



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 4277](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints/ID/4277)

To cite this version :

MOLTO, Nelly. *Les maladies réglementées chez les primates* .
Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Toulouse 3, 2010, 297 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

LES MALADIES RÉGLEMENTÉES CHEZ LES PRIMATES

THÈSE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLÔME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement le 25 juin 2010
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

Nelly, Laure MOLTO
Née le 01 septembre 1984, Mont-de-Marsan (Landes)

Directeur de thèse : M. le Professeur Jacques DUCOS de LAHITTE

PRÉSIDENT :

M. Patrice MASSIP

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :

M. Jacques DUCOS de LAHITTE

M. Stéphane BERTAGNOLI

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maitre de conférences à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITÉ :

Me. Sylvie CLAVEL

Docteur vétérinaire à l'*African Safari*, PLAISANCE DU TOUCH



Enseignement agricole
Formations grandeur nature



**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. A. MILON

Directeurs honoraires : M. G. VAN HAVERBEKE.
M. P. DESNOYERS

Professeurs honoraires :

M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE
M. C. LABIE	M. JF. GUELFY	
M. C. PAVAU	M. EECKHOUTTE	
M. F. LESCURE	M. D.GRIESS	
M. A. RICO	M. CABANIE	
M. A. CAZIEUX	M. DARRE	
Mme V. BURGAT	M. HENROTEAUX	

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1^o CLASSE

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistique, Modélisation*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 2^o CLASSE

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

INGENIEUR DE RECHERCHE

M. **TAMZALI Youssef**, *Responsable Clinique Equine*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*

M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*

M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*

Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*

M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*

M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*

Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*

Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*

Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*

M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*

Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*

M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*

Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*

M. **DOSSIN Olivier**, (DISPONIBILITE) *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*

M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*

M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*

M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*

Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*

M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*

M. **MAGNE Laurent**, *Urgences soins-intensifs*

M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*

M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*

Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*

M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*

Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*

Mme **TROGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*

M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENT CONTRACTUEL

M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*

M. **CORRAND Leni**, *Médecine Interne*

M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*

M. **IRUBETAGOYENA Iban**, *Médecine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*

Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*

M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*

M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*

M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*

Mlle **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*

M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

À Monsieur le Professeur Patrice MASSIP

Professeur des Universités, Chef de pôle, Praticien hospitalier, *Maladies infectieuses et tropicales*

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse. Hommages respectueux.

À Monsieur le Professeur Jacques DUCOS DE LAHITTE

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Parasitologie et Maladies parasitaires

Qui nous a fait l'honneur d'accepter et de diriger cette thèse,
Pour son soutien et sa rapidité à corriger les différents jets de cette thèse, pour son intérêt stimulant pour la faune sauvage.

En témoignage de notre sincère reconnaissance.

À Monsieur le Docteur Stéphane BERTAGNOLI

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie infectieuse

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse. Pour sa disponibilité. Très sincères remerciements.

À Madame le Docteur Sylvie CLAVEL

Vétérinaire à l'*African Safari*, parc zoologique de Plaisance-du-Touch (31)

Qui a accepté notre invitation à ce jury de thèse. Pour sa gentillesse, sa pédagogie, son soutien tout au long de ses années, pour tous les souvenirs incroyables passés à l'African Safari (canoë for ever), pour les fous rires à Barcelone et notre traversée jusqu'en Hongrie ! Pour sa confiance et son amour partagé pour la faune sauvage. Le petit poulet a une chouette Maman !

Très très très sincères remerciements.

À Pascal,

Pour toutes ces belles années passées à tes côtés, et pour les nombreuses à venir, pour m'avoir toujours soutenue, et attendue (!!!), parce que je sais que c'est toi. Tu es mon meilleur ami, mon confident, tu me connais par cœur et je ne pouvais rêver mieux.

Je t'aime.

À mes parents,

Pour n'avoir jamais baissé les bras, pour m'avoir montré que l'on peut tout surmonter, pour avoir toujours cru en moi et m'avoir permis de réaliser mon rêve. Je vous dois tellement que quelques lignes ne suffiront pas, je suis si fière de vous.

Je vous aime.

À mon grand frère, Matthieu,

Pour avoir été le meilleur des grands frères, mon modèle, pour tous tes délires de deux roues dans lesquels tu m'as embarquée, pour notre belle complicité. Je suis fière de l'homme que tu es et du papa génial que tu es devenu.

Je t'aime.

À mon Papi,

Toi qui rêvais de me voir vétérinaire, ça y est c'est fait ! De là-haut, je suis sûre que tu es fier de moi...

À ma Mamie,

Pour tous ces beaux moments passés à Piré au milieu des champs et des animaux, pour ta confiance et tout ce que tu m'as apporté, et ton pain à l'ail ! Merci...

À ma Mémé et mon Pépé,

À la matriarche que tu étais, et ton côté Pied-noir inimitable,

À mon grand-père parti trop tôt...

À Phanie,

Pour avoir su rendre mon frère heureux, pour ta joie de vivre et notre amitié, et pour m'avoir donné les plus beaux neveux...

À Matthis et Noa,

Pour mes deux rayons de soleil, parce qu'avec vous c'est la vie qui continue, pour tout le bonheur de vous voir grandir, je vous aime et je serai toujours là pour vous...

À ma Mumu,

Ma petite cousine, ou plutôt la petite sœur que je n'ai pas eu ! Pour nos chamailleries d'enfance mais surtout pour notre si belle complicité. **À Yoan**, pour ta simplicité, vous formez un beau duo...

À Françoise et Hubert,

Pour tous ces souvenirs à la palombière ou à Capbreton, et pour ces moments inoubliables à Eurodisney sous une chaleur accablante !!!

À mon Parrain et ma Marraine,

Pour votre aide et les dépannages en urgence !

À Jeannot, mon grand-oncle,

Pour ces deux mois partagés chez toi, pour ton accueil si chaleureux et tous les souvenirs de famille que tu m'as livrés, et pour cette belle rencontre avec le petit **Enzo**, merci !

À toute la famille Bourdin, Annie, Claude, Martin, Claire et Joseph,

Pour votre accueil si chaleureux, pour votre gentillesse et votre simplicité, pour le Portugal et ses salades de maïs, pour l'Ecosse et son soleil éclatant, pour le foot et les bolides !

Je suis ravie de vous connaître.

À la Clinique Vétérinaire du Ladou, à Christian Duval, François Causse, Nicolas Lefèbvre, Laurence et Sophie, une équipe de choc,

Pour votre accueil, votre pédagogie tout au long de ces années, pour m'avoir tellement appris, à moi la vétérinaire en herbe, merci !

À tous les vétos qui m'ont accueillie en stage et m'ont fait profiter de leur expérience, et particulièrement à toute **l'équipe de Nay, au Dr Manière** à Decize (parce que la césarienne de 3h du mat' n'a pas de prix) !

À Jean-Marc et Patricia Toniutti,

Pour m'avoir fait confiance au sein de votre zoo, pour tous ces moments inoubliables à l'African Safari, pour m'avoir laissé rêver parmi vos animaux, et petite dédicace à notre Alfred international !

Au Dr Antoine Leclerc, au Dr Élodie Trunet, merci de m'avoir fait profiter de vos conseils, et de votre expérience, d'avoir partagé votre passion.

À toute l'équipe de la Réserve Africaine de Sigean, et particulièrement **Marianne Bilbaut et Frédéric Tardy**, merci pour votre accueil.

À tous mes amis Landais, mes amis d'enfance,

À ma petite Gaëlle, unique et irremplaçable, confidente de tous les instants, à ce voyage en Italie rocambolesque, au plus beau des calendriers, à ces moments d'amitié partagés, que ferais-je sans toi ?!

À ma chère amie Raf, à notre amour partagé des animaux, notre passion pour les arts, à toutes ces leçons de conduite dignes de Prost (attention à la 5^{ième} !), pour m'avoir soutenue pour mon piercing, mais surtout pour ton amitié sans faille...

À Elise et Pauline, les jumelles les plus attachantes, à notre amitié plus forte que la distance, à tous nos souvenirs de féria, au dodo dans le coffre, au voyage en Andalousie et le castrage de maïs...

À Anne-Laure, à cette enfance passée ensemble, à ton caractère impulsif (parfois trop !!!), à cette gentillesse infinie, et au petit bout à venir, tu seras la première de la bande à franchir le cap !

À ma jum's, qui se reconnaîtra !

À Mathieu, pour toutes ces belles années de foot, pour ton humour et le fameux Panettone du jour de l'An ! Promis on arrête de te chambrer...ou pas !

À tous mes amis vétos, sans qui l'ENVT aurait eu moins de saveurs !

À Fanny, kiki n°1, à la plus chouette des voisines, qui me supporte depuis la prépa, de Bordeaux à Toulouse, à nos goûters saucisson, à nos soirées télé, et notre amour pour la cuisine (vous avez dit gourmandes ?), à ton amitié 24h/24h, et pour tes deux bébés !

À Marielle, une coéquipière juste géniale, pour toutes nos folies communes, du Maroc en 4L, à nos deux Pépettes, pour ta joie de vivre, ton excentricité et parce qu'il n'y en a pas deux comme toi !

À Romain, kiki n°2, pour ta blonditude attitude, pour ton humour de tous les instants et tes phrases cultes, pour la prépa, et cette nuit surnaturelle d'Austin Power à Bernussou, fais nous encore rêver !!!

À Eugénie, notre globe-trotteuse insatiable, qui nous fait voyager par procuration. Pour ta

simplicité et notre belle amitié née à l'ENVT, garde nous un peu de place dans ta valise, tu nous manques, reviens nous vite !

À **Hélène** (ou p'tite fille ou Doudoune), pour cette soirée mémorable au domaine du Haut Thorenc (Jean-Séb c'est un pervers !), pour tous les mojitos toulousains et tes fameux makis, et ces soirées de boom de D3 ! Pour tous nos fous rires et ceux à venir !

Au meilleur groupe de TP !

À **Fred**, pour cette passion partagée pour la faune sauvage, à ce stage à l'African Safari, à notre baptême de rhinos, et ce premier rempla en zoo avec toi, pour ton sens aiguë du ménage (!!!) et ta vocation ratée de GPS à Budapest. Merci pour ton aide dans cette dernière ligne droite !

À **Katia et Camille** de la prépa à l'ENVT !

À **Séb**, pour le meilleur des binômes de bovine de l'ENVT et à ses acolytes **Pierre et Julien**.

À **notre groupe de TP d'adoption**,

À **Anaïs**, et notre amour partagée des Landes (le plus beau des départements !), pour ton humour et ton franc-parler, un jour je te rejoindrai en Afrique, c'est sûr !

À **Guillaume** et tes tenues de boom, à **Aurélie** et ta mère, à **Fanny G.** et Toto, à **Fanny Gi.** et le beaujolais nouveau !

À **toute la promo Gellé-Desnoyers**, à tous ces WK de promo, et ces merveilleuses années passées à l'ENVT...

À **la promo Brard la vraie**, pour ces moments passés avec vous,

À **Foufoune ou Touftouf**, pour ton rire inimitable, pour ces fins de boom à jouer avec Bora, j'attends toujours le porno gay !

À **Mado et Majida**, mes deux carrées au cœur éternelle de poulottes !

À **Masson**, pour m'avoir convertie au Mac, à quand le nouvel Iphone ?!

À **Ben**, et ton naturel ! Pour ce WK à Nantes !

À **Lemaiiiiiirre**, pour ton aide pour le 4L Trophy, et ton secours en fin de préchauff, sacré Labourde !

À **Marie et Loukoum**, et leur magnifique **petit Louis**, et à tous nos apéros foot à venir (euh encore quelques temps à tenir Marie !!!).

À **Raoul**, et les apéros Mégadrive ! À notre futur voyage dans ton île !

À **Pauline**, je te souhaite de réaliser tes rêves de faune sauvage ! Tu me raconteras !!!

À **Amandine et Manue**, pour avoir si bien pris la relève !

À **mes Docteurs** et plus particulièrement : **Mickey, Fanny, Dumé, VB, Simon, Flo, Alien et Pierrou**.

À **mes poulots** : Virginie, Claire, Tanguy, Stéphane, Marie, Julien, Vincent, Caroline, Florie, Nico et tous les autres...

À **ma petite Bora**, ma Pépette, mon satellite, ma fidèle compagne de tous les instants, et à nos soirées canapé !

