage « systématique », par le biais des tests rapides, est financièrement intenable à long terme. La nécessité de développer des alternatives crédibles se fait sentir. Des collaborations structurées entre experts sont actuellement en cours pour relever ce challenge.

---

<sup>2</sup> Etude portant sur un grand nombre de sujets, visant à confirmer des constatations faites sur un échantillon plus réduit (Toma *et al.*, 1991).

<sup>3</sup> Essai auquel participent plusieurs observateurs répartis dans différents sites, selon un protocole commun, et réunissant leurs données en vue d'un compte-rendu collectif (Toma *et al.*, 1991).

Nos travaux permettent également d'envisager l'adaptation de l'outil d'aide à la décision clinique à d'autres maladies « lentes » (par exemple, la tremblante du mouton) mais également à d'autres maladies à déclaration obligatoire (par exemple, la peste porcine classique). Aucune donnée réellement utilisable n'étant disponible en Belgique en ce qui concerne la peste porcine classique, une collaboration avec les Pays-Bas, qui possèdent des informations pertinentes à l'échelle des troupeaux suite à l'épizootie de 1997-98 (Elbers *et al.*, 2002), a été tentée mais est restée sans succès. Des bases de données concernant la tremblante du mouton sont recherchées. Une meilleure collaboration européenne est souhaitable.

Nos travaux permettent de recommander à l'Agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire la mise en œuvre d'un outil d'aide à la décision pour les suspicions cliniques des maladies animales à déclaration obligatoire en présence d'un test de référence (gold standard).

#### **1.4. Aspects normatifs internationaux**

Les résultats de l'étude rétrospective des TEN ont permis de valider, à l'échelle d'une population, une recommandation de l'OIE basée sur l'opinion d'experts et qui spécifie que les bovins sont atteints de maladies nerveuses dans tous les pays, que l'ESB soit présente ou non, selon une incidence annuelle d'au moins 100 cas par million de bovins adultes (OIE, 1997). A ce titre, nos travaux ont apporté des informations essentielles pour déterminer le nombre minimum d'échantillons à examiner pour détecter l'ESB avec une probabilité de 99 % (OIE, 2003). Nos travaux ont également permis de déterminer que les petits ruminants sont atteints de maladies nerveuses selon une incidence annuelle significativement supérieure à celles des bovins. Toutefois, en raison des faibles effectifs de petits ruminants détenus en Belgique, des études complémentaires sont nécessaires au sein de pays où la production d'ovins et de caprins est importante.

Après validation de l'outil d'aide à la décision clinique de l'ESB, celui-ci pourra être proposé à l'OIE comme méthodologie de référence pour l'épidémiosurveillance clinique de l'ESB.

## **2. Persistance d'un événement rare**

La persistance d'un événement rare a été traitée en prenant l'exemple de contaminations ponctuelles<sup>4</sup> de la chaîne alimentaire par les PCBs/dioxines, s'ajoutant à la pollution environnementale de fond du cheptel bovin (chapitre 4).

---

<sup>4</sup> du moins pour les cas intenses car il existe aussi de nombreux cas moins flagrants (fuites, accidents et déversements frauduleux). De telles sources de contamination sont, par exemple, fréquemment détectées auprès des entreprises de recyclage de voitures usagées sans que l'on n'en connaisse l'explication (Vlaamse Milieumaatschappij, 2004).



Les résultats globaux des programmations PCBs/dioxines organisées par l'AFSCA et les résultats de nos travaux démontrent que le taux de dépassement des normes PCBs/dioxines est relativement stable et faible ( $\leq 1\%$ ). Lorsqu'il a été possible d'en trouver la cause, il s'agissait de contaminations environnementales principalement dues à des activités industrielles et domestiques (Debongnie *et al.*, 2000 ; AFSCA, 2002 ; Pussemier *et al.*, 2004). Les contaminations ponctuelles de la chaîne alimentaire par les PCBs/dioxines qui surviennent sont un exemple d'événements rares persistants, non transmissibles, non contagieux, d'expression clinique rare. Dans ce type d'événement, un modèle déterministe a été développé pour estimer l'exposition potentielle maximale du consommateur adulte aux dioxines provenant de l'alimentation d'origine bovine et ceci dans deux scénarii extrêmes. Le premier scénario correspond à la consommation, par un faible nombre de consommateurs, de produits alimentaires contaminés durant une longue période (type de consommation dite « locale ») et le second simule la consommation de produits contaminés par un grand nombre de consommateurs durant une courte période (type de consommation dite « super marché »). Un effet du type de consommation sur la charge corporelle en dioxines a été mis en évidence ; la consommation locale ayant un impact plus élevé. Malgré la contamination environnementale simulée, déclinée selon deux modalités, la charge corporelle en dioxines a tendance à décroître à long terme. Ayant permis de démontrer que la prévalence des contaminations de la chaîne alimentaire par les PCBs/dioxines est faible, que les sources de contamination sont communes aux pays industrialisés et que l'impact de la consommation de denrées alimentaires d'origine bovine est limitée, nos travaux ont contribué à la levée des mesures édictées par la Commission européenne à l'encontre du secteur des bovins lors de l'incident PCBs/dioxines de 1999 (décision 99/449/CEE ; European Commission, 1999a). Nos travaux ont également mis en exergue un certain nombre de problèmes à résoudre pour standardiser les évaluations des risques au sein des Etats membres. Ceux-ci concernent la limite de détection, l'échantillonnage, les données de consommation individuelle, les prélèvements sur animaux vivants et le développement d'une approche probabiliste.

## 2.1. Limite de détection

A cause des différences d'interprétation concernant les résultats de laboratoire inférieurs à la limite de détection<sup>5</sup> (LOD) des PCBs et dioxines, l'estimation de l'exposition moyenne n'est pas la même d'un Etat membre à l'autre. Une approche commune devrait être adoptée afin de pouvoir comparer les expositions respectives. Notre approche tient compte du

---

<sup>5</sup> LOD : plus petite concentration de l'analyte pouvant être détectée, mais non quantifiée, avec un risque d'erreur connu. Actuellement, cette notion est incluse dans la capacité de détection qui est la plus petite teneur en substance pouvant être détectée, identifiée et/ou quantifiée dans un échantillon avec une probabilité d'erreur  $\beta$  (décision fondée sur un faux résultat conforme) (décision 2002/657/CE ; Anonyme, 2002).

97,5<sup>ème</sup> percentile des niveaux de contamination observés. Ceci permet de contourner le problème de la LOD mais n'autorise qu'une approche déterministe.

## 2.2. Echantillonnage standardisé

Nos travaux ont démontré la faisabilité de différents types d'échantillonnage d'animaux ou de produits animaux destinés à la consommation humaine (dépistage sélectif des stations d'engraissement de veaux et des bovins destinés à l'exportation, dépistage aléatoire des bovins de boucherie à l'abattoir, dépistage aléatoire du lait de camions-citernes). Les deux derniers types d'échantillonnage sont particulièrement intéressants en raison du rapport coût/efficacité. Le dépistage régulier des laits de citerne (mélange de lait de 3 camions-citernes par province) permet de suivre la contamination du cheptel bovin laitier par les dioxines<sup>6</sup>. Il faut toutefois recommander le tirage aléatoire des camions-citernes si l'objectif est d'évaluer la contamination globale de la production laitière. Un échantillonnage complémentaire à proximité des sources potentielles de contamination (directive 96/82/CE ; Anonyme, 1996) reste toutefois intéressant pour mener des évaluations de risque dans des scénarii extrêmes et pour évaluer le niveau d'autocontrôle appliqué dans les firmes concernées. L'utilisation des échantillons de laits de citerne pourrait être optimisée en étendant la recherche des 17 congénères dioxines à d'autres indicateurs qualitatifs qui donneraient une vue d'ensemble des pressions de l'environnement dues aux activités humaines (par exemple, d'autres polluants organiques persistants). Ceci demande d'intensifier les collaborations entre l'AFSCA et d'autres partenaires (notamment, les régions et les institutions scientifiques et universitaires).

Etant donné la taille ( $n = 299$ ) et la représentativité de l'échantillonnage des bovins abattus, stratifié par province et standardisé sur l'âge, la mise en œuvre de celui-ci doit être recommandée dans la pratique pour détecter la présence des contaminations PCBs/dioxines à un taux de prévalence supérieur ou égal à un taux théorique retenu par hypothèse. Toutefois, un dilemme se pose quant aux objectifs. En effet, vise-t-on la représentativité des contaminations environnementales ou la représentativité des aliments consommés ? Si on vise la représentativité des aliments consommés, il faut également tenir compte du fait que des produits, tels que les fromages, peuvent être importés. Dès lors, il est préférable d'échantillonner les produits prêts à être consommés (au niveau de la distribution) (Schechter *et al.*, 2001). Si on vise la représentativité des contaminations environnementales, il est préférable de réaliser des prélèvements sur les bovins dont le cycle de vie est long et qui sont en contact avec l'environnement (au niveau de la production primaire). Une autre possibilité est d'effectuer des prélèvements de sols, d'herbes, etc. Dans ce cas, il n'y a pas eu de métabolisation des

---

<sup>6</sup> dosage en première intention, sans passé par le dosage préalable des PCBs.

PCBs/dioxines et la proportion relative des congénères permet, plus facilement, d'identifier une source de contamination.

### **2.3. Meilleure connaissance des consommations individuelles**

En Belgique, des données éparses concernant les habitudes alimentaires individuelles sont disponibles ; notamment une étude concernant une cohorte d'adolescents gantois en 1997 (Lambe *et al.*, 2000 ; De Henauw *et al.*, 2001). Cette absence de données, représentatives de la population belge contemporaine, n'autorise pas la construction de distribution de probabilités des données de consommation et, dès lors, n'autorise pas une approche probabiliste. Toutefois, depuis la publication de nos travaux, une enquête alimentaire portant sur 3200 sujets, réalisée par l'Institut scientifique de Santé publique, est en cours. Les résultats de cette dernière ne seront toutefois disponibles publiquement qu'en juin 2006 (Van Oyen, communication personnelle). Dès maintenant, il faut déjà s'interroger sur le choix d'une méthodologie permettant la mise à jour régulière, pour un coût acceptable, des données de consommation en Belgique.

### **2.4. Prélèvements sur les bovins vivants**

Chez l'homme, les taux plasmatiques de PCBs / dioxines sont le reflet de ceux trouvés dans les graisses corporelles (Ewers *et al.*, 1996). Chez les bovins, des résultats préliminaires, sur un nombre limité d'échantillons, indiquent qu'il en sera très vraisemblablement de même. (Pussemier, communication personnelle). Dès lors, la validation de nouveaux tests chez l'animal vivant serait possible et permettrait des études de population. De même, en conditions contrôlées, il serait possible d'étudier les taux de transfert de l'alimentation aux bovins (Lorber *et al.*, 1994). Pour rencontrer des objectifs d'épidémiologie, des tests dosant l'activité des récepteurs aryl hydrocarbon (Ah) devraient être encouragés (Overmeire *et al.*, 2002). Ceux-ci dosent l'activité globale de type dioxines, et y incluent l'action des substances agonistes et antagonistes. Des évidences renforcent l'intérêt du dosage de l'activité du récepteur Ah puisque ce dernier semble impliqué dans les effets carcinogènes (Enan *et al.*, 1998 ; Carlson and Perdew, 2002 ; Matsumura, 2003 ; Steenland *et al.*, 2004).

### **2.5. Approche probabiliste**

Les résultats de nos travaux et la mise en œuvre des propositions d'amélioration décrites aux points précédents permettront de développer des modèles probabilistes qui tiennent compte des distributions de probabilités des contaminations par les PCBs/dioxines et des distributions de probabilités des données individuelles de consommation.

### 3. Disparition d'un événement rare

La disparition d'un événement rare a été traitée en prenant l'exemple de l'éradication de la brucellose bovine couplée à l'apparition des réactions sérologiques faussement positives (RSFP). Elle a nécessité l'adaptation de la stratégie de testage. La validation de la mesure de l'immunité à médiation humorale par des tests i-ELISAs spécifiques des isotypes IgG<sub>1</sub> et/ou IgG<sub>2</sub> et de l'immunité cellulaire par un test cutané au Brucellergène® sont deux contributions originales apportées à la lutte contre la brucellose bovine (chapitre 5).

#### 3.1. Diagnostic sérologique et allergique de la brucellose bovine

##### 3.1.1. Mise en évidence de réactions sérologiques faussement positives

En Belgique, les RSFP chez les bovins sont apparues au début des années 1990, lorsque la prévalence de la brucellose bovine des troupeaux était devenue inférieure à 1 % (Saegerman et Pelzer, 1992 ; Dufey, 1992 ; Weynants *et al.*, 1996; Saegerman *et al.*, 1997). Un tel phénomène n'a pas manqué d'interpeller les éleveurs, les responsables sanitaires et les scientifiques, d'entraver le commerce et de risquer de discréditer les méthodes de lutte (Saegerman et Pelzer, 1992). L'étiologie la plus probable présidant à ce phénomène (sans être vraisemblablement unique) est une infection à *Yersinia enterocolitica* O:9 (Saegerman et Pelzer, 1992 ; Dufey, 1992 ; Weynants *et al.*, 1996; Saegerman *et al.*, 1997). Dans ce contexte, la valeur prédictive d'un résultat positif était très faible. Cependant, débusquer les derniers animaux infectés, en particulier les animaux infectés latents (animaux classifiés comme négatifs par les tests sérologiques classiques), restait une nécessité absolue. De nouveaux outils de diagnostic ont été développés et évalués en vue de pouvoir dépister un faible nombre d'animaux infectés par *Brucella abortus* (disparition d'un événement rare) et de les différencier, sans ambiguïté, d'animaux infectés par *Yersinia enterocolitica* O:9.

##### 3.1.2. Tests i-ELISAs

En Europe, les stratégies de dépistage sérologique varient en fonction des Etats membres. Chez la plupart, le test de dépistage est le rose bengale<sup>7</sup> ; chez d'autres, la séroagglutination (SAW-EDTA) et, chez d'autres encore, le test ELISA. Nos travaux ont démontré que les tests i-ELISAs sur sera individuels apparaissent comme un choix approprié pour maintenir le statut officiellement indemne de brucellose du fait de leur sensibilité, leur détection précoce et leur longue persistance et, pour les mêmes raisons, semblent être d'une valeur particulière pour détecter des animaux porteurs latents parmi les animaux importés (animaux classifiés comme négatifs par les tests sérologiques classiques). L'utilisation des tests i-ELISAs, prévue par la législation européenne (section II, de l'annexe A, de la directive 64/432/CEE), doit donc être

<sup>7</sup> Egalement appelé agglutination rapide sur lame ou épreuve à l'antigène brucellique tamponné.

encouragée dans le contexte de la détection d'un événement devenu rare et nous avons démontré que l'exactitude des résultats pourrait être améliorée par l'utilisation d'informations additionnelles (par exemple : l'âge des animaux ou le conjugué utilisé) et la sélection de seuils de positivité appropriés sur base de la situation épidémiologique qui prévaut. Une étude pilote, réalisée sur le terrain, permettrait de dégager les lignes directrices d'une telle stratégie. Tenant compte du fait que la sensibilité des tests i-ELISAs est supérieure aux tests ELISAs de compétition (Weynants *et al.*, 1996), leur utilisation sur mélange de sera a été envisagée (Garin-Bastuji *et al.*, 2001 ; Boelaert *et al.*, 2003). Il convient toutefois de rappeler que la validité de telles études est conditionnée par l'évaluation des performances du test sur un échantillon représentatif de sera provenant d'animaux infectés (infection brucellique aiguë, chronique et latente). En effet, tout défaut de sensibilité peut favoriser une dissémination silencieuse d'un événement rare et ainsi contribuer à sa réussite émergente induisant des conséquences dommageables.

Nos travaux ont également démontré que la spécificité des tests i-ELISAs brucellose diminuait significativement dans des régions où les RSFP étaient fréquentes. Ceci renforce la nécessité d'améliorer l'exactitude des résultats par l'utilisation d'informations additionnelles (âge des animaux, conjugué utilisé, seuil de positivité approprié).

Bien qu'un test ELISA utilisant les *Yersinia* Outer Proteins (YOPs) permettant de diagnostiquer une infection à *Y. enterocolitica* O:9 ait été développé (Weynants *et al.*, 1994 ; 1996), celui-ci ne donne toutefois aucune information relative à une infection brucellique concomitante (Godfroid *et al.*, 2002). Il n'a dès lors qu'une valeur indicative et ne peut, en aucun cas, garantir l'absence d'infection brucellique. Il permettrait toutefois d'avoir une bonne idée sur la prévalence de l'infection des souches virulentes de *Yersinia* spp. et contribuerait, de la sorte, à une meilleure compréhension de l'incidence des RSFP. Cette dernière serait également renforcée par la mise en œuvre conjointe d'un échantillonnage de matières fécales visant à rechercher et identifier les souches circulantes de *Yersinia* spp.

Dans un modèle expérimental murin, contrairement aux infections par d'autres bactéries Gram négatives, une primo-infection par *B. abortus* se traduit par l'apparition d'IgG sériques dans un délai de 2 à 4 semaines (Moreno *et al.*, 1984). Nous avons pu vérifier le même phénomène chez le bovin en conditions expérimentales après un délai de 3 à 4 semaines et nous avons pu démontrer que les tests i-ELISAs étaient plus précoces pour détecter l'infection que la SAW-EDTA. Dès lors, dans le cadre du dépistage sérologique de la brucellose bovine, la mise en évidence d'IgM par le test SAW-EDTA sans mise en évidence concomitante d'IgG par un test i-ELISA est peu indicative d'une brucellose. Elle l'est d'autant moins lorsque la situation reste inchangée après un délai de 3-4 semaines supplémentaires. Sur le terrain, parmi les RSFP, les seules qui posent réellement un problème sanitaire sont celles pour lesquelles l'image est

compatible avec une infection à *B. abortus*, à savoir lorsque des IgG sériques sont détectées par un test SAW-DTT ou un test i-ELISA.

### 3.1.3. Test cutané

Tenant compte des limitations stratégiques d'utilisation des tests sérologiques pour résoudre le problème des RSFP, en particulier lorsque des IgG sériques étaient détectées, une contribution originale a été apportée en définissant les conditions d'utilisation et en validant la mesure de l'IMC par le test cutané au Brucellergène®. La spécificité de ce test s'est avérée exceptionnelle pour une sensibilité moyenne (Pouillot *et al.*, 1997). A ce jour, elle est supérieure à la spécificité du test interféron gamma (test *in vitro*) (Weynants *et al.*, 1994, 1995 ; Godfroid *et al.*, 2002). Le test cutané a donné des informations de valeur, lorsqu'il était utilisé en combinaison avec les tests sérologiques, dans le cas d'infection brucellique aiguë et chronique. Il discriminait clairement la brucellose de réactions sérologiques faussement positives dues à des infections par *Yersinia enterocolitica* O:9. Actuellement, c'est le seul test qui, combiné à une approche épidémiologique, permet d'apporter une réponse appropriée à la problématique des RSFP.

### 3.1.4. Aspects normatifs internationaux

Nos travaux ont permis d'inclure le test cutané au brucellergène dans le « Manual of standards for diagnostic tests and vaccines » de l'OIE (Anon., 2000 ; [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00048.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00048.htm)) et, subséquentement, dans l'annexe C de la directive 64/432/CE relative aux échanges d'animaux vivants au sein de l'Union européenne (Anonyme, 1964). Nos travaux ont permis l'acceptation, par la Commission européenne, d'un protocole national de gestion des réactions sérologiques positives en brucellose bovine basé sur la prise en compte des résultats du test cutané au brucellergène et des résultats d'une analyse des risques qui tiennent compte de la présence ou l'absence de facteurs de risque d'infection brucellique. Ce protocole a contribué à l'obtention de la reconnaissance opérationnelle du réseau de surveillance des exploitations bovines (décision 2002/544/CE ; Anonyme, 2002). Nos travaux ont également permis la reconnaissance par la Commission européenne du statut « officiellement indemne de brucellose bovine » de la Belgique (décision 467/2003/CE ; Anonyme, 2003). Enfin, nos derniers travaux permettent de recommander à l'OIE de prendre en compte, en fonction de la situation épidémiologique d'un pays, la détection des IgG<sub>1</sub> et/ou IgG<sub>2</sub> dans le diagnostic de la brucellose bovine et ainsi d'amender le « Manual of standards for diagnostic tests and vaccines ».

### 3.1.5. Stratégie de testage

Nos travaux ont permis de définir, en conditions expérimentales et de terrain, une stratégie de testage intégrant le SAW-EDTA, l'i-ELISA et le test cutané au brucellergène (Limet *et al.*,

1992 ; Saegerman *et al.*, 1999 ; Godfroid *et al.*, 2002 ; Saegerman *et al.*, 2004). Plus récemment, nos travaux ont permis de construire une nouvelle stratégie de testage des troupeaux bovins, après que le pays ait été déclaré officiellement indemne de brucellose bovine, basée notamment sur la présence ou non de facteurs de risque et l'utilisation de tests complémentaires (test i-ELISA et test cutané).

### **3.2. Adaptation de l'épidémiosurveillance de la brucellose bovine qui est devenu un phénomène rare**

La brucellose bovine demeure une zoonose d'importance et de répartition mondiales. Elle est devenue rare en Amérique du Nord, en Europe et en Australie (Corbel, 1997). Dans les pays en voie d'éradication et ceux reconnus officiellement indemnes (décision 2003/467/CE ; Anonyme, 2003), l'adaptation de l'épidémiosurveillance est une nécessité. En Europe, celle-ci est légiférée (directive 64/432/CE ; Anonyme, 1964) mais plusieurs exemples nous rappellent qu'aucun pays n'est à l'abri d'une recrudescence ou d'une ré-émergence de la brucellose bovine comme ce fut le cas en Irlande et, plus récemment, en Ecosse et en Grande-Bretagne.

Dans ce contexte, la prophylaxie sera purement sanitaire et visera à protéger l'ensemble du cheptel national de toute nouvelle réintroduction de *Brucella abortus*. Les mesures préventives et défensives consisteront en (liste non exhaustive) : (i) l'évaluation du risque d'importation de bovins infectés par *Brucella abortus* ; (ii) le contrôle sérologique répété des bovins importés par un test i-ELISA ; (iii) l'application de mesures hygiéniques au sein des troupeaux (biosécurité) ; (iv) la maîtrise des facteurs de risque ; (v) la déclaration et le contrôle des avortements suspects d'être dus à la brucellose et (vi) le monitoring du cheptel national.

Conceptuellement, le développement de trois types d'outils se fait sentir : (i) la construction d'un modèle déterministe d'estimation de la prévalence et d'évaluation des programmes nationaux de surveillance ; (ii) la construction d'un outil d'évaluation du risque d'importation de bovins infectés par *Brucella abortus* et (iii) la construction d'un modèle Bayésien de prédiction de la prévalence réelle de l'infection brucellique basé sur la combinaison de tests de dépistage.