À tous les animaux qui m'ont donné envie de faire ce métier, et à **Réva et Aldo**...

À **Lulu, à l'ENVT**,

À tous ceux que j'ai oublié de citer, soyez indulgents, car fidèle à moi-même c'est au dernier moment que je m'y prends...

Carpe Diem

*"Vivez, si m'en croyez, n'attendez à demain :
Cueillez dès aujourd'hui les roses de la vie."*

Pierre de Ronsard

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX.....	24
TABLE DES FIGURES.....	25
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	26
INTRODUCTION.....	29

PREMIÈRE PARTIE : MALADIES REPUTÉES CONTAGIEUSES

<u>1- La Brucellose</u>	33
Présentation de l'agent	33
I- Classification	33
II- Principaux caractères bactériologiques	33
III- Pathogénie	34
Données épidémiologiques	36
I- Répartition géographique	36
II- Espèces sensibles	36
III- Transmission	38
a- Sources de contamination	38
b- Modes de transmission	38
Expression clinique	39
Méthodes diagnostiques	40
I- Introduction	40
II- Diagnostic direct	40
a- Diagnostic bactériologique	40
b- Diagnostic par PCR (Polymerase Chain Reaction)	41
III- Diagnostic indirect	42
a- Diagnostic sérologique	42
b- Intradermo-réaction à la brucelline	49
Réglementation sanitaire	50
Prophylaxie et traitement	52
I- Prophylaxie	52
a- Prophylaxie médicale	52
b- Prophylaxie sanitaire	52
II- Traitement	52

<u>2- La fièvre charbonneuse</u>	53
Présentation de l'agent	53
I- Classification	53
II- Principaux caractères bactériologiques	54
III- Pathogénie	55
Données épidémiologiques	57
I- Répartition géographique	57
II- Espèces sensibles	58
III- Transmission	59
a- Sources de contamination	59
b- Modes de transmission	59
Expression clinique	60
Méthodes diagnostiques	62
I- Identification de l'agent pathogène	62
a- Culture et identification de <i>Bacillus anthracis</i>	62
i) Prélèvement frais	62
ii) Mise en évidence de la capsule	63
iii) Autres prélèvements	64
b- Mise en évidence immunologique et diagnostic	65
i) La réaction d'Ascoli	65
ii) Chromatographie	65
iii) Immunofluorescence	66
c- Confirmation de la virulence par la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR)	66
II- Épreuves sérologiques	67
III- Épreuve d'hypersensibilité (Anthraxine TM)	68
IV- Avancées dans les techniques de diagnostic	69
Réglementation sanitaire	70
Prophylaxie et traitement	72
I- Prophylaxie	72
a- Lutte	72
b- Vaccination	72
II- Traitement	74

<u>3- Les fièvres hémorragiques simiennes</u>	75
Présentation des agents	75
I- Généralités sur les fièvres hémorragiques simiennes	75
II- Les Filovirus	76
a- Le virus Ebola	76
b- Le virus Marburg	78
III- Le Nairovirus Crimée-Congo	78
IV- Les Alphavirus	79
a- Le virus de Mayaro	79
b- Virus de Chikungunya	79
V- Virus Amaril	80
Données épidémiologiques	82
I- Répartition géographique et espèces sensibles	82
II- Transmission	83
a- Le cas des arbovirus	83
i) Le virus de Chikungunya	83
ii) Le virus de Mayaro	84
iii) La fièvre jaune	84
iiii) La fièvre hémorragique Crimée-Congo	85
b- Cas des Filovirus	86
i) Ebola	86
ii) Marburg	87
Expression clinique	88
Méthodes diagnostiques	89
I- Diagnostic différentiel	89
II- Diagnostic de laboratoire	89
III- Récentes découvertes	93
Réglementation sanitaire	95
I- La réglementation actuelle sur la manipulation du virus	95
II- Réglementation actuelle sur l'importation de primates non-humains concernant les fièvres hémorragiques simiennes	96
III- Les mesures à prendre en cas de découverte d'animal positif	96
IV- Les laboratoires et experts de référence	97
Prophylaxie et traitement	101

I-	Prophylaxie	101
a-	Virus Ebola	101
b-	Le virus Marburg	102
c-	Fièvre hémorragique Crimée-Congo	102
d-	Fièvre de Mayaro	103
e-	Maladie à virus chikungunya	103
f-	Fièvre jaune	104
II-	Traitement	105
4-	<u>Herpès-virose simienne de type B</u>	107
Présentation de l'agent		107
I-	Classification	107
II-	Principaux caractères virologiques	109
a-	Les caractéristiques structurales du virion	109
b-	Le génome	110
c-	Les protéines virales	111
d-	La variabilité génétique du CeHV-1	111
III-	Pathogénie	112
Données épidémiologiques		114
I-	Répartition géographique	114
II-	Espèces sensibles	114
a-	Les espèces concernées naturellement	114
b-	Les espèces sensibles en captivité ou expérimentalement	115
III-	Transmission	115
a-	Les sources de contamination	115
b-	Modes de transmission	115
Expression clinique		117
I-	Les signes cliniques de la forme classique chez le macaque	117
a-	La primi-infection	117
b-	La latence virale et les récurrences par réinfection endogène ...	117
II-	Aspect lésionnel	118
a-	Sur le plan macroscopique	118
b-	Sur le plan microscopique	118
III-	Formes cliniques atypiques	119

Méthodes diagnostiques	120
I- Sérologie	120
a- Tests de neutralisation, RIA, Western Blot et ELISA	120
i) Test de neutralisation	120
ii) Dosages radio-immunologiques	120
iii) Le Western Blot	120
iiii) Les tests ELISA	121
c- Problèmes posés par la sérologie	123
i) les sérologies faussement négatives	123
ii) Les sérologies faussement positives	123
II- Polymérisation en chaîne (PCR)	123
Réglementation sanitaire	126
I- La réglementation actuelle sur la manipulation du virus	126
II- La réglementation actuelle sur l'importation des macaques concernant le CeHV-1	126
III- Les mesures à prendre en cas de découverte d'animal positif	127
Prophylaxie et traitement	131
I- Prophylaxie et prévention	131
a- Chez l'animal	131
b- Chez l'homme	132
II- Le traitement de l'herpès virose B chez l'animal	134
a- Le traitement médical	134
b- La vaccination anti-CeHV-1	134
 <u>5- Maladie d'Aujeszky</u>	 137
Présentation de l'agent	137
I- Classification	137
II- Principales caractéristiques	138
III- Pathogénie	138
Données épidémiologiques	139
I- Répartition géographique	139
II- Espèces sensibles	139
III- Transmission	139
Expression clinique	141

Méthodes diagnostiques	142
I- Identification de l'agent pathogène	142
a- Isolement du virus	142
b- Identification par amplification en chaîne par polymérase	143
II- Épreuves sérologiques	144
Réglementation sanitaire	145
Prophylaxie et traitement	147
I- Prophylaxie	147
II- Traitement	147
<u>6- La rage</u>	149
Présentation de l'agent	149
I- Classification	149
II- Principaux caractères virologiques	150
a- Morphologie	150
b- Culture	150
c- Sensibilité et résistance	150
d- Antigènes et induction d'anticorps	150
e- Immunité antirabique	151
III- Pathogénie	152
Données épidémiologiques	154
I- Répartition géographique	154
II- Espèces sensibles	154
III- Transmission	155
a- Les sources de contamination	155
i) Les organismes vivants	155
ii) Les matières virulentes	156
iii) Le milieu extérieur	156
b- Modes de transmission	157
Expression clinique	158
I- Symptômes	158
II- Lésions	159
a- Macroscopiques	159
b- Microscopiques	159

Méthodes diagnostiques	161
I- Diagnostic de terrain	161
II- Diagnostic expérimental	161
a- Épreuves de laboratoire de routine	161
i) Identification immunochimique de l'antigène du virus rabique	162
ii) Détection de la réplication du virus rabique après inoculation	164
iii) Identification histologique des lésions cellulaires caractéristiques	165
b- Autres épreuves d'identification	166
III- Épreuves sérologiques	167
Réglementation sanitaire	168
I- La réglementation actuelle sur la manipulation du virus	168
II- La réglementation actuelle sur l'importation des primates non humains	168
III- Les mesures à prendre en cas de découverte des animaux enrégés, suspects et des mordeurs	169
IV- Laboratoires de référence	170
Prophylaxie et traitement	172
I- Prophylaxie	172
a- Prophylaxie sanitaire	172
b- Prophylaxie médicale	173
II- Traitement	173
<u>7- La tuberculose</u>	175
Présentation de l'agent	175
I- Classification	175
a- Les mycobactéries pathogènes	176
b- Les mycobactéries opportunistes	176
c- Les mycobactéries saprophytes	177
II- Principales caractéristiques des bacilles tuberculeux	177
a- Morphologie générale	177
b- Propriétés tinctoriales	178

c-	Caractères cultureux	178
d-	Caractéristiques biochimiques et génétiques	179
e-	Sensibilités et résistances	179
III-	Pathogénie	180
	Données épidémiologiques	182
I-	Répartition géographique	182
II-	Espèces sensibles	182
III-	Transmission	183
a-	Sources de contamination	183
b-	Modes de transmission	184
c-	Facteurs de réceptivité	185
	Expression clinique	187
	Méthodes diagnostiques	188
I-	Diagnostic clinique et anatomo-pathologique	188
a-	Examen clinique	188
b-	Examens complémentaires	188
c-	Diagnostic post-mortem	189
II-	Méthodes de diagnostic direct	190
a-	Examen direct et mise en évidence de l'acido-alcool-résistance	190
b-	Culture bactériologique	191
c-	Méthodes basées sur la détection des acides nucléiques	192
i)	Méthodes d'amplification génomique	192
ii)	Méthodes de génotypage : R.F.L.P. et spoligotyping	193
III-	Méthodes de diagnostic indirect	195
a-	Recherche de témoin de l'immunité cellulaire	195
i)	Test tuberculinique intra-dermique	195
ii)	Le test interféron gamma	198
b-	Recherche de témoins de l'immunité humorale	200
i)	ELISA	200
ii)	MAPIA (Multi-Antigen Print Immunoassay)	200
iii)	PrimaTB StatPak®	201
	Réglementation sanitaire	204
I-	Bases de la réglementation	204

II-	La réglementation actuelle sur l'importation des primates concernant la tuberculose	205
III-	Laboratoires de référence	206
	Prophylaxie et traitement	208
I-	Prophylaxie	208
II-	Traitement	208

DEUXIÈME PARTIE : MALADIES A DÉCLARATION OBLIGATOIRE

<u>1- Les ESST</u>	211
Présentation de l'agent	211
I- Classification	212
II- Nature, rôle biologique et caractéristiques	212
III- Pathogénie	213
a- Réplication périphérique et entrée dans le système nerveux	213
b- Neuropathogenèse des ESST	214
Données épidémiologiques	216
I- Répartition géographique	216
II- Espèces sensibles	216
a- Cas en milieu naturel	216
b- Cas en milieu expérimental	217
III- Transmission	219
a- Sources de contamination	219
b- Modes de transmission	220
Expression clinique	221
Méthodes diagnostiques	223
I- Identification de l'agent pathogène	223
a- Diagnostic histologique	223
b- Méthodes immunohistochimiques	224
c- Méthodes de Western blot	224
d- Méthodes rapides	225
e- Autres épreuves de diagnostic	226
i) Recherche des protéines fibrillaires en microscopie électronique	226
ii) Diagnostic par inoculation à des animaux de laboratoire ..	226

II- Épreuves sérologiques	226
Réglementation sanitaire	227
Prophylaxie et traitement	228
I- Prophylaxie	228
II- Traitement	228
<u>2- La variole du singe</u>	229
Présentation de l'agent	229
I- Classification	229
II- Principales caractéristiques	230
III- Pathogénie	230
Données épidémiologiques	231
I- Répartition géographique	231
II- Espèces sensibles	231
III- Transmission	232
a- Sources de contamination	232
b- Modes de transmission	232
Expression clinique	233
Méthodes diagnostiques	234
I- Identification de l'agent pathogène	234
a- Microscopie électronique en transmission	234
b- Isolement du virus en cultures cellulaires	234
c- Isolement du virus sur membrane chorio-allantoïdienne (MCA) d'oeuf de poule embryonné et sur peau de lapin	235
d- Immunohistochimie	235
e- Amplification en chaîne par polymérase	236
II- Épreuves sérologiques	236
Réglementation sanitaire	237
Prophylaxie et traitement	238
I- Prophylaxie	238
II- Traitement	238