#### **3.2.1. Développement d'un modèle déterministe d'estimation de la prévalence de la brucellose bovine et d'évaluation des programmes nationaux de surveillance**

Lorsque la prévalence ou, mieux, l'incidence (risque d'infection) de la brucellose bovine est en déclin (disparition d'un événement rare), la question du choix de la meilleure allocation des ressources financières dans un et/ou l'autre mode de dépistage se pose. Récemment, un modèle d'estimation de la prévalence de l'ESB et d'évaluation des programmes nationaux de surveillance de l'ESB a été développé (Wilesmith *et al.*, 2004). Dès que ce modèle aura été

validé par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (voir point 4), il pourra être adapté à la brucellose bovine par les épidémiologistes ayant une expérience avérée dans le domaine, en collaboration avec des statisticiens.

### **3.2.2. Développement d'un outil d'évaluation du risque d'importation de bovins infectés par *Brucella abortus***

L'accord sur l'application des mesures sanitaires et phytosanitaires de l'Organisation mondiale du Commerce (accord SPS de Marrakech, signés en 1994) stipule que tout refus d'importation d'animaux ou de produits alimentaires doit se baser sur une appréciation du risque, scientifique et transparente, selon les normes élaborées par l'Office international des Epizooties (Geiger, 1996 ; Rogy, 2002). De nombreux exemples d'évaluations qualitatives (par exemple, MacDiarmid, 1993 ; Hendriks *et al.*, 2001 ; Moutou *et al.*, 2001) et quantitatives (par exemple, Schreuder *et al.*, 1997 ; Sanaa *et al.*, 2002 ; Jones *et al.*, 2004) du risque d'introduction d'une maladie dans un pays ont été publiés dans la littérature scientifique. Plus récemment encore, l'OIE a édité un manuel de référence en ce qui concerne l'analyse du risque d'importation d'animaux ou de produits animaux (Office international des Epizooties, 2004a, 2004b). Toutefois, des outils d'évaluation quantitative des risques de réintroduction de la brucellose bovine qui tiennent compte, à la fois, du statut sanitaire, de la qualité des services vétérinaires et de la stratégie de testage appliquée dans les pays de provenance restent à développer. Ils nécessitent la mise à disposition, par la Commission européenne, d'une définition claire d'un « accident isolé » (foyer) qui n'entraînerait pas automatiquement, pour le pays, la perte du statut officiellement indemne de brucellose bovine (calcul du risque acceptable). Les résultats publiés (tests i-ELISAs et le test cutané au brucellergène) et non publiés de nos travaux (données épidémiologiques rétrospectives concernant plusieurs centaines de foyers ; opinions d'experts) permettront de développer de tels outils.

### **3.2.3. Développement d'un modèle Bayésien de prédiction de la prévalence réelle de l'infection brucellique sur base de la combinaison de tests de dépistage**

Nos travaux ont permis de démontrer l'absence de tests de diagnostic parfaits en brucellose bovine. Pour ouvrir la fenêtre diagnostique, il est recommandé d'appliquer plusieurs tests (multi-testing) de mesure de l'immunité à médiation humorale détectant des isotopes d'anticorps différents (Alton *et al.*, 1988) et de l'immunité à médiation cellulaire révélant une réaction d'HSR. Cette combinaison de tests peut se faire en série, en parallèle ou régulièrement au cours du temps (suivi longitudinal). Ce multi-testing peut également être utilisé pour l'évaluation de la performance d'un nouveau test. Les paramètres de sensibilité et de spécificité sont généralement considérés comme des propriétés absolues d'un test. Ils sont



souvent traités comme des variables indépendantes dans des modèles d'analyse (Smith & Slenning, 2000 ; Pouillot *et al.*, 2002). Toutefois, une combinaison de tests peut aboutir au constat d'une dépendance conditionnelle entre les sensibilités et les spécificités des différents tests (Dohoo *et al.*, 1986 ; Smith & Slenning, 2000 ; Gardner *et al.*, 2000 ; Berkvens *et al.*, 2003) dont le support est la compréhension de la dualité de la réponse immunitaire spécifique (Letesson, 1996).

Il n'existe pas, à ce jour, d'étude validée qui permette de définir et d'optimiser le nombre, la combinaison et la séquence éventuelle de tests de diagnostic pour aboutir à estimer, en une seule fois, les caractéristiques des tests (sensibilité et spécificité) et la prévalence réelle de la brucellose bovine (par exemple, suite aux résultats d'un monitoring). Ces données sont pourtant d'une importance cruciale dans l'épidémiosurveillance des événements rares. Les résultats de nos travaux ont permis, d'une part, le développement et l'évaluation de trois tests i-ELISAs, hautement sensibles, détectant des isotypes IgG<sub>1</sub> et/ou IgG<sub>2</sub> et d'un test cutané au brucellergène, hautement spécifique, et, d'autre part, d'archiver un grand nombre de résultats de tests multiples réalisés dans différentes conditions expérimentales et de terrain revêtant un intérêt particulier. Le contexte était soit une infection brucellique aiguë, chronique ou latente (animaux classifiés comme négatifs par les tests sérologiques classiques), ou soit des troupeaux reconnus officiellement indemnes de brucellose dans lesquels des animaux présentaient ou ne présentaient pas de RSFP. L'ensemble de ces résultats préliminaires permet le développement futur d'un modèle Bayésien. Ce dernier est basé sur les probabilités conditionnelles<sup>8</sup> et permet de combiner des opinions experts (*a priori*) avec des données expérimentales afin d'estimer, avec plus de précision, la prévalence réelle et les caractéristiques des tests (Dorny *et al.*, 2004). La qualité des informations *a priori*, qui est le reflet quantifié d'opinions d'experts et des connaissances scientifiques disponibles (avant l'enquête), améliore cette précision (Ouedraogo, 2001). Les données de l'enquête sur laquelle repose la connaissance *a posteriori* suivent souvent une distribution binomiale du fait de leur caractère binaire (résultat positif ou négatif à un test de diagnostic). La mise à jour de la distribution de probabilités *a priori* du paramètre étudié, est appelée distribution *a posteriori*. Cette dernière reflète les probabilités des « croyances » après avoir pris connaissance des données de l'enquête (Johnson & Albert, 1999). Selon le théorème de Bayes (Spiegelhalter *et al.*, 1999), la distribution des probabilités *a posteriori* est calculée en multipliant la fonction de vraisemblance par la densité *a priori*. Le modèle Bayésien utilise les techniques de Markov Chain Monte Carlo (MCMC, appelé également Gibbs sampler). Dans une MCMC, une quelconque information datant d'avant la dernière étape du procédé est connue pour être sans rapport dans la prédiction de son état à la prochaine étape (Suess *et al.*, 2000). Le logiciel

---

<sup>8</sup> La probabilité conditionnelle qu'un animal soit infecté s'il est positif à un test donné correspond à la valeur prédictive d'un résultat positif. Il s'agit qu'une application du théorème de Bayes

WinBUGS (Bayesian inference Using Gibbs Sampling) permet de réaliser, sous Windows, une analyse Bayésienne, de modèles complexes, en utilisant les méthodes MCMC. On peut imaginer l'approche Bayésienne plus simplement : « un amateur de vin trouve que le Saint-Emilion est excellent (donnée *a priori*) ; à l'occasion d'un dîner chez un couple d'amis, il goûte deux bouteilles de ce même breuvage et le trouve moyennement bon (données de l'expérimentation) ; suite à cette expérience, il raviser son jugement (distribution *a posteriori*) ».

#### 4. Indicateur d'état d'un événement rare

Le choix d'un indicateur robuste du stade épidémiologique d'un événement rare a été traité en prenant l'exemple de l'ESB (chapitre 6).

Actuellement, l'évolution de l'incidence de l'ESB a tendance à décroître dans plusieurs Etats membres mais il est toutefois difficile d'interpréter ce déclin étant donné qu'il s'agit d'un événement rare et qu'une certaine hétérogénéité des systèmes d'épidémiosurveillance a été constatée. De plus, les coûts engendrés par l'application systématique des tests rapides de dépistage de l'ESB sont très importants et la plupart des pays souhaitent réévaluer l'allocation des ressources financières disponibles. L'efficacité d'un réseau d'épidémiosurveillance ne peut être appréciée qu'au travers des évaluations régulières et/ou l'élaboration et le suivi en continu d'indicateurs de performance (Saegerman *et al.*, 2003).

Dans ce cadre, un modèle déterministe d'estimation de la prévalence de l'ESB et d'évaluation des programmes nationaux de surveillance a été développé et est en cours d'évaluation par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (Wilesmith *et al.*, 2004). Ce modèle, dénommé BSurvE, semble être un excellent outil pour autant que le pays concerné dispose de données précises et que les hypothèses qui sous-tendent le modèle soient vraies. Ce modèle restera toutefois un outil rétrospectif et ne permet pas d'obtenir une idée récente du stade épidémiologique de l'ESB dans un pays. Les résultats de nos travaux permettent d'apporter un complément à ce modèle en proposant un indicateur robuste du stade épidémiologique de l'ESB.

Sur base d'une analyse des données d'épidémiosurveillance de l'ESB en Belgique et d'une discussion d'hypothèses scientifiques plausibles, nos travaux ont démontré que la distribution d'âge des cas d'ESB au moment de la détection est un bon indicateur du stade de la courbe épidémique de l'ESB dans un pays. Cet indicateur peut être utilisé dans les situations où le nombre absolu de cas ne peut être déterminé avec exactitude ; ce qui est particulièrement utile dans le cadre de la détection des événements rares.

Actuellement, par le biais d'une collaboration européenne, une amélioration de l'indicateur d'état identifié est en cours et consiste en une analyse de sensibilité. Des études multicentriques ultérieures permettront de valider l'outil.

Les résultats de nos travaux apportent une contribution originale à l'épidémiosurveillance des événements rares et permettent d'entrevoir de nouvelles perspectives : (i) l'intégration de l'outil dans une deuxième version du modèle développé par Willesmith et collaborateurs et (ii) sa généralisation possible pour des maladies lentes (par exemple la tremblante ou le visna-maedi).

Les résultats de nos travaux permettent de recommander, à la Commission européenne, le suivi de la distribution d'âge des animaux à la détection comme indicateur du stade épidémiologique dans le cas particulier des maladies à longue incubation clinique.

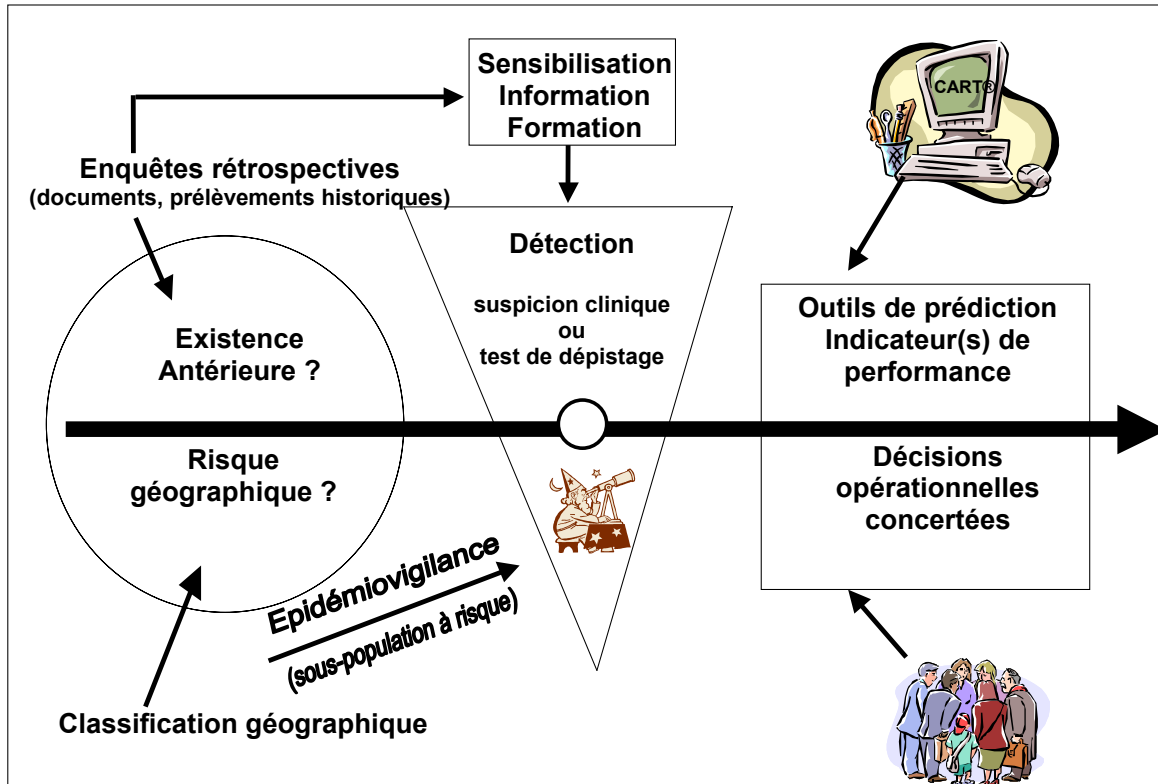
## **5. Modèle généralisé d'épidémiosurveillance des événements rares**

Au terme de cette thèse, un modèle généralisé d'épidémiosurveillance des événements rares peut être proposé (figure 8) (Saegerman *et al.*, 2003). La détection des événements rares est, bien sûr, plus difficile que celle des événements fréquents. Elle repose sur les signes cliniques et/ou sur l'application de tests de dépistage lorsque ceux-ci sont disponibles. En raison de l'origine parfois indéterminée d'une maladie, un test de dépistage peut ne pas être disponible lorsqu'une maladie émerge comme ce fut le cas pour l'ESB. La détection visera alors à définir les limites entre la normalité et l'anormalité (tableau clinique que l'observateur compétent ne peut pas rattacher, selon sa propre expérience, à une maladie connue). Dans ce cas, l'alerte sera le plus souvent donnée par des éleveurs et des vétérinaires praticiens expérimentés dont le champ d'activité est la chaîne alimentaire dans son ensemble, doués d'un grand sens de l'observation leur permettant d'identifier un tableau clinique « anormal ». La mise en place de réseaux sentinelles permet d'instaurer une vigilance accrue au sein des troupeaux suivis. Dès lors, l'identification et la détection d'un événement rare est plus probable dans de tels réseaux. Dans tous les cas, le développement de connaissances nouvelles nécessite de recourir à une démarche clinique rigoureuse et l'enregistrement méthodique des signes cliniques observés. Dans ce cadre, la sensibilisation, l'information et la formation des acteurs des réseaux d'épidémiosurveillance sont un investissement et ne doivent en aucun cas être considérées comme une contrainte ou une perte de temps. Les éléments suivants peuvent concourir à améliorer celles-ci : (i) des études épidémiologiques rétrospectives qui peuvent être documentaires et/ou consister au dépistage ciblé d'échantillons historiques archivés (sérothèque, cytothèque, pilothèque, prélèvements histopathologiques) et (ii) des évaluations du risque géographique d'apparition et de dispersion des événements rares qui permettent de cibler des sous-populations à risque. La détection des événements rares peut être améliorée

par l'instauration d'une épidémiologie dans ces sous-populations (augmentation de la prévalence par rapport à la population générale et augmentation subséquente de la valeur prédictive d'un résultat positif à un test de diagnostic). Chez les bovins, il serait également possible d'augmenter la prévalence d'événements « infectieux » par le dosage de l'immunité non spécifique (protéines de phase aiguë). Le développement de tests appropriés de dépistage des maladies ou des troubles de la santé et le développement d'outils d'aide à la décision clinique sont deux éléments clés dans l'amélioration de la détection des événements rares. En ce qui concerne la décision clinique, les outils qui ne dépendent pas de la taille de l'échantillon observé, ni de la prévalence de la maladie considérée sont susceptibles de rendre les réseaux actuels d'épidémiologie (épidémiologie) plus performants. L'efficacité et la pérennité de tels réseaux ne peuvent être appréciées qu'au travers des évaluations régulières et/ou l'élaboration et le suivi en continu d'indicateurs de performance garantissant leur efficacité (Dufour, 1999 ; Saegerman *et al.*, 2003). La recherche et la rapidité de réponses administratives appropriées conduisent à des décisions opérationnelles concertées. La communication et la médiatisation des concepts développés permettent leur acceptation. Les épisodes récents de maladies humaines ou animales (ré)-émergentes ont mis également en lumière le rôle important des systèmes mondiaux de diffusion d'informations sanitaires (Smolinski *et al.*, 2003 ; Vallat, 2003). Ces systèmes nécessitent des compétences, des ressources et des efforts coordonnés et synergiques entre les autorités réglementaires vétérinaires et médicales afin de faire face aux menaces multiples que constituent les maladies émergentes (Deroin, 2003 ; Grégoire, 2001).

L'amélioration de la détection et de la surveillance des événements rares et l'évaluation de l'impact sur la santé que peuvent représenter ceux-ci sont deux éléments clés qui permettront de fixer les axes d'action à accomplir en vue de limiter l'émergence ou la ré-émergence de maladies ou de troubles de la santé.

Figure 8. Modèle généralisé d'épidémiologie des événements rares



## **Chapitre 8**

### **Résumé** **Summary**

## Résumé

Contrairement à l'Union européenne qui est importatrice nette de produits agroalimentaires, la Belgique se caractérise par un solde positif de sa balance commerciale. Pour maintenir et augmenter ce dernier, elle doit notamment pouvoir garantir la sécurité sanitaire des produits agricoles d'origine bovine. Dans un tel contexte, l'épidémiosurveillance des événements rares est particulièrement indiquée.

Lorsque la fréquence relative d'un événement est inférieure à 1% ou lorsqu'un événement ne survient que sporadiquement, il est qualifié de rare (Toma, 1998). La rareté peut toutefois s'apprécier différemment en fonction des événements rencontrés et il est difficile de définir avec précision le seuil maximal en dessous duquel un événement peut être qualifié de rare. Un événement rare peut s'exprimer selon trois états en fonction de l'évolution de son taux d'incidence. L'événement peut soit émerger, persister ou disparaître.

L'émergence d'un événement rare a été analysée dans le contexte de l'apparition de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) en Belgique. Pour aboutir à l'objectif poursuivi d'améliorer la détection clinique de l'ESB : (i) une classification détaillée des troubles d'expression nerveuse a été établie en Europe occidentale, (ii) un taux d'incidence des troubles d'expression nerveuse a été déterminé chez les ruminants domestiques et sauvages en Belgique et ceci à l'échelle de la population, (iii) un outil d'aide à la décision clinique novateur, indépendant de la taille de l'échantillon et de la prévalence de la maladie, a été construit.

La persistance d'un événement rare a été étudiée dans le contexte de contaminations ponctuelles de la chaîne alimentaire par les PCBs/dioxines, s'ajoutant à la pollution environnementale de fond du cheptel bovin. Pour aboutir à l'objectif poursuivi d'estimer l'exposition potentielle du consommateur à ce type de contaminant : (i) l'amélioration de programmes de détection des contaminations par les PCBs/dioxines et (ii) une méthodologie d'évaluation de l'exposition potentielle d'un consommateur aux dioxines provenant de l'alimentation à base de produits de viande et de produits laitiers ont été proposées.

La disparition d'un événement rare a été analysée en prenant comme exemple la reconnaissance et le maintien du statut officiellement indemne de brucellose bovine en Belgique, dans un contexte d'apparition de réactions sérologiques faussement positives. Pour atteindre l'objectif poursuivi d'adapter les outils de diagnostic, un test hautement spécifique (basé sur l'hypersensibilité retardée) et trois tests hautement sensibles (ELISA indirects) ciblant la détection d' IgG<sub>1</sub> et/ou IgG<sub>2</sub> ont été développés et évalués.

Enfin, un indicateur du stade épidémiologique d'un événement rare a été développé en prenant l'exemple de l'ESB. L'évolution de la distribution de l'âge a été proposé comme indicateur fiable de la tendance de la courbe épidémique.

Au terme de cette thèse, un modèle généralisé d'épidémiosurveillance des événements rares a été proposé. L'amélioration de la détection et de la surveillance des événements rares et l'évaluation de l'impact sur la santé que peuvent représenter ceux-ci sont deux éléments clés qui permettent de fixer des axes d'actions en vue de limiter l'émergence ou la ré-émergence de maladies ou de troubles de la santé.



## Summary

Contrary to the European Union, which is a net importer of agro-alimentary products, Belgium has a positive balance. In order to maintain and improve this position, the country needs to guarantee the safety of, among others, products of bovine origin. Epidemiosurveillance of rare events is particularly important in this respect.

An event is classified as rare, when its relative frequency is below 1% or when it occurs only sporadically (Toma, 1998). It must be appreciated that 'rare event' as such is a relative term and a precise definition remains difficult. A rare event can be in three different epidemiological states in function of the change in its incidence: emerging, persisting or disappearing.

An emerging rare event was considered in the case of the appearance of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in Belgium. A detailed classification of neurologically expressed disorders (NED) in western Europe was carried out, the population-level incidence rate of NED in domesticated and wild ruminants was determined in Belgium and an innovative decision-supporting tool, independent of sample size and disease prevalence, was developed, all with the explicit goal to improve the clinical detection of BSE.

A persisting rare event was studied in the context of isolated contaminations of the food chain by PCBs/dioxins, which add to the environmental pollution of the bovine herd. The aim of this study was essentially to estimate the potential exposure of the consumer. This was translated into (i) an effort to improve the detection of this type of contamination and (ii) to work out a methodology to evaluate the potential exposure of the consumer issuing from meat and milk products.

The acquisition and maintenance of the officially brucellosis-free status of Belgium was used to exemplify a disappearing rare event. The specific problem here was to deal with the increasing importance of false positive serology test results. The development and evaluation of a highly specific diagnostic test (based on a delayed hypersensitivity) and three highly sensitive indirect ELISAs, targeting IgG<sub>1</sub> and/or IgG<sub>2</sub>, addressed this problem.

Lastly, an indicator of the epidemiological state of a rare event was developed, using BSE as an example. The evolution of the age distribution is proposed as a reliable indicator of the epidemic curve.

As a result of this work, a generalised model of the epidemiosurveillance of rare events is proposed. The improvement of the detection and monitoring of rare events and the evaluation

of their impact on the public health are two key elements, which allow the formulation of modes of action to limit the emergence and re-emergence of diseases and disorders.

## **Chapitre 9**

### **Bibliographie générale**

## Bibliographie générale

**ABBOTT B.D., HELD G.A., WOOD C.R., BUCKALEW A.R., BROWN J.G., SCHMID J.** AhR, ARNT, and CYP1A1 mRNA quantification in cultured human embryonic palates exposed to TCDD and comparison with mouse palate *in vivo* and in culture. *Toxicol. Sci.*, 1999, **47**, 62-75.