TROISIÈME PARTIE : LES MALADIES RÉGLEMENTÉES À L'IMPORTATION

<u>1- Les entérobactéries pathogènes</u>	241
Présentation de l'agent	241

I-	Classification	241
II-	Principales caractéristiques bactériennes	242
III-	Pathogénie	243
	a- Salmonellose	243
	b- Shigellose	243
	c- Yersiniose	244
	Données épidémiologiques	245
I-	Répartition géographique et espèces sensibles	245
II-	Transmission	246
	a- Salmonellose	246
	i) Sources de contamination	246
	ii) Modes de contamination	246
	b- Shigellose	246
	i) Sources de contamination	246
	ii) Modes de contamination	246
	c- Yersiniose	247
	i) Sources de contamination	247
	ii) Modes de contamination	247
	Expression clinique	248
I-	Salmonellose	248
II-	Shigellose	248
III-	Yersiniose	249
	Méthodes diagnostiques	251
I-	Diagnostic sérologique	251
II-	Diagnostic bactériologique	252
III-	Diagnostic par PCR	253
	Réglementation sanitaire	254
I-	Réglementation actuelle sur la manipulation des entérobactéries	254
II-	Réglementation actuelle sur l'importation des primates non-humains concernant les bactéries entéropathogènes	255
III-	Laboratoires de référence	256
	Prophylaxie et traitement	258
I-	Prophylaxie	258
II-	Traitement	259

CONCLUSION	261
ANNEXES	263
Annexe 1 : Classification des primates	265
Annexe 2 : Textes réglementaires	267
Annexe 3 : Mode d'emploi du test PrimaTB StatPak®	278
Annexe 4 : Bon de commande européen PrimaTB StatPak®	283
BIBLIOGRAPHIE	285

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Comparaison des différentes méthodes de diagnostic de la Brucellose	48
Tableau 2 : Amorces utilisées pour confirmer la présence des plasmides pXO1 et pXO2 ...	66
Tableau 3 : Virus des fièvres hémorragiques simiennes et leur vecteur dans la nature	76
Tableau 4 : Répartition géographique et espèces sensibles des virus des fièvres hémorragiques simiennes	82
Tableau 5 : Expression clinique des fièvres hémorragiques chez les primates non-humains	88
Tableau 6 : Méthodes diagnostiques utilisées pour le virus des fièvres hémorragiques simiennes	94
Tableau 7 : Classification réglementaire des virus des fièvres hémorragiques simiennes ...	95
Tableau 8 : classification des Simplexvirus	108
Tableau 9 : Laboratoires de référence de l'herpès-virose B	129
Tableau 10 : Mesures prises à l'égard des animaux en cas de rage	170
Tableau 11: Quelques exemples de tuberculoses rapportés chez les primates non humains en parcs zoologiques	183
Tableau 12 : Système de notation de la réaction tuberculique chez les primates non humains, pour une injection au niveau de la paupière supérieure	196
Tableau 13 : Système de notation de la réaction tuberculique chez les primates non humains, pour une injection au niveau de l'abdomen	197
Tableau 14 : Spécificités et sensibilités des tests MAPIA et des Tests rapides	202
Tableau 15 : Résultats des essais de transmissions expérimentales d'EST à des primates .	217
Tableau 16 : Comparaison des propriétés des virus de la variole, de la vaccine et de la variole du singe	235
Tableau 17 : Classification des agents de la Salmonellose, de la Shigellose et de la Yersiniose	241
Tableau 18 : Principales caractéristiques morphologiques, biochimiques et de culture	242
Tableau 19 : Répartition géographique et espèces sensibles aux bactéries entéropathogènes	245
Tableau 20 : Classification réglementaire des bactéries entéropathogènes	254
Tableau 21 : Classification de l'ordre des Primates	266

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Arbre phylogénétique basé sur une comparaison des séquences de gènes obtenus à partir de l'espèce isolée sur les babouins avec des séquences types de <i>Brucella</i> déjà connues	37
Figure 2 : Conduite à tenir en cas de suspicion de transmission d'un macaque à l'homme	133
Figure 3 : Représentation schématique des trois périodes à connaître : l'incubation, la virulence présymptomatique et l'expression clinique	157
Figure 4 : Schéma récapitulatif des voies possibles de transmission de la tuberculose entre la faune domestique, sauvage et l'homme	185
Figure 5 : principales étapes du diagnostic bactériologique des infections tuberculeuses ..	194
Figure 6 : protocole de réalisation de la technique MAPIA (<i>Multi-antigen print immunoassay</i>)	201
Figure 7 : Modèle de transconformation de la PrPc en PrPsc	212
Figure 8 : Neuropathogenèse au cours des maladies à prions	215

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Illustration 1 : Frottis de placenta (avortement brucellique), coloration de Ziehl-Neelsen modifiée dite « de Stamp ». Les <i>Brucella</i> apparaissent en rouge fuchsia	34
Illustration 2 : <i>Bacillus anthracis</i> en microscopie électronique	53
Illustration 3 : Virus Ebola vu au microscope électronique	76
Illustration 4 : Particules virales de Marburg au microscope électronique	78
Illustration 5 : Herpès simplex virus	110
Illustration 6 : Virus Aujeszky	137
Illustration 7 : Virus de la rage vu au microscope électronique à transmission	149
Illustration 8 : <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	177
Illustration 9 : A / étapes de la coloration de Ziehl-Neelsen. B / aspects en cordes de <i>M. tuberculosis</i>	191
Illustration 10 : réalisation d'une tuberculination intra-palpébrale chez un macaque	196
Illustration 11 : Test PrimaTB Stat-Pak®	201
Illustration 12 : Virus de la variole du singe vu au microscope électronique	229

INTRODUCTION

Le terme Primate Non Humain (PNH) recouvre environ 290 espèces de taille, de mœurs et de régime alimentaire variés, dont la zone de distribution naturelle se situe majoritairement dans l'hémisphère Sud en zone intertropicale. Tous les PNH sont considérés comme des espèces menacées d'extinction et sont protégés par la Convention de Washington (CITES) qui régleme leur commerce à l'échelle internationale.

Auparavant, la réglementation française relative aux maladies des animaux ne prévoyait qu'un seul type d'affection : celles dont la gestion relève de l'autorité publique : les MRC, ex-MLRC, alias "Maladies Réputées Contagieuses".

La mise en conformité avec la réglementation européenne, et tout spécialement avec le paquet hygiène, la nécessité d'établir une distinction entre des maladies graves, celles faisant l'objet de mesures de lutte collectives obligatoires, celles devant simplement être signalée aux autorités sanitaires, nécessitait de remettre à plat la législation française.

C'est dorénavant chose faite : un décret du 17 février 2006 a permis d'actualiser les listes des "MRC" (maladies réputées contagieuses) et créé également une liste des "MDO" (maladies à déclaration obligatoire). On distingue également pour les primates un certain nombre de maladies réglementées à l'importation comme les infections aux entérobactéries pathogènes.

Ce travail comporte plusieurs objectifs. Le premier est d'établir de manière précise la liste des maladies réglementées chez les primates en distinguant trois catégories : les MRC, les MDO et les maladies réglementées à l'importation. Le second objectif est de mettre en évidence les techniques de dépistage adaptées aux primates mis à la disposition des vétérinaires. Enfin, on essaiera de mettre en évidence les recommandations faites par la législation en termes de moyen de dépistage officiel et de conduite à tenir en ce qui concerne les PNH.

Afin de donner une certaine clarté à cette étude, la thèse s'organisera en trois parties, à l'image des différentes classes de maladies réglementées.

PREMIÈRE PARTIE :
MALADIES RÉPUTÉES CONTAGIEUSES

BRUCELLOSE

La brucellose est une maladie infectieuse, contagieuse, commune à de nombreuses espèces animales et à l'Homme, due à des bactéries du genre *Brucella*. Sa répartition géographique est mondiale et de multiples espèces (ruminants, suidés, carnivores, rongeurs...) peuvent être infectées naturellement. La brucellose est aussi appelée fièvre ondulante, fièvre de Malte, fièvre de Gibraltar, fièvre méditerranéenne (chez l'Homme); avortement contagieux, fièvre abortive, avortement infectieux, avortement épizootique (animaux), maladie de Bang (bovins), épididymite contagieuse du bélier (ovins). (Acha. 2005).

PRÉSENTATION DE L'AGENT

I- Classification

Phylum : *Proteobacteria*

Classe : *Alphaproteobacteria*

Ordre : *Rhizobiales*

Famille : *Brucellaceae*

Genres : *Brucella* (Euzéby 2009)

Il y a actuellement six espèces de *Brucella* connues : *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella ovis*, *Brucella neotomae* et *Brucella canis*. Elles ont un haut degré d'homogénéité génétique et possèdent chacune plusieurs biovars. Une nouvelle espèce *Brucella maris* ou *Brucella delphini*, a été découverte récemment chez les dauphins. Ces bactéries ont un tropisme génital qui conduit à des avortements. (Krauss 2003).

II- Principaux caractères bactériologiques

Ces bactéries appartiennent à la classe de GRAM – et sont intracellulaires facultatives. Ce sont des petits coccobacilles de 0,6 à 1,5 µm sur 0,5 à 0,8 µm de large, immobiles, non sporulés, sans flagelle, ni pili, et aérobies stricts. Elles sont généralement isolées, ou moins fréquemment par paires ou petits groupes.

Brucella abortus (9 biovars), *Brucella melitensis* (3 biovars) et *Brucella suis* (5 biovars) ont des caractéristiques antigéniques communes, présentant toutes les trois des colonies de types « smooth » grâce aux lipopolysaccharides (LPS) de leur paroi, également responsable du développement des anticorps détectés chez l'hôte par agglutination, fixation du complément ou ELISA. Les colonies sont donc rondes, translucides, lisses, convexes et à contours nets. La morphologie des *Brucella* est assez constante, excepté dans les vieilles cultures où des formes pléomorphiques peuvent apparaître. Parfois des colonies « rough » (rugueuses et opaques) se développent, suite à une mutation spontanée provoquant une absence de LPS. Les réactions croisées avec le LPS de *Yersinia enterocolitica* O9, sont à l'origine de difficulté de dépistage.

Brucella canis est une espèce de *Brucella* spontanément en phase Rough, dont il n'existe qu'un seul biovar. Comme dans le cas de *B. ovis*, la présence d'antigènes de surface R rend impossible tout diagnostic sérologique grâce aux méthodes usuelles utilisant un antigène *B. abortus* en phase Smooth (Ganière 2006).

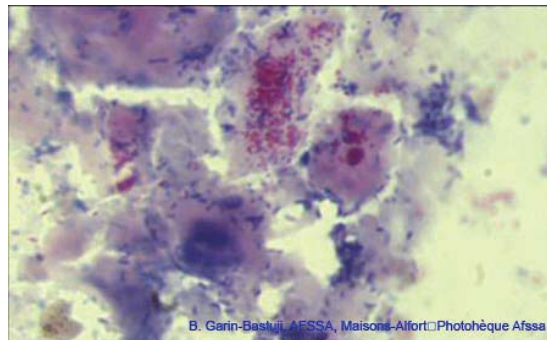


Illustration 1 : Frottis de placenta (avortement brucellique), coloration de Ziehl-Neelsen modifiée dite « de Stamp ». Les *Brucella* apparaissent en rouge fuchsia (Garin-Bastuji, AFSSA, 2010).

III- Pathogénie

La pénétration de la bactérie se fait généralement via la muqueuse orale, du nasopharynx, des conjonctives, par voie génitale, et parfois par des lésions cutanées. Il se produit alors une réaction inflammatoire aiguë de la sous-muqueuse avec infiltration par des leucocytes (granulocytes neutrophiles et monocytes), puis il y a extension par voie

lymphatique aux nœuds lymphatiques locaux. En fonction de l'état immunitaire de l'hôte, de la virulence et de la quantité des bactéries, il se produit :

- soit une dissémination dans l'organisme et une phase septicémique aiguë puis la localisation dans certains tissus : tissus lymphoïdes (surtout les nœuds lymphatiques de la sphère génitale), placenta des femelles gravides, testicules et leurs annexes, glande mammaire, bourses séreuses et synoviales, et certaines articulations. Parfois, des manifestations cliniques se déclarent alors, caractéristiques de la brucellose aiguë : avortement, orchite...