**ABSOLONNE J.** La valeur nutritive de la viande. *Elevages Belges*, 1995, **12**, 9-16.

**ACHA P.N., SZYFRES B.** Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux. Office international des Epizooties (Ed.), Paris, France, 1989, 1063 p.

**AGENCE FEDERALE POUR LA SECURITE DE LA CHAINE ALIMENTAIRE.** CONSUM. Rapport annuel 2000. Agence fédérale pour la Sécurité de la chaîne alimentaire : Bruxelles, 2001, 82 p.

**AGENCE FEDERALE POUR LA SECURITE DE LA CHAINE ALIMENTAIRE.** CONSUM. Rapport annuel 2001. Agence fédérale pour la Sécurité de la chaîne alimentaire : Bruxelles, 2002, 103 p.

**AGENCE FEDERALE POUR LA SECURITE DE LA CHAINE ALIMENTAIRE.** Note à la Commission européenne. Reconnaissance du système belge de réseau de surveillance des exploitations bovines. Mission DG(SANCO)/3338/2001 du 2 au 6 juillet 2001 – rapport final – plan d'action, 2002, p. 32.

**AGENCE FEDERALE POUR LA SECURITE DE LA CHAINE ALIMENTAIRE.** CONSUM. Rapport annuel 2002. Agence fédérale pour la Sécurité de la chaîne alimentaire : Bruxelles, 2003, 160 p.

**AGRINFO.** L'agriculture et l'horticulture belges en bref. Mai 2001, 48 p.

**AHL A.S., ACREE J.A., GIPSON P.S., McDOWELL R.M., MILLER L., McELVAINE M.D.** Standardization of nomenclature for animal health risk analysis. *Rev. sci. techn. Off. int. Epiz.*, 1993, **12 (4)**, 1045-1053.

**AHVONEN P., JANSSON E., AHO K.** Marked cross-agglutination between brucellae and a subtype of *Yersinia enterocolitica*. *Acta path. Microbial. Scand.*, 1969, **75**, 291-295.

**ALI B.H.** Some pharmacological and toxicological properties of furazolidone. *Vet. Res. Commun.*, 1983, **6**, 1-11.

**ALTON G.G., JONES L.M., ANGUS R.D., VERGER J.M.** Techniques for the brucellosis Laboratory, First edition. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France, 1988, 190 p.

**ALVAREZ P.** Situación de la brucelosis en America : panorama general. *In* : Diagnóstico De Brucelosis Animal. Díaz E., Hernández L., Valero G., Arellano B. (ed.). México, Mexique, 2001, 9-16.

**ANDERSEN A.F., PEDERSEN K.B.** Brucellose. Et tilfaelde af naturlig infektion med *Brucella suis* biotype 2 hos en ko. *Dansk Veterinaertidsskrift*, 1995, **78 (8)**, 408.

**ANDRE-FONTAINE G.** Sensibilité, spécificité, valeurs prédictives : Impact de la qualité des analyses en épidémiologie. *Epidémiol. et santé anim.*, 1990, **17**, 29-40.

**ANDRESEN U., KIETZMANN M., ANDRESEN P.** Efficacy and tolerance of a calcium-magnesium-aspartate solution in the treatment of hypocalcemic parturient paresis in cows. *Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr.*, 1999, **112**, 400-406.

**ANONYME.** Directive 64/432/CEE du Conseil du 26 juin 1964 relative à des problèmes de police sanitaire en matière d'échanges intracommunautaires d'animaux des espèces bovine et porcine. *Journal Officiel des Communautés européennes*, 1998, **121**, 1977-2012.

**ANONYME.** Directive 96/82/CE du Conseil du 9 décembre 1996 concernant la maîtrise des dangers liés aux accidents majeurs impliquant des substances dangereuses. *J. Off. Commun. Eur.*, **L10**, 13-33.

**ANONYME.** Pharmacovigilantie: anaphylaxie bij runderen. Onverenigbaarheid tussen vaccins en antibiotica: mogelijke aanleiding tot ernstige shockreacties. [Pharmacovigilance. Anaphylaxie chez les bovins, incompatibilité entre les vaccins et les antibiotiques : raison possible d'une réaction de shock sévère.] Communiqué de presse de Mycofarm, Boehringer, Pfizer et Vétoquinol. Mycofarm, Turnhout, 1996, 3 p.

**ANONYME.** Directive 98/46/CE du Conseil du 24 juin 1998 portant modification des annexes A, D (chapitre I) et F de la directive 64/432/CEE relative à des problèmes de police sanitaire en matière d'échanges intracommunautaires d'animaux des espèces bovine et porcine. *Journal Officiel des Communautés européennes*, 1998, **L198**, 22-39.

**ANONYME.** Décision 1999/449/CE de la Commission du 9 juillet 1999 concernant des mesures de protection contre la contamination par les dioxines de certains produits d'origine animale destinés à la consommation humaine ou animale. *J. Off. Commun. Eur.*, **L175**, 70-82.

**ANONYME.** Directive 2001/82/CE du Parlement européen et du Conseil du 6 novembre 2001 instituant un code communautaire relatif aux médicaments vétérinaires. *J. Off. Commun. Eur.*, **L311**, 1-66.

**ANONYME.** Décision 2002/544/CE de la Commission du 4 juillet 2002 reconnaissant le système de réseau de surveillance des exploitations bovines mis en œuvre en Belgique conformément à la directive 64/432/CEE du Conseil, *J. Off. Commun. Eur.*, 1998, **L176**, 46.

**ANONYME.** Décision 2002/657/CE de la Commission du 12 août 2002 portant modalités d'application de la directive 96/23/CE du Conseil en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats. *J. Off. Commun. Eur.*, **L221**, 8-36.

**ANONYME.** Décision 2003/467/CE de la Commission du 23 juin 2003 établissant le statut d'officiellement indemnes de tuberculose, de brucellose et de leucose bovine enzootique des troupeaux bovins de certains États membres et régions d'États membres. *J. Off. Commun. Eur.*, **L156**, 74-78.

**ANONYMOUS.** Council Directive 64/432/EEC of 26 June 1964 on animal health problems affecting intra-Community trade in bovine animals and swine, *Official Journal of the European Communities*, 1964, **P 121**, 1977-2012.

**ANONYMOUS.** European Commission Decision 2000/764/EC of 29 November 2000 on the testing of bovine animals for the presence of bovine spongiform encephalopathy and amending decision 98/272/EC on epidemio-surveillance for transmissible spongiform encephalopathies. *Eur. Commun. Off. J.*, 2000, **L305**, 35-38.

**ANONYMOUS.** European Parliament and Council. Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2001 laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. *Off. J. Eur. Communities*, 2001, **L 147**, 1-40.

**ANONYMOUS.** European commission, Scientific Steering Committee. Report on « The assessment of the geographical risk of bovine spongiform encephalopathy carried out worldwide by the european commission's scientific steering committee », 2003, p. 41.

**ANONYMOUS.** Commission decision of 23 June 2003 establishing the official tuberculosis, brucellosis, and enzootic-bovine-leukosis-free status of certain Member States and regions of Member States as regard bovine herds. *J. Off. Commun. Eur.*, **L156**, 74-78.

**ANSAY M.** Les dioxins? Quels risques? *Ann. Méd. Vét.*, 1999, **143**, 365-378.

**ARNOLD M., WILESMITH J.** Modelling studies on bovine spongiform encephalopathy occurrence to assist in the review of the over 30 months rule in Great Britain. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 2003, **270**, 2141-2145.

**BAKER J.C.** Lead poisoning in cattle. *Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)*, 1987, **3**, 137-147.

- BAKER J.I., HITES R.A.** Is combustion the major source of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans to the environment ? A mass balance investigation. *Envir. Sci. & Technol.*, 2000, **34(14)**, 2879-2886.
- BARLOW R.** Differential diagnosis of neurological disorders in cattle. *In Practice*, 1989, **11**, 64-73.
- BARLOW R., MACKELLAR A., NEWLANDS G., WISEMAN A., BERRETT S.** Mannosidosis in Aberdeen Angus cattle in Britain. *Vet. Rec.*, 1981, **109**, 441-445.
- BASTIAN S., BUFFEREAU J-P., LE DREAM E., BIND J-L., MÜLLER T., TOMA B.** La maladie d'Aujeszky en France. *Épidémiol. Santé anim.*, 2000, **38**, 109-114.
- BECKET F.W., McDIARMID S.C.** The effect of reduced dose *Brucella abortus* strain 19 vaccination in accredited dairy herds. *Br. Vet. J.*, 1985, **141**, 507-514.
- BEERNAERT H., DE POORTER G.** Intercomparison study of PCBs in feedstuffs, animal fat and foodstuffs. Brussels: Federal Ministry of Public Health and Federal Ministry of Agriculture, 1999, 1-15.
- BELLOC C., POLACK B., SCHWARTZ-CORNIL I., BROWNLIE J., LEVY D.** Bovine immunodeficiency virus: facts and questions. *Vet. Res.*, 1996, **27**, 395-402.
- BELT P.B.G.M., MUILEMAN I.H., SCHREUDER B.E.C., BOS-DE RUIJTER J., GIELKINS A.L.J., SMITS M.A.** Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J. Gen. Virol.*, 1995, **76**, 509-517.
- BENENSON A.S.** Control of Communicable diseases manual. Sixteenth Edition. American Public Health Association, Washington, USA. 1995, p. 577.
- BERCOVICH Z., LAGENDIJK W., BOKHOUT B.A.** Evaluation of a delayed-type hypersensitivity test for the diagnosis of *Brucella abortus* infection in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1989, **21**, 213-218.
- BERCOVICH Z., HAAGSMA J., VAN LIPZIG J. H., TAAIJKE R.** Specificity of the skin delayed-type hypersensitivity test in brucellosis free cattle tested with a *Brucella* allergen. *Zentralblatt-Veterinarmedizin-B*, 1993, **40**, 582-588.
- BERCOVICH Z., MUSKENS J. A.** The sensitizing effect of a *Brucella abortus* antigen in cattle after repeated intradermal inoculations. *Veterinary Microbiology*, 1996, **51**, 85-93.
- BERNARD A., HERMANS C., BROECKAERT F., DE POORTER G., DE COCK A., HOUINS G.** Food contamination by PCBs and dioxins. *Nature*, 1999, **401**, 231-232.

**BERNARD A., FIERENS S., MAIRESSE H., HERMANS C., BROECKAERT F., FOCANT J-F., DEPAUW E.** Incinérateurs, crise dioxine et risques sanitaires pour la population belge. *Bulletins de la Classe de l'Académie Royale des Sciences*, 2001, **13**, 103-117.

**BERNARD A., BROECKAERT F., DE POORTER G., DE COCK A., HERMANS C., SAEGERMAN C., HOUINS G.** The Belgian PCB/Dioxin incident : analysis of the food chain contamination and health risk evaluation. *Environ. Res.*, 2002, **88**, 1-18.

**BERRY P.H., HOWELL J.M., COOL R.D., RICHARDS R.B., PEET R.L.** Central nervous system changes in sheep and cattle affected with natural or experimental annual ryegrass toxicity. *Aust. vet. J.*, 1980, **56**, 402-403.

**BHONGBHIBHAT N., ELBERG S.S., CHEN T.H.** Characterization of brucella skin test antigens. *J. Infect. Dis.*, **122**, 70-82.

**BIACABE A.G., LAPLANCHE J.L., RYDER S., BARON T.** Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep.*, 2004, **5(1)**, 110-115.

**BITEAU-COROLLER F., HENDRIKX P., GRILLET C., ALBINA E., ROGER F.** Evaluation des tests sérologiques utilisés dans le cadre de la surveillance de la fièvre catarrhale du mouton en France. *Epidémiol. et santé anim.*, 2003, **44**, 105-114.

**BLASCO J. M., MARIN C., JIMENEZ DE BAGUES M., BARBERAN M., HERNANDEZ A., MOLINA L., VELASCO J., DIAZ R., MORIYON I.** Evaluation of allergic and serological tests for diagnosing *Brucella melitensis* infection in sheep. *J. clin. Microbiol.*, 1994, **32**, 1835-1840.

**BLOOD E.C., RADOSTITS O.M.** Diseases of the nervous system. In *Veterinary Medicine*, 7<sup>e</sup> éd. Baillière Tindall, Londres, 1989, 410-448.

**BODE L., DÜRRWALD R., LUDWIG H.** Borna virus infections in cattle associated with fatal neurological disease. *Vet. Rec.*, 1994, **135**, 283-284.

**BOELAERT F., VENOO E., VERLOO D., SAEGERMAN C., MAQUET G., LOMBA M., DE MEULEMEESTER L., WULLEPIT J., WALRAVENS K., MINTIENS K., GODFROID J.** Diagnostic validation of bovine brucellosis serological tests for epidemiosurveillance purposes. Brucellosis 2003 International Research Conference, including the 56 Brucellosis Research Conference, September 15-17, 2003, University of Navarra, Pamplona, Spain.

**BOTTERON C.** Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, 2002, **144**, 639-644.

**BOYER I.J., KOKOSKI C.J., BOLGER P.M.** Role of FDA in establishing tolerance levels for dioxin and PCBs in aquatic organisms. *J. Toxicol. Environ. Health*, 1991, **33**, 93-101.



**BRADLEY R.** Bovine spongiform encephalopathy (BSE): the current situation and research. *Eur. J. Epidemiol.*, 1991, **7**, 532-544.

**BRADLEY R.** Les encéphalopathies spongiformes animales en Grande Bretagne. *Bull. Soc. Vét. Prat. De France*, 1994, **78**, 339-385.

**BRADLEY R., WILESMITH J. W.** Epidémiologie des encéphalopathies spongiformes en Grande-Bretagne. *Epidémiol. et santé anim.*, 1991, **19**, 27-48.

**BRADLEY R., WILESMITH J.W.** Epidemiology and control of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Br. Med. Bull.*, 1993, **49**, 932-959.

**BRAUN U.** Clinical signs and diagnosis of BSE. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 2002, **144**, 645-652.

**BRAUN U., EHRENSPERGER F., BRACHER V.** The Weaver syndrome in cattle. Clinical, biochemical and pathologico-anatomic studies in a Braunvieh/Brown Swiss cow with bovine progressive degenerative myeloencephalopathy. *Tierärztl. Praxis*, 1987, **15**, 139-144.

**BRAUN U., KIHM U., PUSTERLA N., SCHÖNMANN M.** Procédure d'examen clinique en cas de suspicion d'encéphalopathie spongiforme bovine. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 1997, **139**, 35-41.

**BRAUN U., SCHICKER E., HORNLMANN B.** Diagnostic reliability of clinical signs in cows with suspected bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.*, 1998, **143**, 101-105.

**BRAUN U., ROGG E., WALSER M., NEHRBASS D., GUSCETTI F., MATHIS A., DELPLAZES P.** *Trypanosoma theileri* in the cerebrospinal fluid and brain of a heifer with suppurative meningoencephalitis. *Vet. Rec.*, 2002, **150**, 18-19.

**BRAUN U., SCHWEIZER G., HILBE M.** Epileptiform convulsions in a cow with degeneration of the hippocampus. *Vet. Rec.*, 2002, **150**, 281-282.

**BREIMAN L., FRIEDMAN J. H., OLSHEN R. A., STONE C. J.** Classification and Regression Trees, Wadsworth S., Pacific Grove, California, 1984.

**BRENNER H.** Use and limitations of dual measurements in correcting for non differential exposure misclassification. *Epidemiology*, 1992, **3**, 216-222.

**BREWER B.D.** Examination of the bovine nervous system. *Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)*, 1987, **3**, 13-24.

**BRGLEZ I., BATIS J.** Brucellosis in wild hares in Slovenia. *Vet. Glas.*, 1981, **6**, 555-560.

**BROCHIER B., VANOPDENBOSCH E., COPPENS P., THOONEN H., COSTY F., COIGNOUL F., LACAEYSE D., PASTORET P.-P.** Réseau d'épidémiosurveillance des

encéphalopathies spongiformes en Belgique : premiers résultats. *Ann. Med. Vet.*, 1992, **136**, 245-247.

**BROWN C.** Importance des maladies émergentes pour la santé publique et animale et pour les échanges commerciaux. 69<sup>ème</sup> Session Générale du Comité International de l'Organisation mondiale de la santé animale, 27 mai au 1<sup>er</sup> juin 2001, Paris, document 69 SG/9, Office international des Epizooties : Paris, 2001, 6 p.

**BROWNLIE J., COLLINS M.E., HEATON P.** Bovine immunodeficiency-like virus: a potential cause of disease of cattle? *Vet. Rec.*, 1994, **134**, 289-291.

**BRUCE M. E., WILL R. G., IRONSIDE J. W., MCCONNELL I., DRUMMOND D., SUTTIE A., MCCARDLE L., CHREE A., HOPE J., BIRKETT C., COUSENS S., FRASER H., BOSTOCK C. J.** Transmissions to mice indicate that "new variant" CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, 1997, **389**, 498-501.

**BRUNETON J.** Plantes toxiques. Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. Lavoisier, Paris, 1996, 509 pp.

**BRYAN L., SCHMUTZ S., HODGES S.D., SNYDER F.F.** Bovine beta-mannosidase deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990, **173**, 491-495.

**BRYANT P.L., CLARCK G.C., PROBST M.R., ABBOTT B.D.** Effects of TCCD on Ah receptor, ARNT, EGF, and TGF-alpha expression in embryonic mouse urinary tract. *Teratology*, 1997, **55**, 326-337.

**BURNET E.** Su un nouveau procédé de diagnostic de la fièvre méditerranéenne. *C.R. Acad. Sci.*, 1922, **171**, 421-423.

**BURONFOSSE F., PINEAU X., ALVES DE OLIVEIRA L.** Les principales intoxications. *In* Maladies des bovins (Institut de l'élevage, dir.). France Agricole, Paris, 2000, 216-223.

**CACHIN M., VANDEVELDE M., ZURBRIGGEN A.** A case of spongiform encephalopathy ('cattle madness') in a cow in Switzerland. *Schweizer Arch. Tierheilkd.*, 1991, **133**, 53-57.

**CALAVAS D., DESJOUIS G., COLLIN E., SCHELCHER F., PHILIPPE S., SAVEY M.** Incidence et typologie des maladies des bovins adultes à expression nerveuse en France. *Épidémiol. Santé anim.*, 2001, **39**, 121-129.

**CALAVAS D., DUCROT C.** L'ESB en France. Synthèse sur l'évolution de l'épizootie à partir des données disponibles au 1<sup>er</sup> janvier 2003. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 2003, 16 pp.

**CALLIS J.J., DARDIRI A.H., FERRIS D.H., GAY J.G., MASON J., WILDER F.W.** Illustrated Manual –Manuel illustré sur certaines maladies contagieuses des animaux domestiques.

Commission mexicano-américaine pour la prévention de la fièvre aphteuse, Mexico, 1985, 27-31.

**CANNING P., ROTH J., DEYOE B.** Release of 5'-guanosine monophosphate and adenine by *Brucella abortus* and their role in the intracellular survival of the bacteria. *J. Infect. Dis.*, 1986, **154**, 464-470.

**CANNON R.M., ROE R.T.** Livestock Disease Surveys: a Field Manual for Veterinarians. Australian Bureau of Animal Health, Canberra, 1982, 34 pp.

**CAPLAZI P., WALDVOGEL A., STITZ L., BRAUN U., EHRENSPERGER F.** Borna disease in naturally infected cattle. *J. comp. Pathol.*, 1994, **111**, 65-72.

**CAPLAZI P., MELZER K., GOETZMANN R., ROHNER-COTTI A., BRACHER V., ZLINSZKY K., EHRENSPERGER F.** Borna disease in Switzerland and in the principality of Liechtenstein. *Schweizer Arch. Tierheilkd.*, 1999, **141**, 521-527.

**CAPUCCHIO M.T., GUARDA F., POZZATO N., COPPOLINO S., CARACAPPA S., DI MARCO V.** Clinical signs and diagnosis of scrapie in Italy: a comparative study in sheep and goats. *J. Vet. Med.*, 2001, **48**, 23-31.

**CARLSON D., PERDEW G.** A dynamic role for the Ah receptor in cell signaling ? Insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 2002, **15**, 317-325.

**CAROFF M., BUNDLE D.R.B., PERRY M.B.** Structure of the O-chain of the phenol-phase soluble cellular lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9. *Eur. J. Biochem.*, 1984, **139**, 195-200.

**CASALONE C., ZANUSSO G., ACUTIS P., FERRARI S., CAPUCCI L., TAGLIAVINI F., MONACO S., CAMELLI M.** Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2004, **101(9)**, 3065-3070.

**CASARETT L.J., AMDUR M.O., KLAASSEN C.D.** Casarett & Doull's Toxicology: the basis science of poisons, 5<sup>th</sup> Ed. McGraw Hill, 1996, page 11.

**CAVIRANI S., DONOFRIO G., CHIOCCO D., FONI E., MARTELLI P., ALLEGRI G., CABASSI C.S., DE IACO B., FLAMMINI C.F.** Seroprevalence to bovine immunodeficiency virus and lack of association with leukocyte counts in Italian dairy cattle. *Prev. vet. Med.*, 1998, **37**, 147-157.

**CENTERS FOR EPIDEMIOLOGY AND ANIMAL HEALTH.** National Animal Health Monitoring System. Dairy'96, Part I: Reference of 1996 dairy management practices. United States Department of Agriculture, Fort Collins, 1996, 41 pp.

**CENTERS FOR EPIDEMIOLOGY AND ANIMAL HEALTH.** National Animal Health Monitoring System. Reference of 1996 U.S. sheep health and management practices, United States Department of Agriculture, Fort Collins, 1996a, 26 pp.

**CENTERS FOR EPIDEMIOLOGY AND ANIMAL HEALTH.** National Animal Health Monitoring System. Beef'97, Part II: Reference of 1997 beef cow-calf health and health management practices. United States Department of Agriculture, Fort Collins, 1997, 38 pp.

**CENTRE D'INFORMATIONS VETERINAIRES EN PHARMACO-TOXICOLOGIE.** Analyses toxicologiques. CIVPT, faculté de médecine vétérinaire de l'université de Liège (<http://www.ulg.ac.be/fmv/civpt.htm>, consulté le 13 décembre 2002).

**CHELLE P.L.** Un cas de tremblante chez une chèvre. *Bull. Acad. Vét. Fr.*, 1942, **15**, 294-295.

**CHERWONOGRODZKY J.W., DUBRAY G., MORENO F., MAYER H.** Antigens of *Brucella*, p. 19-64. In: Nielsen, K., Ducan, R. (Eds), Animal Brucellosis, CRC Press, Orlando, 1990.

**CLARCK L.A., PREGIBON D.A.** Trees-based models, p. 377-419. In Chambers J.A. and T.J. Hastie (ed.), Statistical models. Wadsworth, Pacific Grove, California, USA, 1992.