- soit l'arrêt de l'infection par les défenses immunitaires du sujet. Il existe donc plusieurs formes cliniques.

Les *Brucella* peuvent survivre plusieurs années dans certains sites, comme dans les nœuds lymphatiques, demeurant à l'intérieur des cellules phagocytaires, à l'abri du complément et des anticorps. Leur réactivation est possible à chaque gestation, entraînant alors un avortement et/ou une excrétion de bacilles au cours de la mise bas. Lorsque des bactéries persistent au niveau des séreuses et des articulations, un hygroma ou une arthrite chronique peuvent se développer.

La réponse immunitaire des animaux est à la fois humorale et à médiation cellulaire. Le LPS étant un antigène « T-indépendant », ce qui n'est pas le cas de la majorité des protéines, les anticorps dirigés contre lui n'ont pas besoin d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire pour être synthétisés.

La réponse humorale est identique chez toutes les espèces animales infectées. Elle est dirigée principalement contre l'antigène majeur de *Brucella abortus*, à savoir la chaîne O de son LPS. Ces anticorps anti-LPS induisent une lyse bactérienne, par la voie classique du complément ainsi que par opsono-phagocytose. Une réponse se développe aussi contre des protéines de la membrane extérieure, du périplasme, et du cytoplasme, mais plus tardivement.

La réponse cellulaire est elle dirigée exclusivement contre des protéines bactériennes. Elle se déroule en quatre étapes : les macrophages infectés produisent des cytokines ; puis les lymphocytes précurseurs se différencient en lymphocytes de type 1 ; ces lymphocytes 1 se divisent en lymphocytes « helpers » CD4+ et cytotoxiques CD8+ ; et enfin l'interféron gamma produit par ces deux lymphocytes induit la destruction de la bactérie. (Acha 2005 et Ganière 2006).

DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES

I- Répartition géographique

La maladie est cosmopolite. Zoonose bornée (absence de transmission inter-humaine reconnue). En Europe, seule l'Islande a toujours été indemne. Chypre, Danemark, Finlande, Norvège, Suède, Suisse et Slovaquie sont indemnes depuis environ 10 ans. En France le nombre de cas humains déclarés chaque année est faible (moins de 100 cas). Il ne représente qu'une petite part de la réalité, mais les sources de contamination humaine ont beaucoup diminué en France au cours de ces 20 dernières années et la brucellose humaine devrait être bientôt n'être qu'une maladie du passé, en France, comme dans l'U.E.

II- Espèces sensibles

La brucellose est une zoonose dont les espèces réservoirs sont habituellement les ruminants (bovins, ovins, buffles, yacks, chameaux, dromadaires...), les porcins, les canidés, les lièvres et les rongeurs. Les volailles, les oiseaux sauvages et les dauphins sont également des espèces sensibles. Les hommes peuvent être infectés par *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* et plus rarement par *B. canis* ; causant à chaque fois de sérieuses maladies. (Brack 1987).

De rares cas d'infections liées à la brucellose ont été mis en évidence chez les primates. Pinkerton (1967) rapporte un cas de brucellose, identifiée comme *B. melitensis*, chez un babouin sauvage au Kenya. Cependant il demeure quelques interrogations vis-à-vis de cette découverte car les conditions de croissance de *Bordetella bronchiseptica* ressemblent à celles de *Brucella sp.* et il existe de nombreuses réactions croisées lors des tests d'agglutinations. D'autres études ont montré quelques babouins (*Papio sp.*) séropositifs au Kenya (Kalter 1967). 50 sérums prélevés sur des *Callithrix penicillata* se sont révélés négatifs en anticorps anti-brucella (Ricciardi 1976) cependant des sérologies positives ont été retrouvées chez des ouistitis *Callithrix jacchus* (CNRS 2009).

Aucun anticorps brucellique n'a été mis en évidence chez le macaque Rhésus *Macaca mulatta* en particulier, cependant les macaques peuvent être infectés expérimentalement avec *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* et *B. canis* (Brack 1987). Les conséquences pathologiques sur les macaques rhésus après une exposition par aérosol de *B. melitensis* sont semblables à celles

observées chez l'homme avec la brucellose, ces résultats pourraient donc aider au développement d'un vaccin contre la brucellose pour les hommes. (Mense 2004).

La description de l'infection chez les primates non-humains a été plutôt limitée et fut initialement étudiée à la Southwest Foundation for Biomedical Research (SFBR) il y a 45 ans. L'étude de Schlabritz-Loutsevitch et *al.* (2009) décrit pour la première fois deux cas d'infections naturelles de Brucellose associés à des avortements ou mort-nés chez des primates non-humains (babouins *Papio spp*) issus d'une même colonie. De plus cette étude a mis en évidence et isolé une nouvelle espèce de *Brucella*. La souche isolée ressemble morphologiquement à *Brucella* bien que ses caractéristiques phénotypiques ne soient pas compatibles avec chacune des espèces actuellement décrites.

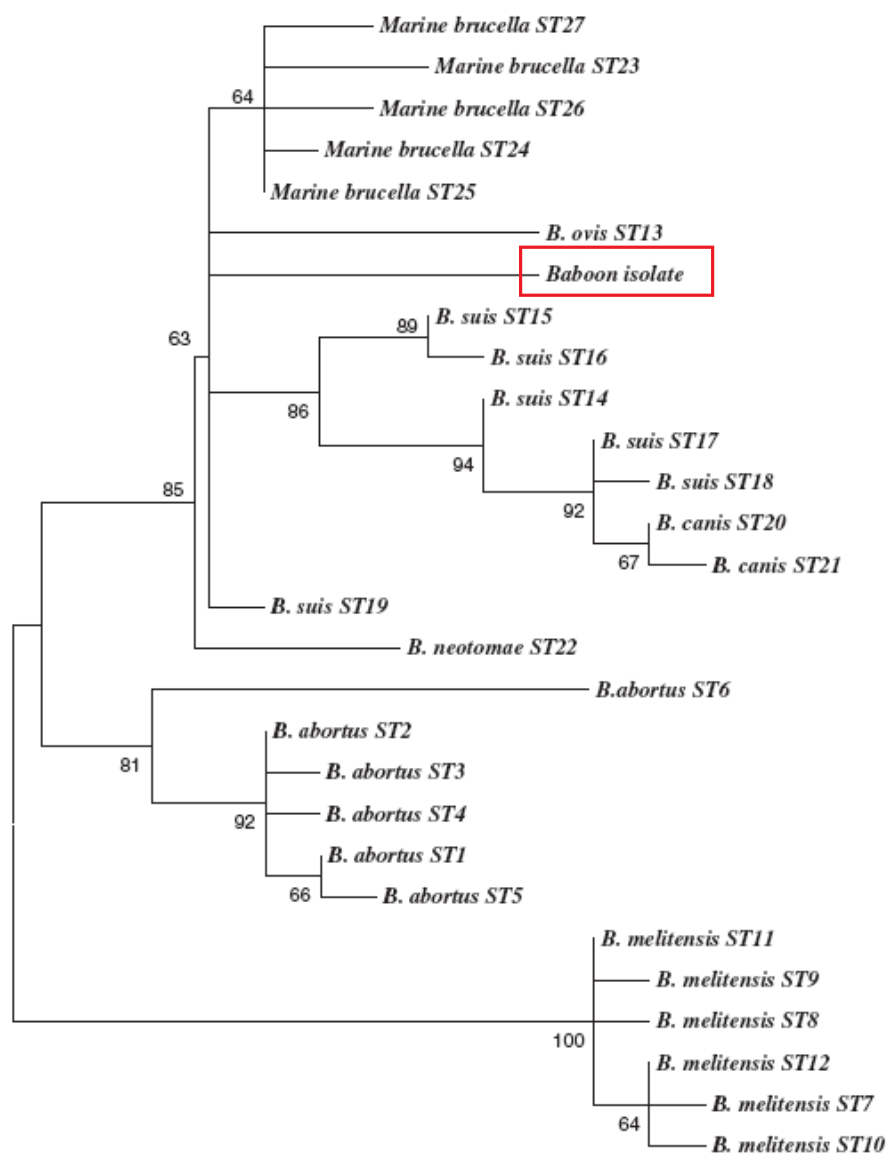


Figure 1: Arbre phylogénétique basé sur une comparaison des séquences de gènes obtenus à partir de l'espèce isolée sur les babouins avec des séquences types de *Brucella* déjà connues (Schlabritz-Loutsevitch 2009).

La construction d'un arbre phylogénétique basé sur une comparaison des séquences de gènes obtenus à partir de l'espèce isolée sur les babouins avec celles équivalentes obtenues sur 27 types de *Brucella* identifiés ultérieurement démontre que cette nouvelle espèce ne peut être associée à aucune autres décrites précédemment.

III- Transmission (Ganière 2006)

a- Les sources de contamination

La contamination est surtout d'origine génitale, à partir des liquides excrétés au moment de l'avortement, des sécrétions génitales (au moment des chaleurs). Les quantités d'agents infectieux excrétés sont massives.

Les matières virulentes sont constituées principalement par le placenta, l'avorton, mais aussi par : le lait, les urines, les selles et les aérosols que ces produits peuvent provoquer. L'environnement souillé (locaux, abris, sols, murs, matériel, litière, mares et cours d'eau contaminés) constitue des sources d'infections également redoutables.

b- Modes de transmission

Par contact direct :

- par transmission de la mère au petit ;
- par voie génitale chez les animaux ;
- par absorption d'un aliment contaminé

Par contact indirect :

Contact avec un élément de l'environnement contaminé par les matières virulentes : aérosol, végétaux, terre

EXPRESSION CLINIQUE

Les dominantes pathologiques se manifestent cliniquement principalement chez les Bovins Ovins et Caprins par des avortements. Les formes cliniques de la brucellose sont multiples et protéiformes : localisées ou généralisées, peuvent évoluer sur des modes le plus souvent chroniques, plus rarement sur le mode aigu, comme dans l'espèce humaine, mais restent exceptionnelles dans les autres espèces animales. La maladie naturelle a rarement été décrite cliniquement chez les primates non humains (PNH). L'étude de Schlabritz-Loutsevitch (2009) rapporte des avortements ou la mise-bas de morts-nés chez plusieurs femelles babouins. L'infection expérimentale des macaques provoque la formation de granulomes dans plusieurs organes. On note également chez eux une hyperplasie de la rate, et histologiquement une inflammation au niveau du foie, des reins, de la rate, des testicules et des épидидymes.

MÉTHODES DIAGNOSTIQUES

I- Introduction

Depuis février 2006, la brucellose est une MRC chez tous les mammifères, y compris les espèces sauvages (cf. art. D.223-21 du CR). Leur déclaration (à la Direction Départemental de la Protection des Populations - DDPP) est donc obligatoire, mais aucune mesure de police sanitaire applicable n'est actuellement décrite.

Un premier diagnostic épidémio-clinique est possible. Les signes majeurs de suspicion sont l'avortement (quel que soit le stade de gestation) isolé ou en série et chez le mâle l'orchite et (ou) l'épididymite. Mais chez les animaux sauvages et notamment les primates, l'infection demeure en général inapparente. (Ganière 2006)

Le diagnostic de la brucellose chez les primates est donc difficile à établir, de nombreux tests existent chez les animaux de rente mais n'ont pas encore été tous validés chez les primates.

II- Diagnostic direct (OIE 2000)

a- Diagnostic bactériologique

Il est réalisé par examen microscopique avec colorations, ou par culture en milieux sélectifs, permettant une identification de genre et espèce. Les échantillons les plus intéressants pour sa réalisation sont : le placenta, des excréctions vaginales, ou du poumon, foie et contenu gastrique du fœtus.

Principe : Les prélèvements doivent être fixés avec la chaleur ou l'éthanol avant d'être colorés par les méthodes de Stamp, Köster, ou Macchiavello. L'observation d'agrégats intracellulaires permet alors d'émettre une suspicion de brucellose. Mais la morphologie de la bactérie est la même que celle de *Coxiella burnetti*, *Chlamydophila abortus* et des confusions peuvent avoir lieu. Ces bactéries sont résistantes à la décoloration par les acides faibles et apparaissent donc colorées en rouge sur fond bleu par la coloration de Stamp.

Un isolement et une mise en culture de *Brucella* peuvent être réalisées sur milieux solides classiques, qui limitent la formation de mutants « rough » et le développement de

contaminants. Cependant, il est recommandé d'utiliser des milieux liquides pour les échantillons volumineux ou pour pratiquer un enrichissement. Les milieux les plus utilisés sont le « Trypticase-Soy Agar » ou le « Serum Dextrose Agar ».

La culture sur milieu sélectif permet d'éviter la croissance d'autres espèces de bactéries. Le plus utilisé est le milieu de Farrell, qui est préparé par addition de six antibiotiques à un milieu de culture classique. Un enrichissement peut être pratiqué lorsque la culture est réalisée à partir de prélèvements pauvres en bactéries, comme le lait ou le colostrum.

Au bout de trois ou quatre jours d'incubation, des colonies rondes de 1-2 mm de diamètre apparaîtront, bombées, transparentes, de couleur miel, lisses, luisantes, et à contours réguliers. Ces colonies deviennent avec le temps plus grosses et plus foncées. L'identification d'espèce et le biotypage peuvent être réalisés grâce à des techniques de phago-lyse et sur culture bactérienne, à partir de critères biochimiques et sérologiques.

Avantage : - La reproductibilité du test est très bonne.

- La culture permet l'identification de l'espèce en cause.
- Cela permet la détermination de la sensibilité aux antibiotiques.

Inconvénient : - La spécificité de l'identification est rendue difficile du fait de conditions de croissance très voisines pour *Bordetella bronchiseptica* et *Brucella*. (CNRS 2009)

- Méthode longue de quelques jours à quelques semaines.

b- Diagnostic par PCR (Polymerase Chain Reaction)

Une technique de PCR mise au point permet également la détection et l'identification de *Brucella*, et plusieurs techniques moléculaires, comme la PCR, la RFLP, et le Southern Blot permettent de différencier les espèces de *Brucella* et certains de leurs biovars.

Plusieurs études récentes ont montré l'intérêt de la PCR. En effet, cette technique semble être simple, très sensible, spécifique et relativement bon marché, ce qui permet d'en faire un test de routine. La PCR permet d'établir le diagnostic de brucellose aiguë plus précocement que lors de l'utilisation des tests conventionnels et est capable de détecter chez l'homme les patients dont les traitements ont échoué. On peut ainsi détecter des rechutes éventuelles alors que la mise en culture ou les tests sérologiques sont inefficaces. La PCR semble avoir un grand intérêt pour le suivi post-traitement. (Mitka 2007 et Hinie 2009).

III- Diagnostic indirect (OIE 2000)

a-Diagnostic sérologique

Le diagnostic et le dépistage sérologiques sont très utilisés, sur sérum ou lait. Les anticorps détectés sont ceux dirigés contre les épitopes du LPS, ce qui entraîne des problèmes de parenté entre *Brucella abortus* et d'autres bactéries. En effet, lorsque la prévalence est faible, la valeur prédictive de ces tests diminue car beaucoup de faux positifs apparaissent, notamment à cause d'une réaction croisée avec *Yersinia enterocolitica* (Kittelberger 1997). De plus, l'intensité et la durée de la réponse humorale sont très variables en fonction des individus et des doses infectieuses, avec aussi des variations qualitatives.

La réalisation de ces tests doit suivre les standards internationaux définis par l'Office International des Epizooties, et les réactifs utilisés doivent avoir été produits en respectant les standards décrits. Ainsi, pour la production d'antigènes de diagnostic, seules les souches S99 (Weybridge) ou 1119-3 de *Brucella abortus* peuvent être utilisées. Ces souches doivent être complètement « smooth » et ne doivent pas agglutiner en milieu salin. Elles doivent provenir de cultures pures et se montrer conformes aux caractéristiques de *Brucella abortus* biovar 1 d'indépendance vis-à-vis du CO₂.

*** Epreuve à l'antigène tamponné (EAT) = Test Rose Bengale**

Principe : l'antigène utilisé est une suspension de *Brucella abortus* (souche 99 de Weybridge) inactivée par la chaleur et le phénol (0,5%), diluée en tampon acide puis colorée par le Rose Bengale. Il doit être conservé entre 2 et 8°C, à l'obscurité, et ne doit surtout pas être congelé. Selon les normes de l'Office International des Epizooties, l'antigène pour le test au Rose Bengale est préparé en récupérant par centrifugation des souches 99 de *Brucella abortus* tuées, et en les remettant en suspension dans du phénol salin. Pour chaque 35 mL de cette suspension, on rajoute 1 mL de Rose Bengale à 1 % dans de l'eau distillée ; et le mélange est agité pendant deux heures à température ambiante. Le mélange est ensuite filtré et centrifugé pour recueillir les cellules colorées, remises en suspension au taux de 1g de cellules pour 7 mL de diluant (hydroxyde sodique, phénol, acide lactique). La couleur de cette suspension doit être rose intense, et le surnageant doit être sans colorant. La suspension est de nouveau filtrée à plusieurs reprises, puis conservée à l'obscurité et au frais.

L'antigène et le sérum à analyser sont mélangés à volumes égaux, et après 4 minutes de contact, la présence d'anticorps se traduit par la formation d'agglutinats visibles à l'œil nu. Si il n'y a pas d'anticorps spécifiques, le mélange reste homogène.

Le mode opératoire est le suivant :

- Placer l'antigène et les sérums à température ambiante (18-23°C), 30 à 60 minutes avant le début du test
- Sur une plaque, déposer 30 µL de chacun des sérums à tester
- Agiter doucement le flacon d'antigène
- Déposer 30 µL d'antigène coloré à côté de chacun des sérums
- Mélanger soigneusement l'antigène et le sérum
- Agiter la plaque pendant quatre minutes exactement et lire immédiatement

Il est préférable d'avoir un témoin positif (sérum infecté) et un témoin négatif.

Pour l'interprétation, une absence d'agglutination signifie qu'il n'y a pas d'anticorps dans le sérum, tandis que l'existence d'une agglutination, aussi minime soit elle, signale la présence d'anticorps anti-*Brucella*.

Avantages : - Ce test permet le diagnostic sérologique des brucelloses (*B. melitensis*, *suis*, *abortus*) sur lame, en milieu acide tamponné (pH 3,65 ±0,05). Le tampon acide permet d'augmenter la spécificité car l'activité agglutinante des immunoglobulines G augmente en pH acide.

- C'est une des méthodes les plus faciles à mettre en oeuvre et la plus largement utilisée pour la mise en évidence des anticorps brucelliques dans les sérums.

- Simple et rapide, ce test est donc surtout utilisé en dépistage. Une fixation du complément ou une ELISA sont ensuite nécessaires pour confirmer les positifs ou douteux.

Inconvénients : - Ce test est très sensible, en particulier chez les animaux vaccinés. En effet, le vaccin peut provoquer une forte réponse en anticorps, et interférer alors avec les tests sérologiques. Des faux négatifs peuvent apparaître, et seront détectés en renouvelant le test à au moins trois mois d'intervalle.

*** Epreuve de l'anneau sur le lait = Ring Test**

Principe : C'est une réaction d'agglutination qualitative obtenue par interaction des anticorps contenus dans le lait dirigés contre le LPS bactérien avec un antigène coloré par

l'hématoxyline. Les agglutinats colorés sont adsorbés sur les globules gras et se regroupent en surface dans l'anneau de crème.

L'antigène utilisé est une suspension de *Brucella abortus* (souche 99 de Weybridge) inactivée par la chaleur et le phénol (0,5%), et colorée à l'hématoxyline. Il doit être conservé entre 2 et 8°C, sans être congelé.

Selon les normes de l'Office International des Epizooties, la production de cet antigène se fait à partir d'une suspension de souches 99 de *Brucella abortus* tuées, centrifugée puis remise en suspension dans une solution d'hématoxyline colorant. Après avoir reposé 30 minutes à température ambiante, le mélange violet est additionné de 940 mL de sulfate d'ammonium aluminium à 10%. La solution doit être gardée à température ambiante pendant 45-90 jours. Avant utilisation, la solution est mélangée et filtrée. La solution finale a une concentration de un gramme de cellules pour 30 mL de colorant et est conservée 48h à température ambiante. Elle est ensuite re-centrifugée et lavée trois fois, pour avoir un pH de 3.0. Les bactéries sont finalement remises en suspension au taux de 1 gramme pour 27 mL de diluant (phénol, acide citrique, hydrogène-phosphate disodique), et filtrées une dernière fois.

Le mode opératoire est le suivant :

- Placer l'antigène une heure à température ambiante (18-23°C) avant le début des tests
- Agiter avec soin l'antigène au moment de l'emploi
- Homogénéiser les laits à tester par agitation (après les avoir conservés au moins 24h à +4°C), puis les répartir en tubes de 1 mL. La taille de la colonne de lait dans le tube doit être d'au moins 25 mm. Les échantillons de lait ne doivent pas avoir été congelés, chauffés ou violemment remués.
- Ajouter 50 µL d'antigène
- Mélanger soigneusement
- Incuber une heure à l'étuve à 37°C, puis 18 à 20h entre +2 et +8°C
- Effectuer la lecture (une incubation de toute une nuit à 4°C augmente la sensibilité du test et permet une lecture plus facile)

Il est préférable d'avoir comme témoins un lait positif et un lait négatif.

Pour l'interprétation, si l'anneau de crème est moins coloré que le lait sous jacent, cela signifie qu'il n'y a pas d'anticorps, tandis que si l'anneau de crème est plus ou autant coloré que le lait sous jacent, des anticorps doivent être présents. Une réaction fortement positive est indiquée par la formation d'un anneau bleu/violet au dessus d'une colonne de lait, mais tout dépôt bleu à l'interface entre le lait et la crème doit être considéré comme positif car il peut

être révélateur, surtout dans les gros troupeaux. Un lait individuel est considéré comme positif à partir de la dilution au 1/8.

Avantages : - Ce test est très sensible.

Inconvénients : - Difficulté voire impossibilité de prélever du lait sur un primate.

- Nécessité d'avoir un lait positif et un lait négatif.
- Test non adapté pour les primates, fait pour les animaux de rente.

*** Séro-agglutination de Wright**

Principe : C'est une technique d'agglutination lente en tubes. Des dilutions de sérum à titrer sont mises en présence de quantités constantes d'antigènes brucelliques, puis ces dilutions sont mises à incuber une nuit à 37°C.

Lorsque le sérum est positif, il se forme des complexes antigène/anticorps qui précipitent en formant un culot, tandis que le surnageant devient transparent. Lorsque le sérum est négatif, le mélange réactionnel reste opaque.

Avantages : - Faible coût.

- Faisabilité.

Inconvénients : - Ce test, moyennement sensible et très peu spécifique, n'est pas reconnu comme test de référence par les organismes internationaux.

*** Fixation du Complément**

Principe : Cette technique est très utilisée comme test de confirmation mais elle est compliquée à réaliser, demande un équipement de laboratoire sophistiqué et une équipe bien formée. La fixation du complément peut être réalisée à chaud (37°C pendant 30 minutes) ou à froid (4°C pendant 14-18 heures), avec des caractéristiques légèrement différentes, à adapter à la qualité des sérums testés.

Le protocole est le suivant :

- Des dilutions successives du sérum inactivé sont mises en présence de concentrations constantes d'antigène brucellique ainsi que de complément titré, puis le tout est mis à incuber, au chaud ou au froid.
- Les anticorps éventuellement présents dans le sérum analysé forment des complexes antigène/anticorps, propres à fixer le complément (si il n'y a pas d'anticorps spécifiques, le complément reste libre).
- La présence de complément libre est mise en évidence par addition d'un complexe hémolytique : globules rouges de mouton + sérum hémolytique correspondant.

Si des anticorps spécifiques de *Brucella abortus* sont présents, il y a absence d'hémolyse, tandis qu'en l'absence de ces anticorps, une hémolyse se produit.

Il est indispensable de mettre en place différents témoins pour pouvoir interpréter les réactions: un témoin sérum, un témoin antigène, un témoin complément et un témoin globules rouges. L'interprétation des résultats est standardisée : il existe un système d'unité pour la lecture, basé sur le sérum standard de l'Office International des Epizooties, qui contient 1000 ICFTU (International Complement Fixation Test Units) par millilitre. Chaque laboratoire pratiquant ce test doit donc être agréé pour que ses résultats soient interprétables suivant les normes internationales. Ainsi, les sérums donnant un titre équivalent à 20 ICFTU/mL ou plus sont considérés comme positifs.