**CLOECKAERT A., ZYGMUNT M. S., NICOLLE J-C., DUBRAY G., LIMET J.N.** O-chain expression in the rough *Brucella melitensis* strain B115: induction of O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies and intracellular localization demonstrated by immunoelectron microscopy. *Journal of General Microbiology*, 1992, **138**, 1211-1219.

**COBB S.P., HOGG R.A., CHALLONER D.J., BRETT M.M., LIVESEY R.T., SHARPE R.T., JONES T.O.** Suspected botulism in dairy cows and its implications for the safety of human food. *Vet. Rec.*, 2002, **150**, 5-8.

**COCKCROFT P.D.** Pattern-matching models for the differential diagnosis of bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.*, 1999, **144**, 607-610.

**COCKCROFT P. D.** Clinical sign profile likelihood ratios for bovine spongiform encephalopathy suspects. *Res. Vet. Sci.*, 2000, **68**, 285-290.

**COLIN E.** Intoxication d'un cheptel bovin par une mycotoxine endophyte : observation d'un cas de rye-grass-stagger. *Point vét.*, 1998, **29**, 1157-1159.

**COMMISSION DU CODEX ALIMENTARIUS.** Consideration of intake of pesticide residues. Acute dietary risk assessment. Codex Committee on Pesticide residues, Thirty-Second Session, The Hague, The Netherlands, 1-8 May 2000. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization : Rome, 2000, pp. 11.

**COMMISSION EUROPEENNE.** Décision 96/449/CE de la Commission du 18 juillet 1996 relative à l'agrément de systèmes de traitement thermique de remplacement pour la

transformation de déchets animaux au regard de l'inactivation des agents de l'encéphalopathie spongiforme. *J. Off. Commun. Eur.*, **L184**, 43-46.

**COMMISSION EUROPEENNE.** Décision 97/534/CE de la Commission du 30 juillet 1997 relative à l'interdiction de l'utilisation de matériels présentant des risques au regard des encéphalopathies spongiformes transmissibles. *J. Off. Commun. Eur.*, **L216**, 95 –98.

**COMMISSION EUROPEENNE.** Décision 98/272/CE de la Commission du 23 avril 1998 relative à la surveillance épidémiologique des encéphalopathies spongiformes transmissibles et modifiant la décision 94/474/CE. *J. Off. Commun. Eur.*, **L122**, 59-63.

**COMMISSION EUROPEENNE.** Scientific Steering Committee. Opinion sur “ The safety of meat and bone meal from mammalian animals naturally or experimentally susceptible to transmissible Spongiform Encephalopathy.” Adoptée les 26-27 mars 1998. Commission européenne : Bruxelles, 1998a, 15 p.

**COMMISSION EUROPEENNE.** Scientific Steering Committee. Mise à jour du rapport scientifique sur “ The safety of meat and bone meal derived from mammalian animals fed to non-ruminant food-producing farm animals.” Adoptée les 24-25 septembre 1998. Commission européenne : Bruxelles, 1998b, 21 p.

**COMMISSION EUROPEENNE.** Décision 1999/465/CE de la Commission du 13 juillet 1999 établissant le statut d'officiellement indemne de leucose bovine enzootique des troupeaux bovins de certains États membres ou régions d'États membres. *J. off. Communautés eur.*, **L 181**, 16 juillet, 32-33.

**COMMISSION EUROPEENNE.** Règlement 1999/508/CE du 4 mars 1999 de la Commission modifiant les annexes I à IV du règlement 2377/1990/CEE du Conseil établissant une procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale. *J. off. Communautés eur.*, **L 60**, 16-52.

**COMMISSION EUROPEENNE.** Scientific Steering Committee. The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines. Rapport du 8 juillet 1999. Commission européenne : Bruxelles, 1999, 36 p.

**COMMISSION EUROPEENNE.** Scientific Steering Committee. Preliminary opinion on the oral exposure of humans to the BSE agent: infective dose and species barrier, adopted by the Scientific Steering Committee at its meeting of 2-3 March 2000. Commission européenne : Bruxelles, 2000, 53 p.

**COMMISSION EUROPEENNE.** Directive 2001/79/CE de la Commission du 17 septembre 2001 modifiant la directive 87/153/CEE du Conseil portant fixation de ligne directrices pour l'évaluation des additifs dans l'alimentation des animaux. *J. Off. Commun. Eur.*, **L267**, 1-26.

**COMMISSION EUROPEENNE.** Règlement 2001/999/CE du 22 mai 2001 du Parlement européen et du Conseil fixant les règles pour la prévention, le contrôle et l'éradication de certaines encéphalopathies spongiformes transmissibles. *J. Off. Commun. Eur.*, 2001, **L147**, 1-40.

**COMMISSION EUROPEENNE.** Règlement 2003/1053/CE du 19 juin 2003 modifiant le règlement 999/2001/CE du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les tests rapides. *J. Off. Commun. Eur.*, 2003a, **L152**, 8-9.

**COMMISSION EUROPEENNE.** Scientific Steering Committee. The evaluation of five rapid tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines (2<sup>ND</sup> study). Rapport du 27 mars 2003. Commission européenne : Bruxelles, 2003b, 95 p.

**COMMISSION EUROPEENNE.** EU works to reduce diseases caused by a polluted environment. *Consumer Voice*, June 2004, 2.

**CONFEDERATION BELGE DE L'INDUSTRIE LAITIERE.** Situation économique dans le secteur laitier en 1998. Perspectives pour 1999, 1999, 1-48.

**CONSEIL EUROPEEN.** Décision 2000/766/CE du Conseil du 4 décembre 2000 relative à certaines mesures de protection à l'égard des encéphalopathies spongiformes transmissibles et à l'utilisation de protéines animales dans l'alimentation des animaux. *J. Off. Commun. Eur.*, **L306**, 32-33.

**CORBEL M.J.** Studies on the mechanism of the Rose Bengal Plate Test for bovine Brucellosis. *Br. Vet. J.*, 1973, **129**, 157-166.

**CORBEL M. J.** Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross-reaction. *Veterinary Bulletin*, 1985, **55**, 927-942.

**CORBEL M.J.** Brucellosis: an overview. *Emerg. Inf. Dis.*, 1997, **3(2)**, 213-221.

**CORBEL M.J., WRAY C.** The effect of natural infection with *Salmonella urbana* on the serological status of cattle in relation to tests for brucellosis. *Br. Vet. J.*, 1975, **131**, 324-334.

**CORNER L.A., ALTON G.G., IYER H.** Distribution of *Brucella abortus* in infected cattle. *Australian Veterinary Journal*, 1987, **64**, 241-244.

**CORTEZ P.P., DIAS PEREIDA P., CORTEZ A., THOMPSON G.** First confirmed case of malignant catarrhal fever in a cow in Portugal. *Vet. Rec.*, 2001, **149**, 558-559.

**COUDERT M., BELLI P., SAVEY M., MARTEL J.L.** Le réseau national d'épidémiologie de l'encéphalopathie spongiforme bovine. *Épidémiol. Santé anim.*, 1995, **27**, 59-67.

**COX D.** Achtergronden puntblootstelling van de Belgische bevolking aan dioxins. Thèse voorgelegd in het raam van het GGS milieudeskundige, Free University of Brussels, 1999.

**CRANWELL M. P., HANCOCK R. S., HINDSON J. R., HALL S. A., DANIEL N. J., HOPKINS A. R., WONNACOTT B., VIVIAN M., HUNT P.** Bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.*, 1988, **122**, 190.

**CRAWFORD R.P., WILLIAMS J.D., HIBER J.D., CHILDERS A.B.** Biotypes of *Brucella abortus* and their value in epidemiological studies of infected cattle herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1979, **175**, 1274-1277.

**CRICHTON N. J., HINDE J. P., MARCHINI J.** Models for diagnosing chest pain: is CART helpful ? *Stat. Med.*, 1997, **16**, 717-727.

**CROWELL W.A., DIVERS T.J., MARSHALL A.E., NUSBAUM K.E., LARSEN L.** Neomycin toxicosis in calves. *Am. J. vet. Res.*, 1981, **42**, 29.

**CUNNINGHAM B.** A difficult disease called brucellosis. *In*: Crawford R.P. & Hidalgo R.J., (eds). Bovine Brucellosis. An International Symposium. College Station, London, Texas A&M University Press, 1977.

**CUNNINGHAM B., MILER J.J., DOLAN L., McKEON F., O'MEARA M.** Immunological characteristics in cattle of allergens derived from smooth *Brucella abortus* S99. *Vet. Rec.*, 1980, **107**, 369-375.

**CURTIS C.R., MAURITSEN R.H., SALMAN M.D., ERB H.N.** The enigma of herd: a comparison of different models to account for group effects in multiple logistic regression analysis. *Acta Vet. Scand.*, 1988, **84**, 462-465.

**DAUPHIN G., LEGAY V., SAILLEAU C., SMONDACK S., HAMMOUMI S., ZIENTARA S.** Evidence of Borna disease virus genome detection in French domestic animals and in foxes. *J. gen. Virol.*, 2001, **82**, 2199-2204.

**DAWSON M., BRADLEY R.** A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.*, 1987, **121**, 419-420.

**DE BOSSCHERE H., ROELS S., VANOPDENBOSCH E.** Atypical case of bovine spongiform encephalopathy in an east-flemish cow in Belgium. *J. Appl. Res. Vet. Med.*, 2004, **2**, 1-3.

**DE BRABANDER H.** Dioxines et PCBs. *In* : Enquête parlementaire sur l'organisation de la production de viande, de produits laitiers et d'œufs en Belgique et sur les responsabilités politiques dans le cadre de la dioxine. Document 500018/1999 (S.E.). Chambre des représentants de Belgique : Bruxelles, 1999, 55-61.

**DEBONGNIE P., HALLAUX B., ETIENNE F., PUSSEMIER L.** Environmental PCB contaminations. *In* Proceedings of the 8th annual meeting of the Flemish society for veterinary epidemiology and economics, held on 26 October 2000 in Brussels, Belgium, 2000, 72-73.

**DEBONGNIES P., HALLAUX B., VAN ELSSEN Y., PUSSEMIER L.** Contamination of animal products by PCBs in the environment. Scientific report 2001-2002. Veterinary and Agrochemical Research Centre, Brussels, 2002, 50-51.

**DELAUNOIS A.** Le rôle du médecin vétérinaire dans l'évaluation du risque toxicologique. *Ann. Méd. vét.*, 1998, **142**, 307-317.

**DELAUNOIS A., GUSTIN P., ANSAY M.** Toxicité des herbicides chez les animaux domestiques. *Ann. Méd. vét.*, 1992, **136**, 181-192.

**DELAUNOIS A., BLODEN S., GUSTIN P.** Premier bilan d'activités du centre d'informations vétérinaires en pharmaco-toxicologie. *Ann. Méd. vét.*, 1999, **143**, 191-202.

**DENNY G. O., HUESTON W. D.** Epidemiology of bovine spongiform encephalopathy in Northern Ireland 1988 to 1995. *Vet. Rec.*, 1997, **140**, 302-306.

**DEPARTMENT FOR ENVIRONMENT, FOOD AND RURAL AFFAIRS.** Bovine spongiform encephalopathy in Great Britain: confirmed cases by year of birth. [Online.] <http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/bse-statistics/bse/ybirth.html>, 2000.

**DEPARTMENT FOR ENVIRONMENT, FOOD & RURAL AFFAIRS.** Bovine spongiform encephalopathy in Great Britain – Monthly statistics – Youngest and oldest cases by year of onset (passive surveillance only). Document du 30 juin 2002. DEFRA, Londres (<http://www.defra.gov.uk/animalh/bse-statistics/bse/young-old.html>, consulté le 1<sup>er</sup> juillet 2002).

**DEPARTMENT FOR ENVIRONMENT, FOOD AND RURAL AFFAIRS.** Bovine spongiform encephalopathy in Great Britain : confirmed cases by year of birth. [en ligne] (2003a) Adresse URL : <http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/bse-statistics/bse/yrbirth.html> Consulté le 15/09/2003.

**DEPARTMENT FOR ENVIRONMENT, FOOD AND RURAL AFFAIRS.** Bovine spongiform encephalopathy in Great Britain : Youngest and oldest cases by year of onset (passive surveillance only). [en ligne] (2003b) Adresse URL : <http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/bse-statistics/bse/young-old.html> Consulté le 15/09/2003.

**DEPARTMENT FOR ENVIRONMENT, FOOD AND RURAL AFFAIRS.** Age distribution of confirmed scrapie cases (in sheep and goats) from 1998 to 2002. [Online, June 2004a.] [http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/bse-science/scrapie/scrapie\\_age.PDF](http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/bse-science/scrapie/scrapie_age.PDF)

**DEPARTMENT FOR ENVIRONMENT, FOOD AND RURAL AFFAIRS.** Bovine spongiform encephalopathy in Great Britain: youngest and oldest cases by year of onset (passive surveillance only). [Online, June 2004b.] <http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/bse-statistics/bse/young-old.html>.



**DEPARTMENT FOR ENVIRONMENT, FOOD AND RURAL AFFAIRS.** Bovine spongiform encephalopathy in Great Britain: confirmed cases by year of birth. [Online, June 2004c.] <http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/bse-statistics/bse/ybirth.html>.

**DEPELCHIN A.** Immunité non spécifique. p. 13-27. In : Immunologie animale. Pastoret P .-P., Govaerts A., Bazin H. (ed.) Flammarion, Paris, France, 1990.

**DEROIN P.** Maladies émergentes : la réponse nécessaire. *Biofutur*, 2003, **236**, 6.

**DESLYS J.P., COMOY E., HAWKINS S., SIMON S., SCHIMMEL H., WELLS G., GRASSI J., MOYNAGH J.** Screening slaughtered cattle for BSE. *Nature*, 2001, **409**, 476-478.

**DESMECHT D., CASSART D., ROLLIN F., COIGNOUL F., THAM D.-M.** Molecular and clinicopathological diagnosis of non-wildebeest associated malignant catarrhal fever in Belgium. *Vet. Rec.*, 1999, **144**, 388.

**DETWILER L.A.** Scrapie. *Rev. sci. techn. Off. int. Epiz.*, 1992, **11**, 491-537.

**DIAZ R., LEVIEUX D.** Rôle respectif en sérologie de la brucellose bovine des antigènes et des immunoglobulines G1 et G2 dans les tests d'agglutination, de Coombs et au rose Bengale ainsi que dans le phénomène de zone. *C.R. Acad. Sci.*, 1972, **274**, 1593-1596.

**DICKINSON A.G., STAMP P.J.T., RENWICK C.C.** Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep. *J. Comp. Pathol.*, 1974, **84**, 19-25.

**DIVE M.** Rusticité : l'opinion d'un vétérinaire praticien. *Elevages belges*, 2001, **4**, 25-26.

**DOHERR M.G., HEIM D., FATZER R., COHEN C.H., VANDEVELDE M., ZURBRIGGEN A.** Targeted screening of high-risk cattle populations for BSE to augment mandatory reporting of clinical suspects. *Prev. Vet. Med.*, 2001, **51**, 3-16.

**DOHERR M.G., HETT A.R., RÜFENACHT J., ZURBRIGGEN A., HEIM D.** Geographical clustering of cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) born in Switzerland after the feed ban. *Vet. Rec.*, 2002, **151**, 467-472.

**DOHOO I., WRIGHT P., RUCKERBAUER G., SAMAGH B., ROBERTSON F., FORBES L.** A comparison of five serological tests for bovine brucellosis. *Can. J. Vet. Res.*, 1986, **50**, 485-493.

**DOHOO I., MARTIN W., STRYHN H.** Veterinary epidemiologic research. McPike S.M. (ed.), AVC Inc, Prince Edward Island, Canada, 2003, 706 pages.

**DONEV B., STOIANOV K., DZHUROV A., DULEV M.** Toxicity of 'Farmakhim' tetramisole in laboratory and farm animals. *Vet. Med. Nauki*, 1982, **19**, 70-78.

- DONNELLY C.A.** Bovine spongiform encephalopathy in the United States : an epidemiologist's view. *N. Engl. J. Med.*, **350 (6)**, 539-542.
- DROTMAN D.P., BAXTER P.J., LIDDLE J.A., BROKOPP C.D., SKINNER M.D.** Contamination of the food chain by polychlorinated biphenyls from a broken transformer. *Am. J. Public Health*, 1983, **73**, 290-292.
- DUBEY J.-P.** A review of toxoplasmosis in cattle. *Vet. Parasitol.*, 1986, **22**, 177-202.
- DUBRAY G., PLOMMET M.** Structure et constituants des *Brucella*. Caractérisation des fractions et propriétés biologiques. In: Proceedings of International Symposium on brucellosis (II), Rabat 1975. S. Karger (ed.) : Basel. *Develop. Biol. Standard.*, 1976, **31**, 68-91.
- DUCROT C., CALAVAS D., MORIGNAT E., VINARD J.L., COUDERT M., SAVEY M.** Surveillance et épidémiologie de l'ESB en France. Analyse de la situation en mai 2001. *Epidémiol. et santé anim.*, 2001, **40**, 15-22.
- DUEE J.P., GAUMONT A.** La brucellose porcine en France. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 1974, **113**, 1-19.
- DUFEY J.** Le dépistage confronté aux réalités du terrain. *Ann. Méd. Vét.*, 1992, **136**, 281-283.
- DUFOUR B.** Méthode d'évaluation technico-économique de la qualité du fonctionnement des réseaux de surveillance épidémiologique des maladies infectieuses animaux en vue de leur amélioration. *Epidémiol. et santé anim.*, 1999, **35**, 11-20.
- DURAND B., SAVEY M., MOUTOU F.** Etude critique de la surveillance de l'encéphalopathie spongiforme bovine dans le monde. *Epidémiol. et santé anim.*, 1998, **34**, 29-39.
- DURAND B., CALAVAS D., PHILIPPE S., DUCROT C.** Modélisation de la dynamique de l'infection dans les troupeaux français atteints d'encéphalopathie spongiforme bovine. *Epidémiol. et santé anim.*, 1999, **35**, 111-122.
- DURAND F.** Le réseau VIALINE. *Epidémiol. et santé anim.*, 1995, **27**, 31-43.
- EL HAMIDI M., LEIPOLD H.W., COOK J.E.** Ultrastructural changes in Brown Swiss cattle affected with bovine progressive degenerative myeloencephalopathy (Weaver syndrome). *Zentralbl. Veterinärmed., A*, 1990, **37**, 729-736.
- ELBERS A.R.W., BOUMA A., STEGEMAN J.A.** Quantitative assessment of clinical signs for the detection of classical swine fever outbreaks during an epidemic. *Vet. Microbiol.*, 2002, **85**, 323-332.
- EMBURY D.H., JERRETT I.V.** Mannosidosis in Galloway calves. *Vet. Pathol.*, 1985, **22**, 548-551.

**EMMERZAAL A., DE WIT J.J., DIJKSTRA T., BAKKER D., VAN ZIJDERVELD F.G.** The Dutch *Brucella abortus* monitoring programme for cattle: the impact of false-positive serological reactions and comparison of serological tests. *Vet. Quart.*, 2002, **24**, 40-46.

**ENAN E., EL-SABEAWY F., SCOTT M., OVERSTREET J., LASLEY B.** Alterations in the growth factor signal transduction pathways and modulators of the cell cycle in endocervical cells from macaques exposed to TCDD. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1998, **151**, 283-293.

**ENJALABERT F., NICOT M.C., BAYROUTHE C., MONCOULON R.** Ketone bodies in milk and blood of dairy cows: relationship between concentrations and utilization for detection of subclinical ketosis. *J. Dairy Sci.*, 2000, **84**, 583-589.

**ENRIGHT, F.M.** 1990. The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. In: Nielsen K. & Duncan B. (eds). Animal brucellosis. CRC Press, Orlando, pp. 301-320.

**ERDOGAN H.M., CETINKAYA B., GREEN L.E., CRIPPS P.J., MORGAN K.L.** Prevalence, incidence, signs and treatment of clinical listeriosis in dairy cattle in England. *Vet. Rec.*, 2001, **149**, 289-293.

**EUROPEAN COLLEGE OF VETERINARY PUBLIC HEALTH.** Consultation du site internet en date du 12 février 2004 : <http://www.vu-wien.ac.at/ausland/ECVPHinfo.htm>.

**EUROPEAN COMMISSION.** Decision of 27 June 1994 concerning certain protection measures with regard to bovine spongiform encephalopathy and the feeding of mammalian derived protein. *Off. J. Eur. Comm.*, 1994, **L172**, 23-24.

**EUROPEAN COMMISSION.** Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animals products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/ECC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. *Off. J. Eur. Comm.*, 1996, **L 125**, 10-32.

**EUROPEAN COMMISSION.** Decision 96/449/EC of July 18<sup>th</sup> 1996 on the approval of alternative heat treatment systems for processing animal waste with a view to the inactivation of spongiform encephalopathy agents. *Off. J. Eur. Comm.*, 1996, **L184**, 43-46.

**EUROPEAN COMMISSION.** Decision 97/534/EC of July 30<sup>th</sup> 1997 on the prohibition of the use of material presenting risks as regards transmissible spongiform encephalopathies. *Off. J. Eur. Comm.*, 1997, **L216**, 95-98.

**EUROPEAN COMMISSION.** Health and Consumer Protection Directorate-General. Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. Report on the modification of technical annexes of Council Directive 64/432/EEC to take account of scientific developments regarding tuberculosis, brucellosis and enzootic bovine leucosis, adopted 11 October 1999.

**EUROPEAN COMMISSION.** Commission Decision 1999/449/EC of 9 July 1999 on protective measures with regard to contamination by dioxins of certain products of animal origin intended for human or animal consumption. *Off. J. Eur. Comm.*, 1999a, **L 175**, 70-82.

**EUROPEAN COMMISSION.** Commission Decision 1999/551/EC of 6 August 1999 amending Decision 1999/449/EC on protective measures with regard to contamination by dioxins of certain products of animal origin intended for human or animal consumption. *Off. J. Eur. Comm.*, 1999b, **L 209**, 42-49.

**EUROPEAN COMMISSION.** La contamination d'aliments pour animaux par les dioxines. Rapport de la Délégation Belge sur le secteur bovin. Comité vétérinaire permanent du 21-22 septembre 1999, Bruxelles, 1999c, 1-65.

**EUROPEAN COMMISSION.** Regulation 2000/2777/EC of December 18<sup>th</sup> 2000 adopting exceptional support measures for the beef market. *Off. J. Eur. Comm.*, 2000, **L321**, 47-51.

**EUROPEAN COMMISSION.** Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the dioxin contamination of feeding stuffs and their contribution to the contamination of food of animal origin. Brussels: Health and Consumer Protection Directorate-General 6 November 2000, 2000a, p. 105.

**EUROPEAN COMMISSION.** Opinion of the Scientific Committee on Food on the risk assessment of dioxins and dioxin-like PCBs in food. Brussels: Health and Consumer Protection Directorate-General Document SCF/CS/CNTM/DIOXIN/8, adopted on 22 November 2000, 2000b, p. 115.