Avantages : - Sa forte spécificité et sensibilité.

Inconvénients : - Test difficile à mettre en œuvre.

*** Epreuve de l'antigène BPA (Buffered Plate Agglutination)**

Principe : C'est une méthode rapide et facile, utilisant un principe d'agglutination rapide sur lame en milieu acide tamponné (pH 3,7), ce qui permet d'éliminer les agglutinations non spécifiques. Les colorants utilisés sont le cristal violet et le vert brillant. Le sérum est mélangé avec l'antigène, puis la plaque est agitée, avant d'être incubée quatre minutes dans une chambre humide à température ambiante, et ceci deux fois de suite. Ressortie finalement, elle est agitée encore une fois avant d'effectuer la lecture. Lorsque l'antigène coloré en bleu est mis en présence de sérums contenant des anticorps spécifiques, il se forme alors des agglutinats visibles à l'oeil nu.

Avantages : - Test très sensible.

Inconvénients : - Les positifs doivent être confirmés par un test plus spécifique.

* **ELISA (Enzyme Liked Immuno Sorbent Assay)**

Principe : Pour la réalisation de ce test, le LPS de *Brucella* est fourni fixé sur les parois des puits des microplaques en polypropylène. Les sérums ou laits à tester sont dilués et mis à incuber dans les puits. Si il y a des anticorps spécifiques, il se forme alors des complexes LPS/anticorps fixés sur les parois du puits. Après lavage, une immunoglobuline anti-anticorps couplée à une enzyme est mise à incuber, et ce conjugué se fixe sur l'immun complexe. Après un deuxième lavage, le substrat de l'enzyme (TMB) est ajouté dans les puits. Si l'immun complexe est présent, l'enzyme assure la transformation du substrat en un composé bleu, devenant jaune après blocage. L'intensité de la coloration mesure le taux d'anticorps présents dans l'échantillon. Le seuil de positivité est fixé à partir d'un échantillon de contrôle positif à introduire sur chaque microplaque.

Avantages : - L'ELISA de compétition est très spécifique et évite la plupart des réactions dues aux anticorps vaccinaux. Utilisable pour la confirmation sur les animaux vaccinés.

Inconvénients : - L'ELISA indirecte est un test très sensible mais il ne permet pas toujours de différencier les animaux infectés des vaccinés et est donc plutôt utilisé en dépistage.

* **Fluorescence Polarisation Assay**

Principe : Le mécanisme de ce test est basé sur la rotation aléatoire des molécules en solution. La taille des molécules étant le principal facteur influençant le taux de rotation, qui y est inversement proportionnel, une petite molécule tourne plus vite qu'une grosse. Si une molécule est marquée avec un fluorochrome, le temps de rotation pour faire un angle de $68,5^\circ$ peut être déterminé en mesurant l'intensité de la lumière polarisée dans des plans horizontaux et verticaux. Une grosse molécule émet ainsi plus de lumière dans un plan simple (plus polarisée) qu'une petite molécule, qui tourne plus vite et qui émet plus de lumière dépolarisée.

Avantages : - C'est une technique simple et rapide de mesure d'interaction antigène/anticorps, qui peut être pratiquée aussi bien en laboratoire que sur le terrain. Elle est recommandée comme test de référence dans le cadre du commerce international.

Inconvénients : - L'interprétation des résultats n'a pas encore été standardisée.

Test	Sensibilité	Spécificité	Immuno-globulines détectées	Distinction vaccinés/malades	Coût	Faisabilité
EAT	+++ selon situation épidémiologique	+++	IgM IgG1 IgG2	NON	Faible	Facile : peut se faire sur le terrain
Ring Test	+++ selon la taille du troupeau	++	IgG	OUI généralement	Faible	Assez facile, mais nécessite une étuve
Séro-agglutination de Wright	++	+	IgG2	NON	Faible	Facile
FC	+++	++++	IgG1 IgG2	NON	Elevé	Complicé et nécessite matériel de pointe
BPA	+++	+++	IgG	NON	Faible	Plus compliqué que EAT pour résultats équivalents
ELISA indirecte	++++	+++	IgG1 IgG2	NON	Elevé	Difficile
ELISA de compétition	+++	++++	IgG1 IgG2	OUI	Elevé	Difficile
FPA	+++	++++		OUI	Moyen	Facile, faisable sur le terrain, mais nécessite matériel spécifique

Tableau 1 : Comparaison des différentes méthodes de diagnostic de la Brucellose.

En conclusion, selon les recommandations de l'Office International des Epizooties, le test Rose Bengale, le BPAT (Buffered Plate Agglutination Test), l'ELISA et le test en lumière polarisée sont des bons tests de dépistage. Mais les positifs doivent toujours être confirmés en

raison de leur manque de spécificité. Le test de séro-agglutination est considéré comme non satisfaisant pour des fins de commercialisation. Le test de fixation du complément est plus spécifique et a un système standardisé d'interprétation quantitative. Les performances de l'ELISA et du test en lumière polarisée sont quand à elles comparables ou meilleures que celles du test de fixation du complément, et comme ils sont plus simple techniquement, ils devraient être utilisés en priorité.

b- Intradermo-réaction à la brucelline

Principe : Elle est utilisable dans les situations où des réactions sérologiques positives sont soupçonnées d'être faussement positives, en complément de considérations épidémiologiques sur l'absence de risque d'infection du cheptel.

Le dépistage allergique consiste en la mise en évidence de l'immunité cellulaire. C'est une intradermo-réaction à la brucelline. La réaction est considérée positive lorsque l'épaississement du pli cutané, constaté 72h après l'injection, est supérieur à deux millimètres. Cette réaction est spécifique mais peu sensible (beaucoup de faux négatifs). C'est une réaction d'hypersensibilité retardée suite à l'injection dans le derme de *Brucella*. Elle est peu utilisée en routine, avec une bonne spécificité mais une sensibilité moyenne. Chez les PNH, les intradermo-réaction se font à la paupière le plus souvent.

Avantages : - Bon test complémentaire des approches sérologiques.

Inconvénients : - Cette méthode n'est plus utilisable sur les animaux vaccinés.

- C'est un moyen de dépistage des troupeaux infectés (et non des animaux infectés), car il y a beaucoup de faux négatifs donc peu adapté chez les primates.

RÉGLEMENTATION SANITAIRE

La brucellose est une maladie infectieuse, contagieuse, commune à de nombreuses espèces animales et à l'Homme. C'est une zoonose majeure ayant des conséquences économiques importantes en élevage.

En France, agent de niveau de danger 3 : le groupe 3 comprend les agents biologiques pouvant provoquer une maladie grave chez l'homme et constituer un danger sérieux pour les travailleurs ; leur propagation dans la collectivité est possible, mais il existe généralement une prophylaxie ou un traitement efficaces. Art R231-61-1 du Code du Travail.

La directive 2000/54/CE indique également que « les activités comportant la manipulation d'un agent biologique doivent être exécutées [...] uniquement dans des zones de travail correspondant au moins au niveau de confinement numéro 3, pour un agent biologique du groupe 3 ».

Ainsi la réglementation française et européenne exige que toute manipulation des espèces de *Brucella* nécessite un niveau de confinement numéro 3.

A ce titre, la brucellose est une maladie animale réglementée en France en tant que **maladie réputée contagieuse** pour toute forme de brucellose animale chez toute espèce de mammifère domestique ou sauvage infectée par toute bactérie du genre *Brucella* autre que *B. ovis* depuis février 2006 (cf. art. D.223-21 du CR). Leur déclaration à la DDPP est donc obligatoire, mais aucune mesure de police sanitaire applicable n'est actuellement définie. Elle est également inscrite sur la liste B de l'OIE.

Laboratoire : La plupart des laboratoires départementaux sont agréés pour le diagnostic bactériologique et sérologique de la brucellose.

Le laboratoire national de référence mais également laboratoire de référence de l'Office International des Epizooties (OIE) est l'**AFSSA-Maisons-Alfort** (Kaandorp 2004).

AFSSA Maisons-Alfort

Laboratoire d'études et de recherches en pathologie animale et zoonoses

23, avenue du Général de Gaulle

94706 MAISONS-ALFORT Cedex

Tél. : 01 49 77 13 00

Il propose comme tests chez toutes les espèces :

- recherche de *Brucella spp.* autre que *B. ovis* par culture et/ou par PCR
- identification et typage de *Brucella spp.*
- recherche sérologique de brucellose par agglutination lente en tube
- recherche sérologique de brucellose par épreuve à l'antigène tamponné (EAT-Rose

Bengale)

- recherche sérologique de brucellose par fixation du complément.

Les recherches par méthodes ELISA ou Ring-test sont uniquement proposées chez les bovins.

Aux USA, la réglementation actuelle recommande d'utiliser des pratiques et des équipements de biosécurité de niveau 2 pour toutes les activités de routine. Le niveau 3 de biosécurité est requis pour les activités impliquant la manipulation de matériaux contenant ou suspecté de contenir *Brucella sp.*

PROPHYLAXIE ET TRAITEMENT

I- Prophylaxie

a) Prophylaxie médicale

Il existe actuellement plusieurs vaccins pour les bovins mais aucun pour les espèces sauvages telles que les espèces de primates.

b) Prophylaxie sanitaire

Aucune mesure de police sanitaire n'est définie réglementairement pour la brucellose de la faune sauvage. La gestion de la prévention et des suspicions de brucellose dans la faune sauvage pourrait se faire sur la base de recommandations établies à partir de celles faites aux troupeaux de bovins, d'ovins et de caprins :

- la déclaration de la maladie est obligatoire. C'est une maladie professionnelle, on doit donc respecter impérativement les règles d'hygiène et de sécurité et notamment pour les personnels de laboratoire ou les professionnels au contact de produits biologiques potentiellement infectés (produits lactés, annexes embryonnaires, sang, litières etc..)
- prendre des précautions à titre individuel port de gants et port de masques (être prudent avec la formation d'aérosols), hygiène de l'alimentation.
- en cas d'avortement, isolement de la femelle, désinfection des locaux et destruction des annexes embryonnaires et du fœtus.

II- Traitement

On emploie une association de tétracycline et de streptomycine :

- tétracycline à 20 mg/ kg pendant 1 mois
- streptomycine à 20 mg/kg pendant 7 jours (Kandoorp 2004).

Cependant, le traitement est déconseillé chez les animaux à cause du risque de portage et de contamination humaine.

LA FIÈVRE CHARBONNEUSE

La fièvre charbonneuse ou charbon bactérien, due à *Bacillus anthracis*, est une maladie universellement répandue, affectant de nombreuses espèces animales, mais surtout les mammifères herbivores, et transmissible à l'Homme. (Toma 2006)

PRÉSENTATION DE L'AGENT

I- Classification

Phylum : *Firmicutes*

Classe : *Bacilli*

Ordre : *Bacillales*

Famille : *Bacillaceae*

Genres : *Bacillus*

Espèce : *Bacillus anthracis*

Bacillus anthracis est apparenté à *Bacillus cereus*, à *Bacillus mycoides*, à *Bacillus pseudomycoides*, à *Bacillus thuringiensis* et à *Bacillus weihenstephanensis*. Ces six espèces présentent de fortes similitudes génétiques (homologies ADN - ADN, homologies des séquences des ARNr 16S et 23S, homologies des séquences de l'espace intergénique ADNr 16S-ADNr 23S) et elles sont souvent réunies au sein d'un unique groupe appelé le "groupe *Bacillus cereus*" (Euzéby 2009).

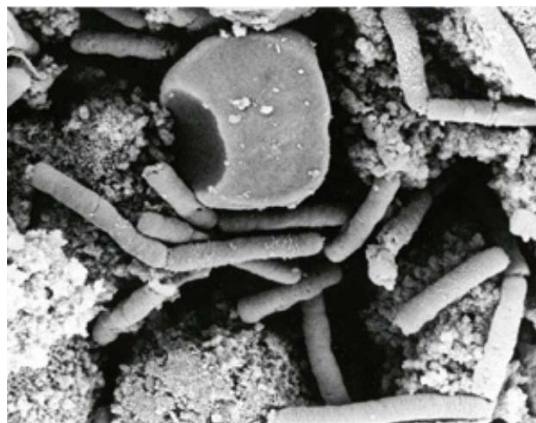


Illustration 2 : *Bacillus anthracis* en microscopie électronique (Wikipédia 2010).

II- Principaux caractères bactériologiques

Bacillus anthracis est un bacille à Gram positif, aux extrémités carrées, de 1,0 à 1,2 µm de diamètre sur 3 à 5 µm de longueur, immobile, sporulé, capsulé, synthétisant une couche S. Dans les produits pathologiques, *Bacillus anthracis* se présente sous forme isolée ou en courtes chaînes mais, en culture, il forme fréquemment des chaînes plus longues qui lui confèrent un aspect en "tiges de bambou". *Bacillus anthracis* est nitrate réductase positive, uréase négative, produit de l'acétyl-méthyl-carbinol (VP+) qui est un caractère utilisé pour la classification des *Bacillus*, il acidifie le glucose mais ni le mannitol ni le xylose, il liquéfie très lentement la gélatine et ses activités lécithinasiqye et phosphatasique sont nulles ou faibles.

Bacillus anthracis est aéro-anaérobie et il pousse en 24 heures sur les milieux ordinaires, incubés sous atmosphère normale, en donnant des colonies de 3 à 5 mm de diamètre qui ont un aspect R, "en tête de méduse". Sur gélose au sang, le germe apparaît non hémolytique en 24 heures mais, en prolongeant l'incubation, il se développe une légère zone d'hémolyse incomplète. Après culture sur des géloses enrichies en sérum et/ou en bicarbonate et incubées à 37 °C dans une atmosphère contenant 5 p. cent de CO₂, le bacille synthétise sa capsule et les colonies ont un aspect lisse et brillant.

La spore, ovoïde et non déformante, occupe une position centrale. Elle survit dans le sol durant de longues périodes (la survie des spores est de l'ordre d'une centaine d'années mais, des spores dont l'âge a été estimé à 200 ans ont permis l'obtention de la forme végétative). Les spores sont très résistantes aux conditions défavorables du milieu (température, dessiccation).

La thermorésistance de la spore explique la présence de *Bacillus* comme contaminants de produits supposés stériles. La persistance dans le sol est favorisée par un pH neutre ou légèrement alcalin (pH compris entre 6 et 8,5). Cette résistance explique la persistance de la maladie dans certaines régions ("champs maudits") ou sa résurgence lorsque des spores enfouies remontent à la surface à la faveur de grands travaux (drainage, construction de routes, ...). La sporulation nécessite une température comprise entre 15 et 42 °C, une atmosphère humide et la présence d'oxygène. Ce dernier impératif conduit à interdire l'autopsie des animaux morts de charbon (sauf dans des locaux spécialement équipés) et à

obturer les orifices naturels des cadavres afin d'éviter l'exposition des bacilles à l'oxygène de l'air, la sporulation et la dissémination des spores. Par contre, en l'absence d'ouverture du cadavre, les germes de putréfaction provoquent une anaérobiose inhibant toute sporulation et conduisant à la mort des bactéries. Ainsi, expérimentalement, il n'est plus possible d'isoler *Bacillus anthracis* d'un cadavre 5 jours après la mort (Euzéby 2009).

III- Pathogénie

Selon le mode de contamination, le charbon peut être interne (ingestion ou inhalation de spores) ou externe (inoculation des spores au travers de la peau et des muqueuses). Le charbon interne est une maladie redoutable et d'évolution rapide. Le pouvoir pathogène de *Bacillus anthracis* repose principalement sur la présence d'une capsule et sur la synthèse de toxines.

La capsule formée d'un polymère d'acide D-glutamique, caractérise les souches virulentes car elle s'oppose à la phagocytose. Elle est produite *in vivo* ou *in vitro* dans des conditions de culture particulière. La synthèse de la capsule est gouvernée par un plasmide de 60 méga-daltons (plasmide pXO2) et les enzymes de synthèse sont codées par les gènes *cap* (*capB*, *capC*, *capA*) et *dep*.

La toxine protéique, codée par un plasmide de 110 méga-daltons (plasmide pXO1), est formée de trois protéines :

- le facteur I ou oedématogène ou EF (Edema Factor) codé par le gène *lef*
- le facteur II ou antigène protecteur ou PA (Protective Antigen) codé par le gène *pag*
- le facteur III ou létal LF (Létal Factor) codé par gène *cya*.

Chacun de ces facteurs, injecté séparément à un animal, est dépourvu d'activité. Une activité toxique nécessite l'injection combinée du facteur I et du facteur II ou l'injection simultanée du facteur III et du facteur II.

Le facteur II suscite l'élaboration d'anticorps protecteurs. Lorsque le facteur II est neutralisé par les anticorps, les facteurs I et II demeurent inoffensifs. Le facteur II est responsable de la fixation sur les membranes cellulaires en s'associant sur un récepteur ubiquiste de nature protéique, étape indispensable à l'activité toxique.

Le facteur I possède une activité adénylcyclase qui ne s'exprime qu'en présence de calmoduline (protéine eucaryote). Cette association permet de transformer l'ATP en AMPc.

Le facteur III possède deux activités, une activité cytotoxique pour les macrophages et une activité permettant d'induire la libération de TNFa et d'IL-1 par les macrophages. (Euzéby 2009 et Little 1999).

DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES

I- Répartition géographique

Il s'agit d'une maladie cosmopolite avec des régions de fréquence enzootique ou sporadique. Il existe des régions où la fréquence de la maladie est importante (Haïti, dans les régions de l'ex-URSS). On la trouve aussi en Afrique (Sénégal, Niger, Côte d'Ivoire, Guinée, Tchad, Mali). (CNRS 2009)

Dans les pays industrialisés, on a pu contrôler le charbon animal, il ne se déclare qu'occasionnellement chez l'homme. Certains cas peuvent être imputés à l'importation de produits d'origine animale contaminés. On retrouve la fièvre charbonneuse humaine le plus souvent dans les pays en voie de développement où elle est enzootique, chez les personnes qui s'occupent du bétail, mangent de la viande et des abats d'animaux infectés insuffisamment cuits ou travaillent dans des entreprises où l'on utilise la laine et les peaux d'animaux. La fréquence des cas de charbon humain dans les pays en voie de développement est mal connue car les personnes atteintes ne consultent pas toujours, et les médecins ne déclarent pas systématiquement les cas.

D'après les informations recueillies ces dernières années, les foyers épidémiques continuent à se déclarer malgré l'existence de moyens de prévention efficaces de la fièvre charbonneuse animale et donc humaine. Il y a des régions hyperendémiques, comme on l'a vu en Haïti quand une Américaine contracta la maladie après avoir acheté des tambours en peau de chèvre.

Le charbon est fréquent chez les animaux dans les régions où des programmes de prophylaxie n'ont pas été mis en place.

Dans les régions hyperenzootiques de l'Est du Nigéria, des animaux abattus en urgence ont été soumis à des examens. L'inspection ante-mortem des animaux n'existe pas dans cette région, ce qui accroît le risque de contamination humaine. Les tests ont démontré un certain nombre d'animaux positifs. Certains foyers et cas sporadiques ont été détectés dans des pays industrialisés comme les Etats-Unis. En Afrique, les réserves d'animaux sauvages subissent périodiquement de lourdes pertes notamment parmi les herbivores. Dans une thèse présentée à l'Université de Nairobi (Kenya), il a été estimé que le charbon était responsable chaque année d'environ 11% de la mortalité au sein de la population animale. Dans le parc national d'Etosha en Namibie, le charbon a causé la mort de plus de 1635 animaux sauvages,

appartenant à 10 espèces différentes, soit 54% de la mortalité totale entre janvier 1966 et juin 1974. Les étangs artificiels étaient la source de l'infection. Un autre foyer s'est déclaré en 1987 dans une réserve de Zambie. (Acha 2005)

De plus, il a été démontré que des rapaces nourris de cadavres d'animaux morts de fièvre charbonneuse éliminent les spores correspondantes durant 4 jours au moins dans leurs excréments et les transportent sur leurs serres. Ce délai est bien suffisant pour une espèce migratrice pour parcourir plus de 2500 km. (Terrier 2010).

II- Espèces sensibles

Tous les mammifères et tous les oiseaux sont sensibles. Toutefois, les herbivores sont les plus exposés, en particulier les ruminants et les équidés.

Les espèces sauvages suivantes peuvent être touchées :

- cervidés : Daims, Cerfs, Elans, Chevreuils, Cerf de Virginie,
- bovidés : Buffles, Bisons, diverses antilopes (Springbocks, Impalas, Koudous, Hippotragues, Gnous, ...),
- camélidés : Lamas, Alpagas, Dromadaires,
- autres grands animaux : Hippopotames, Rhinocéros, Eléphants, Girafes, Zèbres,
- suidés : Sangliers, Phacochères, Potamochères ; les suidés paraissent moins sensibles et pourraient peut être jouer le rôle de porteurs temporaires ;
- lagomorphes : Lièvres,
- carnivores : Renards, Blaireaux, Visons, Putois, Genettes, Civettes, Lynx, Lions, Guépards, Léopards, Hyènes, Chacals, Dingos, Lycaons, Ratons laveurs ; les carnivores semblent aussi plus résistants que les herbivores.
- primates : Babouins, Chimpanzés, Macaques,
- oiseaux (cas exceptionnels) : autruches, canards et oies sensibles, aigles, moineaux domestiques.
- l'Homme. (Terrier 2010)

III- Transmission

a- Les sources de contamination

Il existe plusieurs sources de contamination :

- les animaux contaminés : ils excrètent des bacilles lors des phases septicémiques
- les produits d'origine animale contaminés
- les eaux et la nourriture contaminées
- le sous-sol (« champs maudits »)

Les sols représentent le réservoir de l'infection. L'évolution des spores est matière à controverse. L'existence d'un cycle de germination suivi d'une reprise de la sporulation n'a pas encore été prouvée. En conditions de laboratoire, il semble que le cycle de vie des spores soit extrêmement long mais dans les conditions naturelles la survie des spores serait plutôt limitée à quelques années. (Acha 2005)

b- Modes de transmission

Les animaux contractent surtout la maladie en ingérant de l'herbe ou de l'eau contaminée par des spores de *Bacillus anthracis*, particulièrement dans les endroits proches des carcasses charbonneuses. Un animal qui meurt du charbon produit une quantité énorme de *B. anthracis* dans ses tissus et si la carcasse est ouverte, les bacilles produisent des spores qui contaminent le sol, l'herbe et l'eau. Les animaux pâturent l'endroit, se contaminent et créent un nouveau foyer d'infection. Les animaux et les oiseaux charognards peuvent disséminer l'infection au loin. (Acha 2005)

En résumé, les différents modes de transmission possible sont :

- par blessure
- par contact cutané ou muqueux avec un produit contaminé
- par des vecteurs (principalement mouches), mais ceci n'a qu'une importance mineure (Acha 2005)
- par inhalation de poussières contaminées
- par ingestion de denrées infectées.

EXPRESSION CLINIQUE

Le charbon se présente généralement sous la forme d'une maladie aiguë, septicémique, évoluant rapidement vers la mort, avec des symptômes généraux, circulatoires, digestifs, urinaires, respiratoires et méningés. La maladie est généralement mortelle pour les animaux qui se contaminent par l'intermédiaire de l'environnement contaminé (nourriture, eau), et à la faveur d'un traumatisme à la fois inoculateur et révélateur de l'exquise sensibilité de l'ectoderme.

Après une incubation d'en général 24 à 48 heures pendant lesquels les animaux cherchent de l'eau, les différentes formes de la maladie sont :

- forme suraiguë ou apoplectique : forme brutale sans fièvre due à une anoxie cérébrale et un œdème pulmonaire (bovins, ovins, caprins), liés à la libération massive de toxine dans le flux sanguin à partir du foyer primaire de multiplication dans la rate. La mort survient en moins de 12 heures.