**EUROPEAN COUNCIL.** Decision 2000/766/EC of December 4<sup>th</sup> 2000 concerning certain protection measures with regard to transmissible spongiform encephalopathies and the feeding of animal protein. *Off. J. Eur. Comm.*, 2000, **L306**, 32-33.

**EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL.** Regulation (EC) N° 999/2001 of 22 May 2001 laying down rules the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. *Off. J. Eur. Comm.*, 2001, **L147**, 1-40.

**EWERS U., WITTSIEPE J., SCHREY P., SELENKA F.** Levels of PCDD/PCDF in blood fat as indices of the PCDD/PCDF body burden in humans. *Toxicol. Lett.*, 1996, **1-3**, 327-334.

**FATZER R., F. STECK.** Histologische differentialdiagnose bei tollwurverdächtigen rindem. *Schweizer Arch. Tierheilkd.*, 1974, **116**, 347-356.

**FATZER R., FANKHAUSER R.** Beiträge zur Neuropathologie der Wiederkäuer. II. Neoplasmen. *Schweizer Arch. Tierheilkd.*, 1977, **119**, 67-78.

**FATZER R., VANDEVELDE M., GOTTSTEIN B.** Cerebral taeniid oncospherical lesions in two BSE suspects. *Vet. Rec.*, 2002, **150**, 46-47.

**FEIL V.J., HUWE J.K., ZAYLSKIE R.G., DAVISON K.L., ANDERSON V.L., MARCHELLO M., TIERNAN T.O.** Chlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofuran concentration in beef animals from a feeding study. *J. Agric. Food. Chem.*, 2000, **48**, 6163-6173.

**FENSTERBANK R.** Brucellose des bovines et des petits ruminants : diagnostic, prophylaxie et vaccination. *Rev. sci. techn. Off. Int. Epiz.*, 1986, **5(3)**, 587-603.

**FENSTERBANK R.** Allergic diagnosis of bovine brucellosis. 2. Use of the allergic test in infected herds. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1977, **8**, 195-201.

**FENSTERBANK R.** Brucellose des bovins et des petits ruminants : diagnostic, prophylaxie et vaccination. *Rev. sci. techn. Off. Int. Epiz.*, 1986, **5 (3)**, 587-603.

**FENSTERBANK R., PLOMMET M.** Vaccination against bovine brucellosis with a low dose of strain 19 administrated by the conjunctival route. IV. Comparison between two methods of vaccination. *Ann. Rech. Vét.*, 1979, **10**, 131-139.

**FERGUSON N. M., DONNELLY C. A., WOOLHOUSE M. E. I., ANDERSON R. M.** The Epidemiology of BSE in cattle herds in Great Britain. II. Model construction and analysis of transmission dynamics. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 1997, **352**, 803-838.

**FERROUILLET C., FECTEAU G., LANEVSCHI A.** Prélèvement et analyse du liquide céphalo-rachidien chez les bovins. *Point vét.*, 1998, **194**, 15-20.

**FERROUILLET C., FECTEAU G., HIGGINS R., LANEVSCHI A.** Analyse du liquide céphalo-rachidien pour le diagnostic des atteintes du système nerveux des bovins. *Point vét.*, 1998, **194**, 21-26.

**FIRESTONE D.** Etiology of chick edema disease. *Env. Health Perspect.*, 1973, **5**, 59-66.

**FLESCH-JANYS D., BECHER H., GUNN P., JUNG D., KONIETZKO J., MANZ A., PAPKE O.** Elimination of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in occupationally exposed persons. *J. Toxicol. Environ. Health*, 1996, **47**, 363-378.

**FOCANT J.F., PIRARD C., DOUNY C., SCIPPO M.L., DE PAUW E., MAGHUIN-ROGISTER G.** Le point, trois ans après, sur la crise belge de la dioxine. Impact probable sur la santé de la population belge. *Ann. Méd. Vét.*, 2002, **146**, 321-327.

**FOLEY G.L., ZACHARY J.F.** Rabies-induced spongiform change and encephalitis in a heifer. *Vet. Pathol.*, 1995, **32**, 309-311.

**FOOD AGRICULTURAL ORGANIZATION AND WORLD HEALTH ORGANIZATION.** Expert Committee on brucellosis. Sixth report. *WHO Tech. Rep. Ser.*, 1986, **740**, 145 pp.

- FOSTER J.D., PARNHAM D., CHONG A., GOLDMANN W., HUNTER N.** Clinical signs, histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats. *Vet. Rec.*, 2001, **148**, 165-171.
- FOUGEREAU M., BAZIN H.** Immunoglobulines, p. 81-104. *In*: Pastoret, P-P., Govaert, A., Bazin, H. (Eds), *Immunologie animale*, Medecine-Sciences Flammarion, Paris, 1990.
- FOURICHON C., BEAUDEAU F., BAREILLE N., SEEGER S.H.** Incidence of health disorders in dairy farming systems in western France. *Livest. Prod. Sci.*, 2001, **68**, 157-170.
- FRASER C.M., BERGERON J.A., MAYS A., AIELLO S.E.** (édit.). Système nerveux. *In* Manuel vétérinaire Merck, 1<sup>e</sup> éd. Éditions d'Après, Paris, 1996, 486-541.
- GARATTINI S.** TCDD poisoning at Seveso. *Biomedicine*, 1997, **26 (1)**, 28-29.
- GARDNER I.A., STRYHN H., IND P., COLLINS M.T.** Conditional dependence between tests affects the diagnosis and surveillance of animal diseases. *Prev. Vet. Med.*, 2000, **45**, 107-122.
- GARIN-BASTUJI B.** Le dépistage de la brucellose des ruminants et ses difficultés. Le cas des sérologies atypiques en brucellose bovine. *Le Point Vétérinaire*, 1993, **25 (152)**, 23-32.
- GARIN-BASTUJI B., TRAP D., GAUMONT R.** Assessment of the EDTA seroagglutination test for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. Rec.*, 1985, **117**, 444-445.
- GARIN-BASTUJI B., HARS J., CALVEZ D., THIEBAUD M., ARTOIS M.** Brucellose du porc domestique et du sanglier sauvage due à *Brucella suis* biovar 2 en France. *Congrès Mondial Vétérinaire*, Lyon, sept. 1999.
- GARIN-BASTUJI B., POUILLOT R., CAU C., POURQUIER P., SCHALCH L., VERY P.** Evaluation of two commercially available iELISA kits for the diagnosis of bovine brucellosis on pools of 10 sera. Comparison with the RB, CF and iELISA performed on individual sera. X International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology. Salsomaggiore, Parma, Italy, 4-7 July 2001.
- GEORGE L.W.** Localization and differentiation of neurologic diseases. *In* Large animal internal medicine, 2<sup>e</sup> éd. Mosby-Year Book, Saint-Louis, 1996, 142-170.
- GEORGE L.W.** Diseases of the nervous system. *In* Large animal internal medicine, 2<sup>e</sup> éd. Mosby-Year Book, Saint-Louis, 1996, 1001-1176.
- GERBIER G., GARIN-BASTUJI B., POUILLOT R., VERY P., CAU C., BERR V., DUFOUR B., MOUTOU F.** False-positive serological reactions in bovine brucellosis: evidence of the role of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 in a field trial. *Vet. Res.*, 1997, **28**, 375-383.
- GERWECK G.** Ein Beitrag zur Krankheitsstatistik in der Rinderpraxis. *Tierärztl. Umsch.*, 1993, **48**, 95-97.

- GIANOTTI F.** Chloracne due to tetrachloro-2,3,7,8-dibenzo-p-dioxin in children. *Ann. Dermatol. Venereol.*, 1977, **104**, 825-829.
- GIBBENS J.C., SHARPE C.E., WILESMITH J.W., MANSLEY L.M., MICHALOPOULOU E., RYAN J.B.M., HUDSON M.** Descriptive epidemiology of the 2001 foot-and-mouth disease epidemic in Great Britain: the first five months. *Vet. Rec.*, 2001, **149**, 729-743.
- GODFROID J., MICHEL P., UYTTERHAEGEN L., DE SMEDT C., RASSENEUR F., BOELAERT F., SAEGERMAN C., PATIGNY X.** Brucellose enzootique à *Brucella suis* biotype 2 chez le sanglier (*Sus scrofa*) en Belgique. *Ann. Méd. Vét.*, 1994, **138**, 263-268.
- GODFROID J., BOELAERT F., SAEGERMAN C., DUFÉY J., WEYNANTS V., LETESSON J.J.** Vie et mort de la vaccination antibrucellique des bovins dans les pays de l'Union européenne (...en attendant les vaccins du futur ?...). *In* : La vaccination en buiâtrie, Société Française de Buiâtrie (ed.), Paris, France, 1995, pp. 185-198.
- GODFROID J., SAEGERMAN C., WELLEMANS V., WALRAVENS K., LETESSON J.-J., TIBOR A., MACMILLAN A., SPENCER S., SANAA M., BAKKER D., POUILLOT R., GARIN-BASTUJI B.** How to substantiate the freedom of bovine brucellosis when aspecific serological reactions emerge in brucellosis tests ? *Vet. Microbiol.*, 2002, **90**, 461-477.
- GODFROID J., AL-MARIRI A., WALRAVENS K., LETESSON J.J.** Brucellose bovine. *In* : Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. Europe et régions chaudes. Lefèvre P.C., Blancou J., Chermette R. (ed). Editions Médicales Internationales, Paris, France, 2003, pp. 869-889.
- GOFF J.P., HORST R.L.** Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.*, 1997, **80**, 1260-1268.
- GONZALEZ F.J., FERNANDEZ-SALGUERO P.** The aryl hydrocarbon receptor: studies using AHR-null mice. *Drug Metab. Dispos.*, 1998, **26**, 1194-1198.
- GOUELLO L.** Analyse épidémiologique du premier cas d'encéphalopathie spongiforme bovine en France. *Epidémiol. et santé anim.*, 1991, **19**, 63-70.
- GOURREAU J.-M.** Le botulisme. *In* Maladies des bovins (Institut de l'élevage, dir.). France Agricole, Paris, 2000, 80-81.
- GOURREAU J.-M.** Les affections néoplasiques. *In* Maladies des bovins (Institut de l'élevage, dir.). France Agricole, Paris, 2000, 396-401.
- GRASSI J., COMOY E., SIMON S., CREMINON C., FROBERT Y., TRAPMAN S., SCHIMMEL H., HAWKINS S.A., MOYNAGH J., DESLYS J.P., WELLS G.A.** Rapid test for the preclinical postmortem diagnosis of BSE in central nervous system tissue. *Vet. Rec.*, 2001, **149**, 577-582.

**GREGOIRE D.** Le role de la gestion de la communication dans l'assistance aux services veterinaries. 69<sup>ème</sup> Session générale du Comité international de l'Organisation mondiale de la santé animale, 27 mai – 1<sup>er</sup> juin 2001, Paris, document 69 SG/10, 12 p.

**GREINER M., PHEIFFER D., SMITH R.D.** Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev. Vet. Med.*, 2000, **45(1-2)**, 23-41.

**GRENIER B.** Analyse et stratégie de la décision dans la pratique médicale. Edition Masson, Paris, France, 1989, 246 p.

**GRENIER B.** Utilisation des ODDS dans les tests associés ou séquentiels, p. 102-106. *In* Décision médicale. Analyse et stratégie de la décision dans la pratique médicale. Edition Masson, Paris, France, 1990.

**GRIFFIN J.M., COLLINS J.D., NOLAN J.P., WEAVERS E.D.** Bovine spongiform encephalopathy in the Republic of Ireland : epidemiological observations 1989-1996. *Irish. Vet. J.*, 1997, **50**, 593-600.

**GUO X., LONGNECKER M.P., MICHALEK J.E.** Relation of serum tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin concentration to diet among veterans in the Air Force Health Study with background-level exposure. *J. Toxicol. Environ. Health*, 2001, **63**, 159-172.

**HADLOW W.J., KENNEDY R.C., RACE R.E.** Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *J. Infect. Dis.*, 1982, **146**, 657-664.

**HAFFAR Z.** L'écornage des bovins. *In* Maladies des bovins (Institut de l'élevage, dir.). France Agricole, Paris, 2000, 480-481.

**HAGIWARA K., NAKAYA T., NAKAMURA Y., ASHI S., TAKAHASHI H., ISHIBAR C., IKUTA K.** Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells obtained from healthy dairy cattle. *Med. Microbiol. Immunol.*, 1996, **185**, 145-151.

**HALL S.M., CONFER A.W., PATTERSON J.M.** *Brucella abortus*-specific immunoglobulin isotypes in serum and vaginal mucus from cattle vaccinated with strain 19 and challenge exposed with virulent strain 2308. *A. J. Vet. Res.*, 1988, **49(6)**, 840-846.

**HARPER P.A., WALKER K.H., HEALY P.J., HARTLEY W.J., GIBSON A.J., SMITH J.S.** Neurovisceral ceroid-lipofuscinosis in blind Devon cattle. *Acta neuropathol. (Berl.)*, 1988, **75**, 632-636.

**HARRIS J.R., ROSE L.J.** Toxicity of polychlorinated biphenyls in poultry. *Am. Vet. Med. Assoc.*, 1972, **161**, 1584-1586.

**HARS J. ALBINA E., ARTOIS M., BOIREAU P., CRUCIERE C., GARIN-BASTUJI B., GAUTHIER D., HATHIER C., LAMARQUE F., MESPLEDE A., ROSSI S.** Epidémosurveillance



des maladies du sanglier transmissibles aux animaux domestiques. *Epidémiol. et santé anim.*, 2000, **37**, 31-43.

**HEADRICK M.L., HOLLINGER K., LOVELL R.A., MATHESON J.C.** PBBs, PCBs and dioxins in food animals, their public health implications. *Vet. Clin. North Am.*, 1999, **15**, 109-131.

**HEIM D., FATZER R., HORNLIMANN B., VANDEVELDE M.** Häufigkeit neurologischer Erkrankungen beim Rind. *Schweizer Arch. Tierheilkd.*, 1997, **139**, 354-362.

**HEIM D., KIHM U.** Bovine spongiform encephalopathy in Switzerland – the past and the present. In *Gestion des urgences zoosanitaires* (G. Murray & P.M. Thornber, édit.). *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 1999, **18(1)**, 135-144.

**HEIM D., DETWILER L., WILLIAMS E., KIHM U.** Mise à jour sur l'encéphalopathie spongiforme bovine, la tremblante du mouton et la cachexie chronique. In 69<sup>ème</sup> Session générale du Comité international de l'Office international des épizooties, 27 mai – 1 juin 2001, Paris. Document 69/SG/12/CS3 C, Office international des Epizooties, Paris, pp. 16.

**HEIM D., KREYSA J.** Risk assessment as an indicator for the distribution of BSE in the world. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, 2002, **144**, 710-715.

**HENDRIKX P., DUFOUR B., TULASNE J.J., KONDOLAS G.** Analyse qualitative du risque d'épizootie de peste bovine en République Centrafricaine à partir du Tchad et du Soudan. *Epidémiol. et santé anim.*, 2001, **40**, 83-94.

**HENRIKSEN G.L., KETCHUM N.S., MICHALEK J.E., SWABY J.A.** Serum dioxin and diabetes mellitus in veterans of operation ranch hand. *Epidemiology*, 1997, **8**, 252-258.

**HERDT T.H.** Ruminant adaptation to negative energy balance, influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)*, 2000, **16**, 215-230.

**HERMANS C., BROECKAERT F., BERANRD A.** PCBs et dioxines : l'accident belge. *Ann. Méd. Milit. Belg.*, 1999, **3-4**, 189-194.

**HERR S., MARSHALL C.** Brucellosis in free-living African buffalo (*Syncerus caffer*): a serological survey. *Ond. J. Vet. Res.*, 1981, **48**, 133-134.

**HILBINK F., FENWICK S. G., THOMPSON E. J., KITTELBERGER R., PENROSE M., ROSS G. P.** Non-specific seroreactions against *Brucella abortus* in ruminants in New-Zealand and the presence of *Yersinia enterocolitica* O:9. *New Zealand Veterinary Journal*, 1995, **43**, 175-178.

**HILL A. F., DESBRUSLAIS M., JOINER S., SIDLE K. C. L., GOWLAND J., COLLINGE L., DOEY L. J., LANTOS P.** The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, 1997, **389**, 448-450.

**HILL A.F., COLLINGE J.** Subclinical prion infection in humans and animals. *Br. Med. Bull.*, 2003, **66**, 161-170.

**HILL F.** Neurological diseases of cattle where BSE has been included in the differential diagnosis. *Surveillance*, 1994, **21**, 25.

**HILMERT H., DIRINGER H.** A rapid and efficient method to enrich SAF-protein from scrapie brains of hamsters. *Biosci.Rep.*, 1984, **4**, 165-170.

**HIRSBRUNNER G., NICOLET J., TONTIS A., MARTIG J.** Cerebral listeriosis in cattle: literature review and retrospective analysis of individual cases. *Tierärztl. Praxis*, 1997, **25**, 336-343.

**HOAG H.** BSE case rattles Canadian officials. *Nature*, 2003, **423**, 467.

**HOINVILLE L.J., WILESMITH J.W., RICHARDS M.S.** An investigation of risk factors for cases of bovine spongiform encephalopathy after the introduction of the feed ban. *Vet. Rec.*, 1995, **136**, 312-318.

**HOORENS J., OYAERT W.** Scrapie bij het schaap. *Vlaams Diergeneeskd. Tijdschr.*, 1966, **35**, 313-317.

**HORNER R.F.** Suspected ammonium nitrate fertiliser poisoning in cattle. *Vet. Rec.*, 1982, **110**, 472-474.

**HORNITZKY M., SEARSON J.** The relationship between the isolation of *Brucella abortus* and serological status of infected, non-vaccinated cattle. *Aust. Vet. J.*, 1986, **63**, 172-174.

**HÖRNLIMANN B., BRAUN U.** Bovine spongiform encephalopathy (BSE): clinical signs in Swiss BSE cases, p. 289-299. In R. Bradley and B. Marchant (ed.), *Transmissible Spongiform Encephalopathy. Proceedings of a Consultation on BSE with the Scientific Veterinary Committee of the Commission of the European Communities*, Brussels, 1993.

**HORNLMANN B., GUIDON D., GRIOT C.** Risikoeinschätzung für die Einschleppung von BSE. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 1994, **101**, 295-298.

**HORZINEK M., KELDERSMANS L., STUURMAN T., BLACK J., HERREWEGH A., SILLEKENS P., KOOLEN M.** Bovine immunodeficiency virus: immunochemical characterization and serological survey. *J. Gen. Virol.*, 1991, **72**, 2923-2928.

**HOUTAIN J.-Y., SAEGERMAN C.** Radiographie du diagnostic des avortements bovins référés à l'ARSIA durant l'année 2003. *Veterinaria*, 2004.

**HUBALEK Z., TREML F., JURICOVA Z., HUNADY M., HALOUZKA J., JANIK V., BILL D.** Serological survey of the wild boar (*Sus scrofa*) for tularaemia and brucellosis in South Moravia, Czech Republic. *Vet. Med. Czech*, 2002, **47**, 60-66.

**HUWE J.K., DAVISON K., FEIL V., LARSEN G., LORENTZSEN M., ZAYLSKIE R., TIERNAN T.O.** Levels of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in cattle raised at agricultural research facilities across the USA and the influence of pentachlorophenol-treated wood. *Food Addit. Contam.*, 2004, **21 (2)**, 182-194.

**ILL A.F., JOINER S., LINEHAN J., DESBRUSLAIS M., LANTOS P.L., COLLINGE J.** Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, **97**, 10248-10253.

**IRONSIDE J.M., HEAD M.W.** Neuropathology and molecular biology of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2000, **284**, 133-159.

**JEFFREY M., WILESMITH J. W.** Idiopathic brainstem neuronal chromatolysis and hippocampal sclerosis: a novel encephalopathy in clinically suspect cases of bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.*, 1992, **131**, 359-362.

**JEFFREY M., SIMMONS M.M., WELLS G.A.H.** Observations on the differential diagnosis of bovine spongiform encephalopathy in Great Britain, 1993, p. 342-362. *In* R. Bradley and B. Marchant (ed.), Transmissible spongiform encephalopathy. Proceedings of a Consultation on BSE with the Scientific Committee of the European Communities, Brussels, Belgium.

**JEFFREY M., SIMMONS M.M., WELLS G.A.H.** Observations on the differential diagnosis of bovine spongiform encephalopathy in Britain. *In* Transmissible spongiform encephalopathies. Proceedings of a consultation on BSE with the Scientific Veterinary Committee of the Commission of the European Communities, 14-15 septembre 1993 (R. Bradley & B. Marchant, édit.). Commission européenne, Bruxelles, 1994, 347-358.

**JENSEN D.J., HUMMEL R.A., MAHLE N.H., KOCHER C.W., HIGGINS H.S.** A residue study on beef cattle consuming 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *J. Agric. Food Chem.*, 1981, **29**, 265-268.

**JENSEN D.J., HUMMEL R.A.** Secretion of TCDD in milk and cream following the feeding of TCDD to lactating dairy cows. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1982, **29**, 440-446.

**JOHNSON J.C., VAN EMON J.M.** Development and evaluation of a quantitative enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for polychlorinated biphenyls. Document EPA/600/SR-94/112. Environmental Protection Agency : Cincinnati, 1994, 5 p.

**JOHNSTONE A.C.** Hepatic encephalopathy and bovine spongiform encephalopathy. *Surveillance*, 1993, **20**, 28.

**JONES L.M., DIAZ R., TAYLOR A.G.** Characterization of allergens prepared from smooth and rough strains of *Brucella melitensis*. *Br. J. Exp. Pathol.*, 1973, **54**, 492-508.

**JONES R.D., KELLY L., ENGLAND T., MACMILLAN A., WOOLDRIGDE M.** A quantitative risk assessment for the importation of brucellosis-infected breeding cattle into Great-Britain from selected European countries. *Prev. Vet. Med.*, 2004, **63**, 51-61.

**JUBB K.V.F., KENNEDY P.C., PALMER N.** Pathology of domestic animals. 4th Ed. San Diego, California Academic Press, Inc., 1993.

**KANIGA K., SORY M-P., DELOR I., SAEGERMAN C., LIMET J.N., CORNELIS G.** Monitoring of *Yersinia enterocolitica* in murine and bovine feces on the basis of the chromosomally integrated luxAB marker gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, **58(3)**, 1024-1026.

**KAVLOCK R.J., DASTON G.P., DE ROSA C., FENNER-CRISP P., GRAY L.E., KAATTARI S., LUCIER G., LUSTER M., MAC M.J., MACZKA C., MILLER R., MOORE J., ROLLAND R., SCOTT G., SHEEHAN D.M., SINKS T., TILSON H.A.** Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the US EPA-sponsored workshop. *Environ. Health. Persp.*, 1996, **104**, 715-810.

**KERKHOFS P., BOTTON Y., THIANGE P., DEKEYZER P., LIMET J.N.** Diagnosis of bovine brucellosis by enzyme immunoassay of milk. *Vet. Microbiol.*, 1990, **24**, 73-80.

**KIMBERLIN R. H.** Bovine spongiform encephalopathy. *Rev. sci. techn. Off. Int. Epiz.*, 1992, **11**, 347-390.

**KIMBERLIN R.H.** Encéphalopathie spongiforme bovine. In Encéphalopathies spongiformes transmissibles des animaux (R. Bradley & D. Matthews, édit.). *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, 1992, **11(2)**, 391-439.

**KIMBERLIN R.H., WALCKER C.A.** Pathogenesis of mouse scrapie: evidence of neural spread of infection to the CNS. *J. Gen. Virol.*, 1980, **51**, 183-187.

**KIMURA K.M., HARITANI M., KUBO M., HAYASAKA S., IKEDA A.** Histopathological and immunohistochemical evaluation of the first case of BSE in Japan. *Vet. Rec.*, 2002, **151**, 328-330.

**KIRKWOOD J.K., CUNNINGHAM A.A.** Epidemiological observations on spongiform encephalopathies in captive wild animals in the British Isles. *Vet. Rec.*, 1994, **135**, 296-303.

**KITTELBERGER R., HILBINK F., HANSEN F., PENROSE M., de LISLE G. W., LETESSON J-J., GARIN-BASTUJI B., SEARSON J., FOSSATI C. A., CLOECKAERT A., SCHURIG G.** Serological crossreactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 0:9. Immunoblot analysis of the antibody response to *Brucella* protein antigens in bovine brucellosis. *Veterinary Microbiology*, 1995, **47**, 257-270.

**KITTELBERGER R., BUNDESEN P.G., CLOECKAERT A., GREISER-WILKE I., LETESSON J.-J.** Serological cross-reactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9: IV. Evaluation of the M- and C-epitope antibody response for the specific detection of *B. abortus* infections. *Vet. Microbiol.*, 1998, **60**, 45-57.

**KIUPEL H., WEHR J.** Zum Vorkommen der sporadischen bovinen Enzephalomyelitis (SBE) im Norden der DDR. *Wiss. Zeitschr. Humboldt Univ. Berlin, Math. nat. R.*, 1980, **29**, 57-59.

**KIVIRANTA H., VARTIAINEN T., VERTA M., TUOMISTO J.T., TUOMISTO J.** High fish-specific dioxin concentrations in Finland. *Lancet*, 2000, **355**, 1883-1885.

**KOHANAWA M., SHOYA S., YONEMURA T., NISHIMURA K., TSUSHIOY.** Poisoning due to an oil by – product of rice – bron similar to chick edema disease. II. Tetrachlorinated as toxic substance. *Nat. Inst. Anim. Health. Q. Tokyo*, 1969, **9**, 220-228.

**KOPCHA M.** Nutritional and metabolic diseases involving the nervous system. *Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)*, 1987, **3**, 119-135.

**KOVACIE H., KARLOVIE M.** Prevalence of brucellosis in hares in Croatia (in Croatian). *Vet. Stanica*, 1982, **1**, 29-32.

**KREUZER P.E., CSANADY G.A., BAUR C., KESSLER W., PAPKE O., GREIM H., FILSER J.G.** 2,3,7,8- Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and congeners in infants. A toxicokinetic model of human lifetime body burden by TCDD with special emphasis on its uptake by nutrition. *Arch. Toxicol.*, 1997, **71**, 383-400.

**KRONFELD D.S.** Les troubles métaboliques. In *Médecine et chirurgie des bovins*. Vigot Frères, Paris, 1974, 387-454. [Traduction de « Bovine medicine and surgery ».]

**LAMBERT G., DEYOE B.L., PAINTER G.M.** Postvaccinal persistence of *Brucella abortus* strain 19 in two bulls. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1964, **145**, 909.

**LASMEZAS C., ADAMS D.** Analyse du risque des maladies à prions chez les animaux. *Rev. sci. techn. Off. int. Epiz.*, 2003, **22(1)**, 14-16.

**LASMÉZAS C.I.** The transmissible spongiform encephalopathies. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2003, **22**, 23-36.

**LAVECCHIO F.A., PASHAYAN H.M., SINGER W.** Agent orange and birth defects. *N. Engl. J. Med.*, 1983, **308**, 719-720.

**LAWMAN M.J.P., BALL D.R., HOFFMANN E.M., DESJARDIN L.E., BOYLE M.D.P.** Production of *Brucella abortus*-specific protein a-reactive antibodies (IgG2) in infected and vaccinated cattle. *Vet. Microbiol.*, 1986, **12**, 43-53.

**LE BARS J., LE BARS P.** Recent acute and subacute mycotoxicoses recognized in France. *Vet. Res.*, 1996, **27**, 383-394.

**LECLERCQ A.** Validation des méthodes d'analyses microbiologiques des aliments. In : Proceedings of the sixth conference in food microbiology, 21 & 22 June 2001, Liege University, Faculty of the Veterinary Medicine, 2001, 86-111.

**LEGNAME G., BASKALOV I.V., NGUYEN H.O., RIESNER D., COHEN F.E., DEARMOND S.J., PRUSINER S.B.** Synthetic mammalian prions. *Science*, 2004, **305**, 673-676.

**LEIPOLD H.W., DENNIS S.M.** Congenital defects of the bovine central nervous system. *Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)*, 1987, **3**, 159-177.

**LETESSON J.-J.** La réponse immunitaire : une partition en quête de sens. *Ann. Méd. Vét.*, 1996, **140**, 273-278.

**LETESSON J.-J., LOSTRIE-TRUSSART N., DEPELCHIN A.** Production d'anticorps monoclonaux spécifiques d'isotypes d'immunoglobulines bovines. *Ann. Méd. Vét.*, 1985, **129**, 131-141.

**LETESSON J.J., TIBOR A., VAN EYNDE G., WANSARD V., WEYNANTS V., DENOEL P., SAMAN E.** Humoral immune responses of *Brucella*-infected cattle, sheep, and goats to eight purified recombinant *Brucella* proteins in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1997, **4**, 556-564.

**LEUPOLD U., MARTIG J., VANDEVELDE M.** Diagnostic aspects of neurological diseases of cattle. A retrospective study. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, 1989, **131**, 327-340.

**LEVIEUX D.** Immunoglobulines bovines et brucellose. 2. Activité des IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> et IgM du sérum dans les réactions d'agglutination, de Coombs, de fixation du complément et dans le test au Rose Bengale. *Ann. Rech. Vét.*, 1974, **5**, 343-353.

**LEVIEUX D.** Immunoglobulines et transmission de l'immunité passive chez les ruminants, p. 596-599. In: Pastoret, P-P., Govaert, A., Bazin, H. (Eds), Immunologie animale, Médecine-Sciences Flammarion, Paris, 1990.

**LIEGEOIS F.** Traité de pathologie médicale des animaux domestiques. Duculot, Gembloux, 1933, 725 p.

**LIEUTARD J.P., GROSS A., DORMAND J., KÖHLER S.** Interactions between professional phagocytes and *Brucella* spp. *Microbiologica*, 1996, **12**, 197-206.

**LIMET J.N., KERKHOFS P., WIJFFELS R., DEKEYSER P.** Le diagnostic sérologique de la brucellose bovine par ELISA. *Ann. Méd. Vét.*, 1988, **132**, 565-575.

**LIVE I., STUBBS E.L.** Intracutaneous brucellosis tests in cattle. *Am. J. Ve.; Res.*, 1947, **8**, 380-385.

**LOPEZ T.A., CAMPERO C.M., CHAYER R., DE HOYOS M.** Ergotism and photosensitization in swine produced by the combined ingestion of *Claviceps purpurea sclerotia* and *Ammi majus* seeds. *J. vet. diagn. Invest.*, 1997, **9**, 68-71.

**LORBER M., CLEVERLY D., SCHAUM J., PHILLIPS L., SCHWEER G., LEIGHTON, T.** Development and validation of an air-to-beef food chain model for dioxin-like compounds. *Sci. Total Environ.*, 1994, 156, 39-65.

**LORD V.R., SCHURIG G.G., CHERWONOGRODZKY J.W., MARCANO M.J., MELENDEZ G.E.** Field study of vaccination of cattle with *Brucella abortus* strains RB51 and 19 under high and low disease prevalence. *Am. J. Vet. Res.*, 1998, **59**, 1016-1020.

**LORGUE G., LECHENET J., RIVIERE A.** Précis de toxicologie clinique vétérinaire. Point Vétérinaire, Maisons-Alfort, 1987, 208 pp.

**LOSTRIE-TRUSSART N., LETESSON J.J., DEPELCHIN A.** Anticorps monoclonaux et tests fonctionnels pour l'étude du système immunitaire bovin. Monographie. Institut pour l'encouragement et la recherche scientifique dans l'industrie et l'agriculture (ed.), 1989, pp. 283.

**LUCAS A., GAYOT G.** Pathologie de la production du lait. III. Procédés actuels de dépistage de la tuberculose bovine. Edité par la Commission de pathologie de la production du lait, Alfort, France, 1967, 63 pages.

**LUDWIG H., BODE L.** Borna disease virus: new aspects on infection, disease, diagnosis and epidemiology. In Le point sur les zoonoses (P.-P. Pastoret, édit.). *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2000, **19(1)**, 259-288.

**M'FADYEAN J., STOCKMAN S.** Epizootic abortion. *J. Comp. Pathol.*, 1909, **27**, 237-246.

**MACLUSKY N.J., BROWN T.J., SCHANTZ S., SEO B.W., PETERSON R.E.** Hormonal interactions in the effects of halogenated aromatic hydrocarbons on the developing brain. *Toxicol. Ind. Health*, 1998, **14**, 185-208.

**MACMILLAN A.** Conventional serological tests. In Animal Brucellosis: Eds K. Nielsen, J.R. Duncan, Boca Raton, CRC Press, 1990, 153-197.

**MACMILLAN A.** Reactions sérologiques non spécifiques en brucellose bovine à Guernesey. In Proceedings : Acquis de la recherche sur les reactions serologiques non spécifiques en brucellose, Colloque national du 11 janvier 1995, CNEVA Maisons-Alfort, Paris, 1995, 25-26.

- MADSEN M., ANDERSON E.C.** Serologic survey of Zimbabwean wildlife for brucellosis. *J. Zoo and Wildl. Med.*, 1995, **26**, 240-245.
- MAGHIN-ROGISTER G., DELAUNOIS A., DE PAUW E., GUSTIN P.** La pollution de la chaîne alimentaire par la dioxine. *Ann. Méd. Vét.*, 1999, **143**, 379-392.
- MANN P.C.** Selected lesions of dioxin in laboratory rodents. *Toxicol. Pathol.*, 1997, **25**, 72-79.
- MANTECA C., DAUBE G., JAUNIAUX T., LIMBOURG B., KAECKENBEECK A., MAINIL J.G.** Étude de l'entérotoxémie bovine en Belgique. II. Épizootologie élémentaire et pathologie descriptive. *Ann. Méd. vét.*, 2000, **145**, 75-82.
- MARIYON I., GRILLO M.J., MONREAL D., GONZALEZ D., MARIN C., LOPEZ-GONI I., MAINAR-JAIME R., MORENO E., BLASCO J.M.** Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Vet. Res.*, 2004, **35**, 1-38.
- MARTENS H., SCHWEIGEL M.** Pathophysiology of grass tetany and other hypomagnesemias. *Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)*, 2000, **16**, 339-368.
- MARTIN S.W., MEEK A.H., WILLEBERG P.** Veterinary Epidemiology. Principles and Methods. Iowa State University Press, Ames, 1987, 343 pp.
- MASUDA Y.** In : Dioxins and health. Vol. 1. Arnold Schecter (ed.), Plenum Press : New-York, 1994, 633-659.
- MATSUMURA F.** On the significance of the role of cellular stress response reactions in the toxic actions of dioxin. *Biochem. Pharmacol.*, 2003, **66**, 527-540.
- MATTHEWS H.B., DEDRICK R.L.** Pharmacokinetics of PCBs. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1984, **24**, 85-103.
- MATTHIAS D.** Der Nachweis von latent infizierten Pferden, Schafen und Rindern und deren Bedeutung als Virusreservoir bei der Bornaschen Krankheit. *Arch. experim. Vet. Med.*, 1954, **8**, 506-511.
- MAYANI A., BAREL S., SOBACK S., ALMAGOR M.** Dioxin concentrations in women with endometriosis. *Hum. Reprod.*, 1997, **12**, 373-375.
- MAYHEW I.G.** Evaluation of the large animal neurologic patient. In Large animal neurology. A handbook for veterinary clinicians. Lea & Febiger, Philadelphie, Londres, 1989, 3-69.
- McCOY M.A., YOUNG P.B., EDGAR H.W., MCCARVILLE E.M., DAVISON G., FITZPATRICK D.A., KENNEDY D.G.** Biochemical changes induced by hypomagnesemia in lactating cows and ewes. *Vet. Rec.*, 2002, **150**, 176-181.



**McCULLAGH P., NELDER J.A.** Generalized linear models. Second edition, Chapman and Hall (ed), London, 1989.

**McDIARMID S.C.** A theoretical basis for the use of a skin test for brucellosis surveillance in extensively-managed cattle herds. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, 1987, **6**, 1029-1035.

**McDIARMID S.C.** Risk analysis and the importation of animals and animal products. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 1993, **12**, 1093-1107.

**McDIARMID S.C.** Bovine brucellosis eradication in New-Zealand. *Surveillance*, 1994, **21**, 18-21.

**McELROY M. C., WEAVERS E. D.** Clinical presentation of bovine spongiform encephalopathy in the Republic of Ireland. *Vet. Rec.*, 2001, **149**, 747-748.

**McGILL I. S., WELLS G. A. H.** Neuropathological findings in cattle with clinically suspect but histologically unconfirmed Bovine Spongiform Encephalopathy. *J. Comp. Path.*, 1993, **108**, 241-260.

**McGREGOR D.B., PARTENSKY C., WILBOURN J., RICE J.M.** An IARC evaluation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans as risk factors in human carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.*, 1998, **106**, 755-760.

**MEADOR V.P., DEYOE B.L.** Intracellular localization of *Brucella abortus* in bovine placenta. *Vet. Pathol.*, 1989, **26**, 513-515.

**MERVEILLE C., SAEGERMAN C., MOREAU F., DEGAND J.** La brucellose. *Probio-Revue*, 1988, **11 (3)**, 257-266.

**MEYER G., D'OFFAY J., THIRY E.** Les encéphalites à herpèsvirus bovins. *Point vét.*, 2000, **31**, 417-424.

**MICHALEK J.E., PIRKLE J.L., CAUDILL S.P., TRIPATHI R.C, PATTERSON D.G., NEEDHAM L.L.** Pharmacokinetics of TCDD in veterans of Operation Ranch Hand: 10-year follow-up. *J. Toxicol. Environ. Health*, 1996, **47**, 209-220.

**MICHALEK J.E., TRIPATHI R.C.** Pharmacokinetics of TCDD in veterans of Operation Ranch Hand: 15-year follow-up. *J. Toxicol. Environ. Health*, 1999, **57**, 369-378.

**MILLEMANN Y., REMY D., BRUGERE-PICOUX J.** La listériose des ruminants. 1 : Étiologie, pathogénie et épidémiologie. *Point. Vét.*, 2000, **31**, 313-316.

**MINISTRY OF AGRICULTURE.** Fisheries and Food. Pesticide Safety Directorate. UK methods for the estimation of dietary intakes of pesticide residues, London, United Kingdom, 1995, 1-20.

**MINISTRY OF PUBLIC HEALTH.** Consumers Protection and Environment. Annex 2 of the Royal Decree of 25 April 1990, Moniteur belge, Brussels, Belgium, July 18, 1990.

**MINISTRY OF SMALL ENTERPRISES, TRADE AND AGRICULTURE.** Rapport relatif aux normes PCBs dans les substances destinées à l'alimentation animale, Brussels, Belgium, 1999, 1-4.

**MONITEUR BELGE.** Royal Decree of 2 October 1996 concerning the application of supplementary taking in the milk and milk products sector, Moniteur belge, Brussels, Belgium, October 22, 1996.

**MOREAU F., SAEGERMAN C.** La pratique de la désinfection en élevage bovin. *Probio-Revue*, 1990, **13 (3)**, 257-273.

**MORGAN S.E., EDWARDS W.C.** Bovine bonkers: new terminology for an old problem. A review of toxicity problems associated with ammoniated feeds. *Vet. hum. Toxicol.*, 1986, **28**, 16-18.

**MORIGNAT E., DUCROT C., ROY P., BARON T., VINARD J.-L., BIACABE A.-G., MADEC J.-Y., BENCSIK A., DEBEER S., ELIAZSEWICZ M., CALAVAS D.** Targeted surveillance to assess the prevalence of BSE in high-risk populations in western France and the associated risk factors. *Vet. Rec.*, 2002, **151**, 73-77.

**MOUTOU F., DUFOUR B., IVANOV Y.** A qualitative assessment of the risk of introducing foot and mouth disease into Russia and Europe from Georgia, Armenia and Azerbaijan. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2001, **20**, 723-730.

**MOYNAGH J., SCHIMMEL H.** Tests for BSE evaluated. Bovine spongiform encephalopathy. *Nature*, 1999, **400**, 105.

**MSOLLA P., SEMUGURUKA W.D., KASUBU A.A., SHOO M.K.** Clinical observations on bovine parasitic otitis in Tanzania. *Trop. anim. Hlth Prod.*, 1993, **25**, 15-18.

**NAESSENS J., GODDEERIS B.** Immunoglobulines, p. 456-459. In: Pastoret, P.-P., Griebel, P., Bazin, H., Govaerts, A. (Eds), Handbook of vertebrate immunology, Academic Press, California, 1998.

**NAKANE P.K., KAWAI A.** Peroxydase-labelled antibody, a new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.*, 1974, **22**, 1084-1091.

**NICOLETTI P.** The epidemiology of bovine brucellosis. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*, 1980, **24**, 69-98.

**NIELSEN K.** Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet. Microbiol.*, 2002, **90**, 447-459.

**NIELSEN K.H., SAMAGH B.S., SPECKMANN G., STEMSHORN B.** The bovine immune response to *Brucella abortus*. II. Elimination of some sporadic serological reactions by chelation of divalent cations. *Can. J. Comp. Med.*, 1979, **43**, 420-425.

**NIELSEN K., SMITH P., GALL D., PEREZ B., COSMA C., MUELLER P., TROTTIER J., COTE G., BOAG L., BOSSE J.** Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in milk. *Vet. Microbiol.*, 1996, **52**, 165-173.

**OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES.** World Animal Health Organization. Guidelines for continuous surveillance and monitoring of bovine spongiform encephalopathy. Appendix VIIIb of the January 1997 meeting of the International Animal Health Code Commission, document 65 SG/12/CS 1.

**OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES.** World organization for animal health. Manual of standards for diagnostic test and vaccines. Edition 2000. Office international des Epizooties : Paris, 2000, 957 p.

**OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES.** World Animal Health Organization. International Animal Health Code, 10th edition, Appendix 3.8.4. Surveillance and monitoring systems for bovine spongiform encephalopathy [Online, June 2003.] [http://www.oie.int/eng/normes/mcode/A\\_00157.html](http://www.oie.int/eng/normes/mcode/A_00157.html).

**OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES.** Organisation Mondiale de la Santé Animale. Handbook on import risk analysis for animals and animal products. Volume 1. Introduction and quantitative risk analysis. 2004a, 59 pages.

**OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES.** Organisation Mondiale de la Santé Animale. Handbook on import risk analysis for animals and animal products. Volume 2. Quantitative risk assessment. 2004b, 126 pages.

**OKAMOTO M., FURUOKA H., HAGIWARA K., KAMITANI W., KIRISAWA R., IKUTA K., TANIYAMA H.** Borna disease in a heifer in Japan. *Vet. Rec.*, 2002, **150**, 16-18.

**OKEY A.B., RIDDICK D.S., HARPER P.A.** The Ah receptor: mediator of the toxicology of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and related compounds. *Toxicol. Lett.*, 1994, **70**, 1-22.

**OLIVER J.E., LORENZ M.D., KORNEGAY J.N.** Handbook of veterinary neurology, 3<sup>e</sup> éd. W.B. Saunders, Philadelphie, 1997, 463 pp.

**OMER M.K., SKJERVE E., MACMILLAN A.P., WOLDEHIWET Z.** Comparison of three serological tests in the diagnosis of *Brucella* infection in unvaccinated cattle in Eritrea. *Prev. Vet. Med.*, 2001, **48**, 215-222.

**ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE.** Fifth report on the world health situation, 1969-1972. Genève, OMS, 1975 (Rapport officiel 225).

**ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE.** Comité mixte FAO/OMS d'experts de la brucellose. Sixième rapport (Série de rapports techniques 740), 1986, 145 p.

**ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE.** Rabies surveillance report. Center for Rabies Surveillance and Research. *Rabies Bull. Eur.*, 2001, **3**, 4-8.

**ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE.** Base de données sur les incidents chimiques intéressant la santé publique : rapport sur la première année de la phase pilote. *Relev. Epidemiol. Hebd.*, 2004, **7**, 72-76.

**ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE.** Regional Office for Europe. WHO air quality guidelines. 2<sup>nd</sup> Edition. [en ligne] (20/06/2002) Adresse URL : [http://www.euro.who.int/air/Activities/20020620\\_1](http://www.euro.who.int/air/Activities/20020620_1) consulté le 29/07/2004.

**ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE.** Bureau régional pour l'Europe. (2004). WHO air quality guidelines. Consultation du site internet en date du 30 juillet 2004 (<http://www.euro.who.int/air/activities/>).

**OSWEILER G.** Toxicology. Williams & Wilkins : Baltimore, 1996, 491 p.

**OTTOSEN H.E., PLUM N.** A nonantigenic allergic agent for intradermal brucellosis tests. *Am. J. Vet. Res.*, 1949, **10**, 5-11.

**OUEDRAGO M.** Epidémiologie de la brucellose bovine : modèle Bayésien de prédiction de la prévalence sur la base de tests combinés. Thèse n°102 de Master of Science en Santé Animale, Institut de Médecine Tropicale d'Antwerpen, 2001.

**OVERMEIRE I., CARBONNELLE S., VAN LOCO J., ROOS P., BROWN D., CHU M., CLARK G., GOEYENS L.** Validation of the CALUX bioassay : quantitative screening approach. *Organohalogen Compounds*, 2002, **58**, 353.

**OYSTER R., LEIPOLD H.W., TROYER D., CASH W., JOHNSON D.** Histochemical and morphometric studies of peripheral muscle in bovine progressive degenerative myeloencephalopathy of brown Swiss cattle. *Zentralbl. Veterinärmed. A*, 1992, **39**, 321-327.

**PALANDIN S., LANTING C.I., MULDER P.G., BOERSMA E.R., SAUER P.J., WEISGLAS-KUPERUS N.** Effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on cognitive abilities in Dutch children at 42 months of age. *J. Pediatr.*, 1999, **134**, 33-41.

**PAN K.M., BALDWIN M., NGUYEN J., GASSET M., SERBAN A., GROTH D., MEHLHORN I., HUANG Z., FLETTERICK R.J., COHEN F.E., PRUSINER S.B.** Conversion of  $\alpha$ -helices into  $\beta$ -

sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**, 10962-10966.

**PÄPKE O.** PCDD/PCDF : human background data for Germany, a 10-year experience. *Environ. Health Perspect.*, 1998, **106**, 723-731.

**PARLEMENT EUROPEEN ET CONSEIL.** Règlement (CE) n° 178/2002 du Parlement européen et du Conseil du 28 janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales et la législation, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires. *J. Off. Commun. Eur.*, 2002, **L31**, 1-24.

**PARRY H.B.** Scrapie disease in sheep. In Oppenheimer D.R. (ed.), Academic Press, London & New York, 1983, 31-51.

**PASTORET P.-P., BROCHIER B., VANDEPUTTE J., CHAPPUIS G., DESMETTRE P., LOMBARD M., LARDY C.** In Memoriam: Charles Mérieux. Une vie dans la continuité de Pasteur. *Ann. Méd. vét.*, 2001, **145**, 59.

**PASTORET P.P., GOUFFAUX M., SAEGERMAN C., ROELS S., DECHAMPS P., THIRY E., VANOPDENBOSCH E.** Le diagnostic immunologique rapide des encéphalopathies spongiformes transmissibles. *Ann. Méd. Vét.*, 2001, **145**, 164-173.

**PATTERSON J.M., DEYOE B.L., STONE S.S.** Identification of immunoglobulins associated with Complement Fixation, Agglutination, and Low pH Buffered Antigen Tests for Brucellosis. *Am. J. Vet. Res.*, 1976, **37**, 319-324.

**PATTISON J.** The emergence of bovine spongiform encephalopathy and related diseases. *Emerg. Inf. Dis.*, 1998, **4(3)**, 390-394.

**PAYNE S.M.** The pathogenesis of experimental brucellosis in the pregnant cow. *J. Pathol. Bacteriol.*, 1959, **78**, 447-463.

**PEDEN A.H., HEAD M.W., RITCHIE D.L., BELL J.E., IRONSIDE J.W.** Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet*, 2004, **264**, 527-529.

**PERDOK H.B., LENG R.A.** Hyperexcitability in cattle fed ammoniated roughages. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 1987, **17**, 121-143.

**PHILIPPON A., RENOUX G., PLOMMET M.** Brucellose bovine expérimentale. IV. Infection par *Brucella abortus* des veaux à la naissance. *Ann. Rech. Vét.*, 1971, **2**, 69-76.

**PIRKLE J.L., WOLFE X.H., PATTERSON D.G., NEEDHAM L.L., MICHALEK J.E., MINER J.C., PETERSON M.R.** Estimates of the half-life of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Vietnam Veterans of Operation. *J. Toxicol. Environ. Health*, 1989, **27**, 165-171.

**PLOMMET M.** Survie de *Brucella abortus* dans le lisier de bovins. Désinfection par le xylène. *Ann. Rech. Vét.*, 1972, **3 (4)**, 621-632.

**PLOMMET M.** Les dernières étapes de la prophylaxie de la brucellose bovine. *Bul. Soc. Vét. Prat. De France*, 1984, **68**, 507-520.

**PLOMMET M.** Progrès récents en immunisation contre l'infection à *Brucella abortus* ; immunisation chez les bovins. *Prev. Vet. Med.*, 1984, **2**, 205-214.

**PLOMMET M.** Brucellose bovine et vaccination en l'an 1993. *Bul. Soc. Vét. Prat. de France*, 1993, **77**, 123-135.

**PLOMMET M., FENSTERBANK R., RENOUX G., GESTIN J., PHILIPPON A.** Brucellose bovine expérimentale. *Ann. Rech. Vét.*, 1973, **4 (3)**, 419-435.

**PLOMMET M., FENSTERBANK R.** Vaccination against bovine brucellosis with a low dose of strain 19 administered by the conjunctival route. III. Serological response and immunity in the pregnant cow. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1976, **7**, 9-23.

**PLUMLEE K.H., GALEY F.D.** Neurotoxic mycotoxins: a review of fungal toxins that cause neurological disease in large animals. *J. Vet. internal Med.*, 1994, **8**, 49-54.

**POLACK B., SCHWARTZ I., BERTHELEMY M., BELLOC C., MANET G., VUILLAUME A., BARON T., GONDA M.A., LEVY D.** Serologic evidence for bovine immunodeficiency virus infection in France. *Vet. Microbiol.*, 1996, **48**, 165-173.

**POLLIN M. M., MCGILL I. S., WELLS G. A. H.** The differential neurohistological diagnoses of clinically suspect but unconfirmed BSE. *Neuropath. Appl. Neurobiol.*, 1992, **18**, 638.

**POUILLOT R., GARIN-BASTUJI B., GERBIER G., COCHE Y., CAU C., DUFOUR B., MOUTOU F.** The Brucellin skin test as a tool to discriminate false positive serological reactions in bovine brucellosis. *Veterinary Research*, 1997, **28**, 365-374.

**POUILLOT R., LESCOAT PH., GARIN-BASTUJI B., REPIQUET D., TERRIER P., GERBIER G., BENET J.J., SANAA M.** Risk factors for false-positive serological reactions for bovine brucellosis in Saône-et-Loire (France). *Prev. Vet. Med.*, 1998, **35**, 165-179.

**POUILLOT R.** Caractérisation d'une loi de distribution d'une variable entrant dans un modèle d'analyse de risque probabiliste. *Epidémiol. et santé anim.*, 2002, **41**, 113-143.

**POWER E.P., O'CONNOR M., DONNELLY W.J., DOLAN C.E.** Aujeszky's disease in a cow. *Vet. Rec.*, 1990, **126**, 226.

**PRANTER M.M., SOSALLA M.J.** Delayed organophosphate neurotoxicosis in four heifers. *J. Am. vet. med. Assoc.*, 1993, **203**, 1453-1455.

**PRINCE M.J., BAILEY J.A., BARROWMAN P.R., BISHOP K.J., CAMPBELL G.R., WOOD J.M.** Bovine spongiform encephalopathy. *Rev. sci. techn. Off. int. Epiz.*, 2003, **22(1)**, 37-60.

**PRUSINER S. B.** Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, **95**, 13363-13383.

**PRUSINER S.B.** Detecting mad cow disease. *Scientific American*, 2004, 60-67.

**PUSSEMIER L., MOHIMONT L., HUYGHEBAERT A., GOEYENS L.** Enhanced levels of dioxins in eggs from free range hens ; a fast evaluation approach. *Talanta*, 2004, **63**, 1273-1276.

**QURESHI T., TEMPELTON J.W., ADAMS L.G.** Intracellular survival of *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella dublin*, and *Salmonella typhimurium* in macrophages from cattle genetically resistant to *Brucella abortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1996, **50**, 55-65.

**RACE R., RAINES A., RAYMOND G.J., GAUCHEY B., CHESEBRO B.** Long-term sub-clinical carrier state precedes scrapie replication and adaptation in a resistant species : analogies to bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeld-Jakob disease in humans. *J. Virol.*, 2001, **75**, 10106-10112.

**RENWICK A.G., BARLOW S.M., HERTZ-PICCIOTTO, BOOBIS A.R., DYBING E., EDLER L., EISENBRAND G., GREIG J.B., KLEINER J., LAMBE J., MÜLLER D.J.G., SMITH M.R., TRITSCHER A., TUIJTELAARS S., VAN DEN BRANDT P.A., WALKER R., KROES R.** Risk characterization of chemicals in food and diet. *Food and Chemical Toxicology*, 2002, **41**, 1211-1271.

**RICE D.A., MCMURRAY C.H., DAVIDSON J.F.** Ketosis in dairy cows caused by low levels of lincomycin in concentrate feed. *Vet. Rec.*, 1983, **113**, 495.

**ROBAKIS N.K., DEVIGNE-GAGE E.A., JENKINS E.C., KASCSAK R.J., BROWN W.T., KRAWCZUN M.S., SILVERMAN W.P.** Localization of a human gene homologous to the PrP gene on the p arm of chromosome 20 and detection of PrP-related antigens in normal human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, **140**, 758-765.

**ROEDER R.A., GARBER M.J., SCHELLING G.T.** Assessment of dioxins in foods from animal origins. *J. Anim. Sci.*, 1998, **76**, 142-151.

**ROELS S., VANOPDENBOSCH E., LANGEVELD J.P., SCHREUDER B.E.** Immunohistochemical evaluation of tonsillar tissue for preclinical screening of scrapie based on surveillance in Belgium. *Vet. Rec.*, 1999, **145**, 524-525.

**ROELS S., CHARLIER G., LETELLIER G., LEYER G., SCHNYNTS F., KERKHOFS P., THIRY E., VANOPDENBOSCH E.** Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. *Vet. Rec.*, 2000, **146**, 586-588.

- ROONEY K.** Brucellosis investigation – Taranaki. *Surveillance*, 1993, **20(2)**, 15-18.
- ROSENBERGER G.** Système nerveux central. In Examen clinique des bovins. Point Vétérinaire, Maisons-Alfort, 1976, 460-469.
- ROTHEL J.S., JONES S.L., CORNER L.A., COX J.C., WOOD P.R.** The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Australian Veterinary Journal*, 1992, **69**, 1-4.
- RUSSO P., DUCROT C., BELLI P., FONTAINE J.-J., PEYROUSE C.** Tremblante ovine: bilan de six années d'épidémiosurveillance dans le Sud de la France (étude de 173 cas). *Point Vét.*, 1999, **28**, 667-670.
- SAEGERMAN C., PELZER P.** Les réactions sérologiques faussement positives dans la cadre du dépistage de la brucellose bovine dans la 18<sup>ème</sup> circonscription vétérinaire. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de diplômé en épidémiologie animale appliquée, Ecole Nationale Vétérinaire, Maisons-Alfort, France, 1992, 63 p.
- SAEGERMAN C., WEYNANTS V., VO T.K.-O., DE WAELE L., TIBOR A., DENOEL P.A., GODFROID J., MICHEL P., SAMAN E., LETESSON J.J., LIMET J.N.** Evaluation de l'activité protectrice de la fraction de la paroi de *Brucella* insoluble dans le SDS et identification d'antigènes de *Brucella* utilisables pour le diagnostic. In : Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales. Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext, Paris, France, 1994, pp. 221-233.
- SAEGERMAN C., THIANGE P., LIMBOURG B., CONOTTE G., PETIT N., THIRY G., BOTTON Y., PELZER P., MULLIER P., GODFROID J., DUFÉY J.** Etude épidémiologique descriptive et identification de facteurs de risque des réactions sérologiques faussement positives en brucellose bovine dans le sud de la province de Namur (Belgique). VIII Symposium International d'Epidémiologie et d'Economie Vétérinaire, Paris, 8-11 juillet, 1997. *Epidémiol. santé anim.*, 1997, **32**, 08.04.1-08.04.3.
- SAEGERMAN C., VO T. K-O., DE WAELE L., GILSON D., BASTIN A., DUBRAY G., FLANAGAN P., LIMET J.N., LETESSON J-J, GODFROID J.** Bovine brucellosis diagnosis by skin test : conditions for its use and evaluation of its performance. *Vet. Rec.*, 1999, **145**, 214-218.
- SAEGERMAN C., DECHAMPS P., VANOPDENBOSCH E., ROELS S., PETROFF K., DUFÉY J., VAN CAENEGHEM G., DEVREESE D., VAREWYCK H., DE CRAEMERE H., DESMEDT I., CORMANN A., TORCK G., HALLET L., HAMERIJCKX M., LEEMANS M., VANDERSANDEN A., PEHARPRE D., BROCHIER B., COSTY F., MULLER P., THIRY E.,**



**PASTORET P.-P.** Épidémiosurveillance de l'encéphalopathie spongiforme bovine en Belgique : bilan de l'année 1998. *Ann. Méd. Vét.*, 1999, **143**, 423-436.

**SAEGERMAN C., CLAES L., VANOPDENBOSCH E., BIRONT P., DELUYKER H., THIRY E.** Étude rétrospective de l'incidence des troubles neurologiques rapportés et suspects d'encéphalopathie spongiforme transmissible chez les bovins en Belgique. *Épidémiol. Santé anim.*, 1999, **35**, 31-42.

**SAEGERMAN C., BOELAERT F., VAN VLANDEREN I., LOMBA M., BERKVENS D., ERMENS A., BIRON P., BROECKAERT F., BERNARD A., DE COCK A., DEMONT S., DE POORTER G., TORFS B., ROBIJNS J.-M., MONFORT V., VERMEERSCH J.-P., LENGELE L.** Monitoring des animaux vivants : exemple d'un échantillonnage pour la détection des PCBs et des dioxines chez les bovins de boucherie en Belgique. *Epidémiol. santé anim.*, 2001, **38**, 39-49.

**SAEGERMAN C., DECHAMPS P., ROELS S., PETROFF K., GEEROMS R., TORCK G., DUFÉY J., FOUREZ R., HAMELRYCKX M., CORMANN A., VIATOUR P., DE CONINCK V., LOMBA F., VERMEERSCH J.-P., HALLET L., LHOST O., LEEMANS M., VANDERSANDEN A., PEHARPRE D., BROCHIER B., COSTY F., PASTORET P.-P., THIRY E., VANOPDENBOSCH E.** Epidémiosurveillance de l'encéphalopathie spongiforme bovine en Belgique : bilan de l'année 1999. *Ann. Méd. Vét.*, 2001, **145**, 47-58.

**SAEGERMAN C., CLAES L., DEWAELE A., DESMECHT D., ROLLIN F., HAMOIR J., GUSTIN P., CZAPLICKI G., BUGHIN J., WULLEPIT J., LAUREYNS J., ROELS S., BERKVENS D., VANOPDENBOSCH E., THIRY E.** Differential diagnosis of neurologically expressed disorders in Western European cattle. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2003, **22**, 83-102.

**SAEGERMAN C., SPEYBROECK N., ROELS S., VANOPDENBOSCH E., THIRY E., BERKVENS D.** Amélioration de la détection d'une maladie émergente : exemple de l'encéphalopathie spongiforme bovine. *Epidémiol. et santé anim.*, 2003, **44**, 61-77.

**SAEGERMAN C., SPEYBROECK N., ROELS S., VANOPDENBOSCH E., THIRY E., BERKVENS D.** Decision support tools for clinical diagnosis of disease in cows with suspected bovine spongiform encephalopathy. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, **42**, 172-178.

**SAFE S., WANG F., PORTER W., DUAN R., McDOUGAL A.** Ah receptor agonists as endocrine disruptors : antiestrogenic activity and mechanisms. *Toxicol. Lett.*, 1998, **102-103**, 343-347.

**SAMARTINO L., GALL D., GREGORET R., NIELSEN K.** Validation of enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. Microbiol.*, 1999, **70**, 193-200.

**SAMARTINO L.E., FORT M., GREGORET R., SCHURIG G.G.** Use of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in pregnant cows after calfhoo vaccination with strain 19 in Argentina. *Prev. Vet. Med.*, 2000, **45**, 193-199.

**SANAA M., POUILLOT R., TOMA B.** Appréciation quantitative des risques : exemple d'utilisation de la méthode de simulation d Mote-Carlos. *Epidémiol. et santé anim.*, 2002, **41**, 145-155.

**SANGARI F.J., AGÜERO J.** Identification of *Brucella abortus* B19 vaccine strain by the detection of DNA polymorphism at the ery locus. *Vaccine*, 1994, **16**, 1640-1645.

**SANGARI F.J., AGÜERO J.** Molecular basis of *Brucella* pathogenicity: an update. *Microbiologia*, 1996, **12**, 207-218.

**SARAVI M.A., WRIGHT P.F., GREGORET R.J., GALL D.E.** Comparative performance of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and conventional assays in the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1995, **47**, 93-99.

**SARRADET M.** Un cas de tremblante sur un bœuf. *Revue vétérinaire de Toulouse*, 1883, 310-312.

**SAVEY M.** Encéphalopathie spongiforme bovine, tremblante des ovins et des caprins. In : Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. Europe et régions chaudes. Tome 1. Généralités, Maladies virales. Lefèvre P.C., Blancou J., Chermette R. (ed.). Editions Lavoisier : Paris, 749-764.

**SAVEY M., BELLI P., COUDERT M.** L'encéphalopathie spongiforme bovine en Europe. Présent et avenir. *Vet. Res.*, 1993, **24**, 213-225.

**SCHALLER O., FATZER R., STACK M. & 9 OTHER AUTHORS.** Validation of a Western immunoblotting procedure for bovine PrP<sup>Sc</sup> detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Acta Neuropathol.*, 1999, **98**, 437-443.

**SCHECTER A., CRAMER P., BOGGESS K., STANLEY J., PÄPKE O., OLSON J., SILVER A., SCHMITZ M.** Intake of dioxins and related compounds from food in the U.S. population. *J. Toxicol. Environ. Health*, 2001, **63**, 1-18.

**SCHECTER A., DELLARCO M., PÄPKE O., OLSON J.** A comparison of dioxins, dibenzofurans and coplanar PCBs in uncooked and broiled ground beef, catfish and bacon. *Chemosphere*, 1998, **37**, 1723-1730.

**SCHEIBNER E.** Spezifitätsgrenzen de brucellose langsamagglutination. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 1976, **89**, 300-302.

**SCHELCHER F., FOUCRAS G., MEYER G., ANDREOLETTI O., VALARCHER J.-F.** Le coryza gangréneux chez les bovins. *Point vét.*, 2001, **215**, 30-35.

**SCHELCHER F., ANDREOLETTI O., CABANIE P., TABOURET G.** Démarche diagnostique dans les maladies nerveuses des bovins. *In* Actualités en buiatrie. Journées européennes, Société française de buiatrie (SFB), 28-30 novembre, Paris. SFB, Toulouse, 2001, 229-240.

**SCHILLHORN VAN VEEN T.W.** Parasitic disease of the bovine nervous system. *Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)*, 1987, **3**, 99-105.

**SCHLECH W.F.** Listeriosis epidemiology, virulence and the significance of contaminated foodstuffs. *J. Hosp. Infect.*, 1991, **19**, 211-224.

**SCHREUDER B.E., OSTERHAUS A.D.** Bovine spongiform encephalopathy (BSE), a review. *Tijdschr. Diergeneeskd.*, 1990, **115**, 507-517.

**SCHREUDER B.E.C., WILESMITH J.W., RYAN J.B.M., STRAUB O.C.** Risk of BSE from the import of cattle from the United Kingdom into countries of the European Union. *Vet. Rec.*, 1997, **141**, 187-190.

**SCHUKKEN H., CASELLA G., VAN DEN BROEK J.** Overdispersion in clinical mastitis data from dairy herds : a negative binomial approach. *Prev. Vet. Med.*, 1991, **10**, 239-245.

**SCIENTIFIC STEERING COMMITTEE.** European Commission. Final Opinion on the Geographical Risk of Bovine Spongiform Encephalopathy (GBR). Adopted on 6 July 2000, 60 pp.

**SCIENTIFIC STEERING COMMITTEE.** European Commission. Opinion on the Geographical BSE Risk for sheep and goats (GBR-S): adaptation of the cattle GBR methodology to small ruminants, in case of BSE in small ruminants would become probable or evident under field conditions. Adopted on 7-8 November 2002a, 20 pp.

**SCIENTIFIC STEERING COMMITTEE.** European Commission. Update of the Opinion on the Geographical Risk of Bovine Spongiform Encephalopathy (GBR). Adopted on 11 January 2002b, 10 pp.

**SCOBIE L., VENABLES C., SAYERS A.R., WEIGHTMAN S., JARRETT O.** Prevalence of bovine immunodeficiency virus infection in cattle in Great Britain. *Vet. Rec.*, 2001, **149**, 459-460.

**SCOTT A.C., DONE S.H., VENABLES C., DAWSON M.** Detection of scrapie-associated fibrils as an aid to the diagnosis of natural scrapie. *Vet. Rec.*, 1987, **120**, 280-281.

**SCOTT A. C., WELLS G. A. H., STACK M. J., WHITE H., DAWSON M.** Bovine spongiform encephalopathy: detection and quantification of fibrils, fibril protein (PrP) and vacuolation in brain. *Vet. Microbiol.*, 1990, **23**, 295-304.

**SCOTT M.R., WILL R., IRONSDIE J., NGUYEN H.-O.B., TREMBLAY P., DEARMOND S.J., PRUSINER S.B.** Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1999, **96**, 15137-15142.

**SHERMAN D.M.** The role of clinical examination in the accurate diagnosis of bovine neurologic disease. *Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)*, 1987, **3**, 1-12.

**SHERMAN D.M.** Localized diseases of the bovine brain and spinal cord. *Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)*, 1987, **3**, 179-191.

**SIGURDSON C.J., WILLIAMS E.S., MILLER M.W., SPRAKER T.R., O'ROURKE K.I., HOOVER E.A.** Oral transmission and early lymphoid tropism of chronic wasting disease PrPres in mule deer fawns (*Odocoileus hemionus*). *J. Gen. Virol.*, **80**, 2757-2764.

**SMITH R.D.** Decision analysis in the evaluation of diagnostic tests. *Journal of American veterinary medical association*, 1995, **203**, 1184-1192.

**SMITH R.D., SLENNING B.D.** Decision analysis: dealing with uncertainty in diagnostic testing. *Prev. Vet. Med.*, 2000, **45**, 139-162.

**SMITHS M.A., BOSSERS A., SCHREUDER B.E.C.** Prion protein and scrapie susceptibility. *Vet. Quart.*, 1997, **19**, 101-105.

**SMOLINSKI M.S., HANBURG M.A., LEDERBERG J.** Microbial threats to health: emergence, detection and response. National Academies Press, 2003, 398 pages.

**SNIDER T.G., HOYT P.G., JENNY B.F., COATS K.S., LUTHER D.G., STORTS R.W., BATTLES J.K., GONDA M.A.** Natural and experimental bovine immunodeficiency virus infection in cattle. *Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)*, 1997, **13**, 151-176.

**STACORP.** *Stata Statistical Software. Release 6.0.* College Station, TX : Stata Corporation, 1999.

**STACORP.** *Stata Statistical Software. Release 7.1.* College Station, TX: Stata Corporation, 2003.

**STACORP.** *Stata Statistical Software: Release 8.* College Station, TX: Stata Corporation, 2003.

**STACORP.** *Stata Statistical Software: Release 8.0.* College Station, TX : Stata Corporation, 2003.

**STEENLAND K., PIACITELLI L., DEDDENS J., FINGERHUT M., CHANG L.** Cancer, heart disease, and diabetes in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1999, **91**, 779-786.

**STEENLAND K., BERTAZZI P., BACCARELLI A., KOGEVINAS M.** Dioxin revisited : developments since the 1997 IARC classification of dioxin as a human carcinogen. *Environmental Health Perspectives*, 2004, **112**, 1265-1268.

**STEMSHORN B.W., FORBES L.B., EAGLESOME M.D., NIELSEN K.H., ROBERTSON F.J., SAMAGH B.S.** A comparison of standard serological tests for the diagnosis of bovine brucellosis in Canada. *Can. J. Comp. Med.*, 1985, **49**, 391-394.

**STÖBER M.** Symptomatologie différentielle de quelques affections du système nerveux des bovins. *Ann. Méd. vét.*, 1987, **131**, 401-410.

**STOWE C.M.** Central nervous system intoxications other than lead. *Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)*, 1997, **13**, 149-158.

**SUTRA L., CAFFIN J.P., DUBRAY G.** Role of milk immunoglobulins in the Brucella milk ring test. *Vet. Microbiol.*, 1986, **12**, 359-366.

**SWANSON L. W.** Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Research.*, 2000, **886**, 113-164.

**SZULOWSKI K., IWANIAK W., PILASZEK J., TRUSZECZYNSKI M., CHROBINSKA V.** The ELISA for the examination of hare sera for anti-Brucella antibodies. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 1999, **22**, 33-40.

**TENHUMBERG H., TRELA T., MATZKE P., AVERDUNK G., DIRKSEN G.** Bovine progressive degenerative myeloencephalopathy ('Weaver syndrome') in Brown Swiss × Braunvieh cattle: reproductive features and embryo transfer. *Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr.*, 1994, **107**, 400-404.

**TERRY L.A., MARSCH S., RYDER S.J., HAWKINS S.A.C., WELLS G.A.H., SPENCER Y.I.** Detection of disease-specific PrP in the distal ileum of cattle exposed orally to the agent of bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.*, 2003, **152**, 387-392.

**THIANGE P., SAEGERMAN C., BOTTON Y., LIMET J.N.** Brucellose bovine : le test d'agglutination en présence du facteur rhumatoïde après traitement du sérum par le dithiothréitol, dans la différenciation des animaux vaccinés et infectés. *Ann. Méd. Vét.*, 1992, **136**, 471-476.

**THIRY E.** Maladies virales des ruminants. Point Vétérinaire, Maisons-Alfort, 2000, 244 pp.

**THIRY E., SAEGERMAN C., XAMBEU L., PENDERS J.** Current status of transmissible spongiform encephalopathies in ruminants. *Base*, 2004, accepté.

**THWAITES G. E., CHAU T. T., STEPNIIEWSKA K., PHU N. H., CHUONG L. V., SINH D. X., WHITE N. J., PARRY C. M., FARRAR J. J.** Diagnosis of adult tuberculous meningitis by use of clinical and laboratory features. *Lancet*, 2002, **360**, 1287-1292.

**TOMA B.** Surveillance des événements rares en santé publique vétérinaire. *Epidémiol. et santé anim.*, 1998, **34**, 1-8.

**TOMA B.** Appréciation quantitative du risque : notions générales. *Epidémiol. et santé anim.*, 2002, **41**, 53-65.

**TOMA B., BENET J.J., DUFOUR B., ELOIT M., MOUTOU F., SANAA M.** Glossaire d'épidémiologie animale, Editions du Point Vétérinaire, Maisons-Alfort, France, 1991, 365 pages.

**TOMA B., DUFOUR B., SANAA M., BENET J.J., SHAW A., MOUTOU F., LOUZA A.** Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures. Edité par l'Association pour l'Etude de l'Epidémiologie des maladies Animales, Maisons-Alfort, 2001, 696 p.

**TOMA B., DUFOUR B., SANAA M.** Généralités sur l'analyse de risque. *Epidémiol. et santé anim.*, 2002, **41**, 5-17.

**TOMA B., THIRY E.** Qu'est-ce qu'une maladie émergente ? *Epidémiol. et santé anim.*, 2003, **44**, 1-11.

**TRAP D., GARIN B., MOUTOU F., GAUMONT R.** Brucellose bovine : élimination des séroagglutinations non spécifiques par l'emploi de l'EDTA et de l'agglutination à 56°C. *Revue Med. Vét.*, 1985, **130 (5)**, 399-409.

**TSUJI M., TERADA Y., ARAI S., OKADA H., ISHIHARA C.** Use of the Bo-RBC-SCID mouse model for isolation of a *Babesia* parasite from grazing calves in Japan. *Experim. Parasitol.*, 1995, **81**, 512-518.

**TUOMISTA J., VARTIAINEN T., TUOMISTO J.T.** Synopsis on dioxins and PCBs. Kuopio, Publication of the National Public Health Institute of Finland, 1999.

**TVEDTEN H.W.** Clinical pathology of bovine neurologic disease. *Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)*, 1987, **3**, 25-44.

**UNDERWOOD W.J.** Rumen lactic acidosis. Part II. Clinical signs, diagnosis, treatment and prevention. *Compend. cont. Educ. pract. Vet.*, 1992, **14**, 1265-1270.

**UZAL F.A., CARRASCO A.E., NIELSEN K., DE ECHAIDE S., CABRERA R.F.** An indirect ELISA using a monoclonal anti IgG<sub>1</sub> enzyme conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. Microbiol.*, 1996, **52**, 175-1980.

**VALDES J.J., CAMERON J.E., COLE R.J.** Aflatrem: a tremorgenic mycotoxin with acute neurotoxic effects. *Environ. Hlth Perspect.*, 1985, **62**, 459-463.

**VALLAT B.** Biosécurité et prévention des maladies. Editorial du Directeur général de l'Organisation Mondiale de la Santé disponible sur le site internet de l'Office international des Epizooties (<http://oie.int>), consultation du 1<sup>er</sup> septembre 2003.

**VALLET A.** Les autres maladies infectieuses provoquant des troubles nerveux. *In* Maladies des bovins (Institut de l'élevage, dir.). France Agricole, Paris, 2000, 84-85.

**VALLET A.** La myopathie dyspnée. *In* Maladies des bovins (Institut de l'élevage, dir.). France Agricole, Paris, 2000, 234-235.

**VALLET A.** La nécrose du cortex cérébral. *In* Maladies des bovins (Institut de l'élevage, dir.). France Agricole, Paris, 2000, 236-237.

**VAN CAUTEREN H., VANDENBERGHE J., HERIN V., VANPARYS P., MARSBOOM R.** Toxicological properties of closantel. *Drug. chem. Toxicol.*, 1985, **8**, 101-123.

**VAN DEN BERG M., BIRNBAUM L., BOSVELD A.T.C., BRUNSTROM B., COOK P., FEELEY M., GIESY J.P., HANBERG A., HASEGAWA R., KENNEDY S.W., KUBIAK T., LARSEN J.C., VAN LEEUWEN F.X., LIEM A.K., NOLT C., PETERSON R.E., POELLINGER L., SAFE S., SCHRENK D., TILLIT D., TYSKLIND M., YOUNES M., WAERN F., ZACHAREWSKI T.** Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect*, 1998, **106**, 775-792.

**VAN HECKE A.** *Agriculture Info 21*. Brussels, Agrinfo Edition, 2000.

**VAN LEEUWEN F.X.R., YOUNES M.M.** Consultation on assessment of the health risk of dioxins : re-evaluation of the tolerable daily intake (TDI). Executive summary. *Food Addit. Contamin.*, 2000, **17**, 223-240.

**VANCUTSEM P.M., BABISH J.G., SCHWARK W.S.** The fluoroquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. *Cornell Vet.*, 1990, **80**, 173-186.

**VANDEVELDE M., ZURBRIGGEN A., FATZER R.** Spongiform encephalopathies with special reference to bovine spongiform encephalopathy. *Schweizer. Med. Wochenschr.*, 1992, **122**, 887-892.

**VANOPDENBOSCH E., DECHAMPS P., SAEGERMAN C., DUFÉY J., ROELS S., MULLIER P., HALLET L., BROCHIER B., COSTY F., CHARLIER G., FOUREZ R., PASTORET P.-P.** Le premier cas d'encéphalopathie spongiforme bovine diagnostiqué en Belgique. *Ann. Méd. Vét.*, 1998, **142**, 111-118.

**VANOPDENBOSCH E., ROELS S., SAEGERMAN C.** Animal TSE epidemiosurveillance and diagnosis in Belgium and BSE risk assessment. In Proceedings of the First Scientific Day on Transmissible Spongiform Encephalopathies: Creutzfeldt-Jakob Disease and Bovine Spongiform Encephalopathy. 18<sup>th</sup> November 2000, Scientific Institute of Public Health, Brussels, Belgium, 29-30.

**VANZINI V.R., AGUIRRE N., LUGARESII C.I., DE ECHAIDE S.T., DE CANAVESIO V.G., GUGLIELMONE A.A., MARCHESINO M.D., NIELSEN K.** Evaluation of an indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle in Argentina. *Prev. Vet. Med.*, 1998, **36**, 211-217.

**VANZINI V.R., AGUIRRE N.P., VALENTINI B.S., TORIONI D., DE ECHAIDE S., LUGARESII C.I., MARCHESINO M.D., NIELSEN K.** Comparaison of an indirect ELISA with the Brucella milk ring test for detection of antibodies to *Brucella abortus* in bulk milk samples. *Vet. Microbiol.*, 2001, **82**, 55-60.

**VERGER J.M., GARIN-BASTUJI B., GRAYON M., MAHE A.M.** La brucellose bovine à *Brucella melitensis* en France. *Ann. Rech. Vét.*, 1989, **20**, 93-102.

**VICARI A., HORNLIMANN B., AUDIGE L.** Appréciation du risque de contamination des aliments concentrés suisses pour bovins par l'agent de l'encéphalopathie spongiforme bovine. *Epidémiol. et santé anim.*, 1996, **30**, 77-84.

**VLAAMSE MILIEUMAATSCHAPIJ.** Consultation du site internet en date du 22 septembre 2004 : <http://www.vmm.be>.

**VLAAMSE MILIEUMAATSCHAPIJ.** Neerslag dioxines en pcb's niet gedaald. Communiqué de presse du 27 juillet 2004.

**VOROS K., TANYI J., KARSAI F.** Clinical experiences with rabies in cattle in Hungary. *Dtsch. tierärztl. Wochenschr.*, 1999, **106**, 46-48.

**VRIJENS B., DE HENAUW S., DEWETTINCK K., TALLOEN W., GOEYENS L., DE BACKER G., WILLEMS J.L.** Probabilistic intake assessment and body burden estimation of dioxin-like substances in background conditions and during a short food contamination episode. *Food Addit. Contam.*, 2002, **19 (7)**, 687-700.

**WALDER R., KALVATCHEV Z., TOBIN G.J., BARRIOS M.N., GARZARO D.J., GONDA M.A.** Possible role of bovine immunodeficiency virus in bovine paraplegic syndrome: evidence from immunochemical, virological and seroprevalence studies. *Res. Virol.*, 1995, **146**, 313-323.



**WALSTRA P., JENNESS R.** Dairy Chemistry and Physics 1-77. New York: Wiley-Interscience Publication, 1984.

**WEBER L.W.D., GREIM H.** The toxicity of brominated and mixed-halogenated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans: an overview. *J. Toxicol. Environ. Health*, 1997, **50**, 195-215.

**WELLS G. A. H., HANCOCK R. D., COOLEY W. A., RICHARDS M. S., HIGGINS R. J., DAVID G. P.** Bovine spongiform encephalopathy: diagnostic significance of vacuolar changes in selected nuclei of the medulla oblongata. *Vet. Rec.*, 1989, **125**, 521-524.

**WELLS G. A. H., SAYERS A. R., WILESMITH J. W.** Clinical and epidemiological correlates of the neurohistology of cases of histologically unconfirmed, clinically suspect bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.*, 1995, **136**, 211-216.

**WELLS G. A. H., SCOTT A. C., JOHNSON C. T., GUNNING R. F., HANCOCK R. D., JEFFREY M., DAWSON M., BRADLEY R.** A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.*, 1987, **121**, 419-420.

**WELLS G.A.** Pathogenesis of BSE. *Vet. Res. Commun.*, 2003, **1**, 25-28.

**WELLS G.A.H., SCOTT A.C., JOHNSON C.T., GUNNING R.H., HANCOCK R.D., JEFFREY M., DAWSON M., BRADLEY R.** A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.*, 1987, **121**, 419-420.

**WELLS G.A.H., HANCOCK R.D., COOLEY W.A., RICHARDS M.S., HIGGINS R.J., DAVID G.P.** Bovine spongiform encephalopathy : diagnostic significance of vacuolar changes in selected nuclei of the medulla oblongata. *Vet. Rec.*, 1989, **125**, 521-524.

**WELLS G.A.H., SAYERS A.R., WILESMITH J.W.** Clinical and epidemiological correlates of the neurohistology of cases of histologically unconfirmed, clinically suspect bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.*, 1995, **136**, 211-216.

**WELLS G.A.H., HAWKINS S.A.C., GREEN R.B., AUSTIN A.R., DEXTER I., SPENCER Y.I., CHAPLIN M.J., STACK M.J., DAWSON M.** Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE) : an update. *Vet. Rec.*, 1998, **142**, 103-106.

**WEYNANTS V., DUFÉY J., SAEGERMAN C., DENOEL P., TIBOR A., LIMET J., LETESSON J.J.** Développement d'un test cellulaire *in vitro* permettant le diagnostic spécifique de la brucellose sur base de la production d'Interféron gamma. In Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales. Ed. AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext, Paris, 1994, pp. 147-158.

**WEYNANTS V., SAEGERMAN C., DENOEL P.A., TIBOR A., LIMET J.N., LETESSON J.-J.** Différenciation de la réponse sérologique induite par *Brucella* et *Yersinia O:9* en utilisant les *Yersinia* outer proteins (YOPs). In : AUPELF-UREF, ed. *Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales*. Paris : John Libbey Eurotext, 1994, 113-124.

**WEYNANTS V., GODFROID J., LIMBOURG B., SAEGERMAN C., LETESSON J.J.** Specific brucellosis based on *in vitro* antigen-specific gamma interferon production. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, **33**, 706-712.

**WEYNANTS V., TIBOR A., DENOEL P.A., SAEGERMAN C., GODFROID J., THIANGE P., LETESSON J.-J.** Infection of cattle with *Yersinia enterocolitica O:9* a cause of the false positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic tests, *Vet. Microbiol.*, 1996, **48**, 101-112.

**WEYNANTS V., GILSON D., CLOECKAERT A., DENOEL P., TIBOR A., THIANGE P., LIMET J.N., LETESSON J.J.** Characterization of a monoclonal antibody specific for *Brucella* smooth lipopolysaccharide and development of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay to improve the serological diagnosis of brucellosis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 1996, **3**, 309-314.

**WHITE M.E.** Consultant. A diagnostic support system for veterinary medicine. Cornell College of Veterinary Medicine. <http://www.vet.cornell.edu/consultant/consult.asp>, consulté le 13 décembre 2002.

**WIJFFELS R., DEKEYSER P.** *Brucella abortus* biotypen in België van 1982 tot en met 1986. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 1987, **56 (4)**, 359-363.

**WILESMITH J.W.** Manual on bovine spongiform encephalopathy. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 1998, 51 p.

**WILESMITH J.W., WELLS G.A., CRANWELL M.P., RYAN J.B.** Bovine spongiform encephalopathy : epidemiological studies. *Vet. Rec.*, 1988, **123**, 638-644.

**WILESMITH J. W., RYAN J. B. M., ATKINSON M. J.** Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet. Rec.*, 1991, **128**, 199-203.

**WILESMITH J. W., HOINVILLE L. J., RYAN J. B. M., SAYERS A. R.** Bovine spongiform encephalopathy: aspects of the clinical picture and analyses of possible changes 1986-1990. *Vet. Rec.*, 1992, **130**, 197-201.

**WILESMITH J.W., HOINVILLE L.J., RYAN J.B.M., SAYERS A.R.** Bovine spongiform encephalopathy : aspects of the clinical picture and analyses of possible changes 1986-1990. *Vet. Rec.*, 1992a, **130**, 90-94.

**WILESMITH J.W., RYAN J.B.M., HUESTON W.D.** Bovine spongiform encephalopathy: case-control studies of calf feeding practices and meat and bone meal inclusion in proprietary concentrates. *Res. Vet. Sci.*, 1992b, **52**, 325-331.

**WILESMITH J.W., RYAN J.B.M., HUESTON W.D., HOINVILLE L.J.** Bovine spongiform encephalopathy : epidemiological features 1985-1990. *Vet. Rec.*, 1992b, **130**, 90-94.

**WILESMITH J.W., MORRIS R., PRATTLEY D., CANNON R., STEVENSON M.** National BSE Surveillance: A Method for Analysing and Interpreting the Data. TSE Community Reference Laboratory Workshop, 16-17 June 2004, Woking, Surrey, United-Kingdom.

**WILL R. G., IRONSIDE J. W., ZEIDLER M., COUSENS S. N., ESTIBEIRO K., ALPEROVITCH A., POSER S., POCCHIARI M., HOFMAN A., SMITH P. G.** A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet.*, 1996, **347**, 921-925.

**WILLET. L.B.** Excretory behavior of polychlorinated biphenyls in lactating cows fed normal and thyroprotein containing rations. Abstracts of Papers to be presented at the Seventh Annual Meeting of the American Dairy Science Association. *J. Dairy Sci.*, 1975, **58**, 765.

**WILLIAMS E.S., YOUNG S.** Spongiform encephalopathy of rocky mountain elk. *J. Wildl. Dis.*, 1980, **18**, 465-471.

**WILLIAMS E.S., MILLER M.W.** Chronic wasting disease in deer and elk in North America. *In* Infectious diseases of wildlife: detection, diagnosis and management, Part Two, (R.G. Bengis, ed.). *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, 2002, **21**, 305-316.

**WILLIAMS E.S., MILLER M.W.** Transmissible spongiform encephalopathies in non-domestic animals: origin, transmission and risk factors. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2003, **22**, 145-156.

**WILSON B.J., BYERLY C.S., BURKA L.T.** Neurologic disease of fungal origin in three herds of cattle. *J. Am. vet. med. Assoc.*, 1981, **179**, 480-481.

**WILSON C., HUGHES L., RASHID T., CUNNINGHAM P.** Antibodies to prion and Acinetobacter peptide sequences in bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Immuno. Immunopathol.*, 2004, **98**, 1-7.

**WINTER M. H., ALDRIDGE B. M., SCOTT P. R., CLARKE M.** Occurrence of 14 cases of bovine spongiform encephalopathy in a closed dairy herd. *Brit. Vet. J.*, 1989, **145**, 191-194.

**WISSING M.** Les dioxines : état actuel des connaissances des effets sur la santé. *Rev. Méd. Brux.*, 1998, **19**, A367-371.

**WITTMANN G.** Aujeszky's disease in ruminants. *In* Herpesvirus disease of cattle, horses and pigs (G. Wittmann, édit.). *Developments in Veterinary Virology*, Kluwer Academic Publishers, Boston, 1989, 163-175.

**WOOD J.N.L., LUND L.J., DONE S.H.** The natural occurrence of scrapie in moufflon. *Vet. Rec.*, 1992, **130**, 25-27.

**WORLD HEALTH ORGANISATION.** Levels of PCBs, PCDDs and PCDFs in human milk. Environmental Health in Europe n° 3. Bilthoven: WHO European Centre For Environment and Health, 1996.

**WORLD ANIMAL HEALTH ORGANIZATION.** Guidelines for continuous surveillance and monitoring of bovine spongiform encephalopathy. Appendix VIIIb of the January 1997 meeting of the International Animal Health Code Commission, document 65 SG/12/CS 1.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION.** Guidelines for predicting dietary intake of pesticide residues. Prepared by the Global Environment Monitoring System, Food Contamination Monitoring and Assessment Programme (GEMS/Food) in collaboration with Codex Committee on Pesticide Residues. World Health Organization : Geneva, 1997, pp. 33.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION.** Food consumption and exposure assessment of chemicals. Report of a FAO/WHO consultation, Geneva, Switzerland, 10-14 February 1997. World Health Organization : Geneva, 1997, pp. 68.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION.** Executive summary. Assessment of health risk of dioxins: re-evaluation of the tolerable daily intake, 1998a, 1-19.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION.** Food safety issues. GEMS/food regional diets. Document WHO/FSF/FOS/98.3, 1998b, 1-18.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION.** Methodology for exposure assessment of contaminants and toxins in food. World Health Organization : Geneva, 2000, pp. 19.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION.** Rabies surveillance report. Center for rabies surveillance and research, *Rabies Bulletin Europe*, 2001, **3**, 4-8.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION.** GEMS/Food regional diets. World Health Organization : Geneva, 2003, p. 14.

**WORLD ANIMAL HEALTH ORGANIZATION.** International Animal Health Code, 10th edition, Appendix 3.8.4. Surveillance and monitoring systems for bovine spongiform encephalopathy [Online, June 2003.] [http://www.oie.int/eng/normes/mcode/A\\_00157.html](http://www.oie.int/eng/normes/mcode/A_00157.html).

**XIE XIN.** Orally administrable brucellosis vaccine : *Brucella suis* strain 2 vaccine. *Vaccine*, 1986, **4**, 212-216.

**YAMADA M., NABAGAWA M., YAMAMOTO M., FURUOKA H., MATSUI T., TANIYAMA H.** Histopathological and immunohistochemical studies of intracranial nervous-system tumours in four cattle. *J. comp. Pathol.*, 1998, **119**, 75-82.

**YAMAKAWA Y., HAGIWARA K., NOHTOMI K., NAKAMURA Y., NISHIJIMA M., HIGUCHI Y., SATO Y., SATA T.** Atypical proteinase K-resistant prion protein (PrPres) observed in an apparently healthy 23-month-old Holstein steer. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2003, **56(5-6)**, 221-222.

**YAO Y., TAKASUGA T., MASUNAGA S., NAKANISCHI J.** Detailed study of the levels of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and polychlorinated biphenyls in Yusho rice oil. *Chemosphere*, 2002, **46**, 1461-1469.

**ZEIDLER M., IRONSIDE J.W.** (The new variant of Creutzfeldt-Jakob disease. *In* Le point sur les zoonoses (P.-P. Pastoret, édit.). *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2000, **19** (1), 98-120.

**ZEPEDA C., SALMAN M., RUPPNER R.** International trade, animal health and veterinary epidemiology : challenges and opportunities. *Prev. Vet. Med.*, 2001, **48**, 261-271.

**ZWICH W., WITTE J.** Zur Frage der Schutzimpfung und der Inkubationsfrist bei der Bornaschen Krankheit. *Arch. Tierheilkd.*, 1932, **64**, 116-124.