- forme aiguë : on observe une hyperthermie, une dépression, une boiterie, une dyspnée ou des coliques avant la mort. On note des écoulements de sang incoagulable par les orifices naturels (ruminants, équidés). La mort survient en 1 à 3 jours. (CNRS 2009)

- forme externe ou « charbon à tumeur » : s'observe chez les suidés et les carnivores et parfois chez les herbivores (elles sont toutefois exceptionnelles chez les ovins). Elles consistent dans le développement d'une masse œdémateuse (la tumeur charbonneuse), localisée autour des nœuds lymphatiques superficiels drainant le point d'inoculation des spores. On observe un œdème du pharynx et de la langue avec une dyspnée, des écoulements hémorragiques par la bouche et une mort par asphyxie (porcs, carnivores). C'est lors de cette forme que l'on peut observer l'anthrax, masse inflammatoire ganglionnaire appelée tumeur charbonneuse. L'œdème s'étend aux régions adjacentes, une septicémie apparaît en 12 à 48 heures et l'infection évolue vers un charbon interne. La mort survient en 4 à 5 jours.

Les lésions, pratiquement identiques chez toutes les espèces, sont caractéristiques :

- sang noirâtre, épais et incoagulable ;
- splénomégalie importante avec une pulpe de consistance boueuse ;
- hémorragies vésicales et rénales ;

- congestion et parfois hémorragies intestinales ;
- tumeur charbonneuse interne ou externe.

De plus, le cadavre ne présente pas une rigidité complète et il se décompose très rapidement (Euzéby 2009).

MÉTHODES DIAGNOSTIQUES

Lors d'une suspicion de charbon, il ne faut pas autopsier ou ouvrir les animaux sur place, car cela permettrait une re-contamination du sol, mais emporter le cadavre dans un sac totalement étanche jusqu'à l'équarrissage, où les prélèvements adéquats seront pris pour la confirmation de la maladie. Toutefois, il est maintenant redonné des autorisations d'autopsies dans les champs, à condition que le(s) ouverture(s), pour les prélèvements, soient petites et recousues, pour permettre un prélèvement plus rapide après la mort de l'animal. Le diagnostic expérimental doit être effectué le plus rapidement possible (dans les 24 heures suivant la mort) car la présence d'un grand nombre de germes de putréfaction rend difficile, voire même impossible, l'isolement de *Bacillus anthracis*.

I- Identification de l'agent pathogène

La mise en évidence de la bactérie *Bacillus anthracis* encapsulée sur des frottis de sang ou de tissus (rate, poumons...) provenant de cadavres frais ainsi que la culture de la bactérie sur gélose au sang sont relativement faciles et à la portée de la plupart des laboratoires de bactériologie. La difficulté peut se présenter sur des sujets ayant reçu des antibiotiques.

L'isolement de *B. anthracis* à partir d'un cadavre putréfié ou de prélèvements traités est aussi souvent difficile et réclame un travail laborieux.

a- Culture et identification de *Bacillus anthracis* (OIE 2010 et Euzéby 2009)

i) Prélèvement frais

Bacillus anthracis se multiplie sur la plupart des géloses nutritives, bien que la gélose avec 5-7 % de sang de cheval ou de sang de mouton soit le milieu de choix. Le sang est le premier prélèvement à examiner. Du sang ou autre liquide organique, ou bien un prélèvement issu d'une incision d'un tissu ou d'un organe, est étalé à la surface d'une gélose au sang. Après une incubation d'une nuit à 37 °C, les colonies de *B. anthracis* apparaissent de couleur blanc-gris à gris, de 0,3-0,5 mm de diamètre, non hémolytiques, de surface humide rugueuse (aspect

de verre pilé) et très collantes lorsqu'on les touche avec une anse de platine. Des prolongements et excroissances de culture rampant en retour vers la colonie parentale, tous dans le même sens, sont parfois constatés. Cette caractéristique a été décrite comme un aspect en « tête de Méduse ». La confirmation de *B. anthracis* peut être obtenue par la mise en évidence sur gélose au sang, de bâtonnets Gram positif, capsulés et formant une spore. L'absence de mobilité peut être recherchée en test complémentaire.

La sensibilité de *B. anthracis* au bactériophage gamma fut décrite par Brown & Cherry en 1955. Le phage peut être obtenu auprès de divers laboratoires centraux vétérinaires et autres laboratoires de référence de la Fièvre charbonneuse. La méthode consiste simplement, à étaler sous la forme d'une bande, à la surface d'une gélose au sang ou sur une portion de la plaque (plusieurs tests peuvent être réalisés sur la même plaque), le germe suspect, et, à déposer une goutte de 10-15 µl de la suspension de phage d'un côté de la bande ainsi qu'un disque de 10 unités de pénicilline sur l'autre extrémité. Laisser la goutte de phage pénétrer la gélose et incuber la plaque à 37 °C. Une culture de contrôle doit être incluse ; le vaccin Sterne peut être utilisé dans ce but. Si la culture correspond à *B. anthracis* la zone située sous le phage sera sans croissance bactérienne en rapport avec la lyse, et une zone d'inhibition entourera le disque de pénicilline après une nuit d'incubation.

ii) Mise en évidence de la capsule

Des bactéries de *Bacillus anthracis* se retrouvent dans de nombreux tissus, le sang et autres fluides organiques d'animaux décédés de fièvre charbonneuse. Il existe un risque de confusion avec des clostridies souvent présentes dans le sang et les organes après la mort. La mise en évidence d'une capsule, à l'aide de colorations spéciales, permet de différencier *Bacillus anthracis* des *Clostridium* sp. Les bactéries de *Bacillus anthracis* doivent être recherchées sur des frottis de ces prélèvements qui ont été séchés, fixés et colorés au bleu de méthylène polychrome. La capsule apparaît en rose, tandis que les bacilles se colorent en bleu foncé. Ces derniers sont disposés en paires ou en courtes chaînettes et présentent des extrémités à bout carré. Les colorations de Gram et de Giemsa ne révèlent pas la capsule. La capsule est absente des cultures aérobies de *B. anthracis* sur gélose nutritive ou sur bouillon, mais elle peut être vue lorsque la bactérie virulente est placée pendant quelques heures dans quelques millilitres de sang (le sang défibriné de cheval ou de mouton donne les meilleurs résultats). La culture de *B. anthracis* sur une gélose nutritive additionnée de 0,7% de bicarbonate de sodium et incubée en présence de CO₂ permet de mettre en évidence la

capsule. La gélose nutritive est préparée en dissolvant suffisamment de poudre base pour obtenir 100 ml de gélose, dans 90 ml d'eau. La préparation est autoclavée puis refroidie à 50°C au bain-marie ; 10 ml d'une solution de bicarbonate de sodium à 7 % stérilisée par filtration (filtre de 0,22-0,45 µm) sont ajoutés et mélangés. Le mélange est alors réparti en boîtes de Petri. Les *B. anthracis* encapsulés formeront des colonies mucoïdes et la capsule pourra être visualisée sur de fins frottis ou décalques réalisés sur des lames pour microscope, fixés et colorés au bleu de méthylène polychrome comme précédemment.

iii) Autres prélèvements

L'identification de *B. anthracis* à partir de prélèvements anciens ou décomposés, issus de produits d'origine animale traités ou de l'environnement y compris le sol, est possible, mais ces prélèvements renferment de plus des contaminants qui envahissent les cultures et masquent *B. anthracis* sur les géloses ordinaires, il est alors possible d'avoir recours à un chauffage des échantillons (15 minutes à 62,5 °C) pour éliminer les bactéries non sporulées et à l'utilisation de milieux sélectifs tels que le milieu PLET contenant de la polymyxine B (30 UI/mL), du lysozyme (40 mg/mL), de l'éthylène di-amine tétra-acétique (300 mg/mL) et de l'acétate de thallium (40 mg/mL).

Le recours à l'inoculation de l'animal ne peut être envisagé pour révéler *B. anthracis* que si les autres méthodes ont échoué. Par exemple lorsqu'il apparaît que les prélèvements proviennent d'animaux ayant reçu des antibiotiques avant la mort ou lorsque les échantillons du milieu renferment des substances sporostatiques. En raison du souci légitime d'écarter le recours à l'animal en recherche biologique, cette solution ne doit être retenue que si elle est justifiée. Les souris adultes ou les cobayes sont les animaux de choix. Si les prélèvements concernent le sol, les animaux doivent être traités la veille avec des antisérum du tétanos et des gangrènes gazeuses. Les prélèvements sont préparés comme pour la mise en culture, le choc thermique à 62,5 °C pendant 15 min inclus. L'injection consiste chez la souris en une injection de 0,05 à 0,1 ml en sous-cutanée et chez le cobaye, l'injection peut aller jusqu'à 0,4 ml (0,2 ml dans chaque cuisse) et est réalisé par voie intra-musculaire. La présence de *B. anthracis* entraîne la mort en 48 à 72 h et le germe peut être isolé du sang comme décrit ci-dessus. Cette technique expose à des risques de contamination importants et elle doit être réservée aux laboratoires possédant une animalerie très bien contrôlée.

b- Mise en évidence immunologique et diagnostic

L'identification du germe est facile et seul le diagnostic différentiel *Bacillus anthracis/Bacillus cereus* pose quelques problèmes car ils sont antigéniquement très proches. Les seuls antigènes spécifiques qui permettent de le différencier par l'approche immunologique, sont les antigènes des toxines charbonneuses produites durant la phase de croissance exponentielle, et de la capsule de *B. anthracis*. Ceci est une entrave à l'usage des méthodes immunologiques en diagnostic de routine.

i) La réaction d'Ascoli

En 1911, Ascoli publia une technique pour mettre en évidence un antigène charbonneux thermostable dans les tissus animaux traités pour obtenir des produits dérivés. Cette réaction utilise un antisérum précipitant préparé sur un lapin. Pour effectuer la réaction d'Ascoli, mettre environ 2 g d'échantillon dans 5 ml de sérum physiologique contenant une concentration finale de 1/100 d'acide acétique et faire bouillir l'ensemble pendant 5 min. Refroidir la solution et la passer à travers un papier filtre. Quelques gouttes d'antisérum préparé chez le lapin sont introduites au fond d'un petit tube. Le filtrat précédent est déposé délicatement à la surface de l'antisérum. Une réaction positive se traduit par la formation, à l'interface, d'un anneau de précipitation visible en moins de 15 min. Des témoins d'échantillons positif et négatif sont à inclure.

Cependant cette réaction manque de spécificité car on retrouve ces antigènes chez d'autres *Bacillus spp.* et suppose que seuls *B. anthracis* ait proliféré dans les tissus de l'animal et qu'il y en ait suffisamment pour donner une réaction positive. Ce test semble surtout utilisé en Europe de l'Est et nécessite l'utilisation d'antisérums spécifiques non commercialisés en France. (Euzéby 2009)

ii) Chromatographie

Un test par chromatographie simple, rapide et fortement sensible et spécifique, alternative plus fiable et plus sensible au test d'Ascoli utilisant un anticorps de capture monoclonal détectant l'antigène protecteur spécifique d'anthrax, a maintenant été conçu et étudié pour être utilisé comme diagnostic rapide à faire sur place (Muller 2004). De plus, il permet de ne pas

avoir de faux-positifs avec des animaux récemment vaccinés. Malheureusement, ce test n'est toujours pas commercialisé. (WHO 2008)

iii) Immunofluorescence

Bien que l'immunofluorescence ait été utilisée avec succès dans le cadre de recherche sur la capsule elle n'est pas entrée dans le diagnostic de routine.

c- Confirmation de la virulence par la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR)

La détermination de la séquence nucléotidique des plasmides pXO1 et pXO2 a permis de développer des sondes nucléiques très spécifiques de *Bacillus anthracis* puisqu'elles ne réagissent ni avec *Bacillus cereus* ni avec 31 autres espèces de *Bacillus* sp.

Une confirmation sans appel de la virulence peut donc être obtenue grâce à une PCR. L'extrait d'ADN pour la PCR peut être préparé à partir d'une colonie fraîche obtenue sur gélose nutritive, en mettant en suspension dans 25 µl d'eau stérile dé-ionisée (ou distillée), une anse de culture, puis en chauffant celle-ci à 95 °C pendant 20 min. Après refroidissement autour de 4 °C et une brève centrifugation, le surnageant est prêt pour la PCR.

Les amorces convenables permettant de confirmer la présence des plasmides pXO1 et pXO2 sont données dans le tableau suivant :

Cible	Amorce ID	Séquence 5'-3'	Taille	Concentration
Antigène protecteur PA	PA 5 3048-3029	TCC-TAA-CAC-TAA-CGA-AGT- CG	596 pb	1 mM
	PA 8 2452-2471	GAG-GTA-GAA-GGA-TAT-ACG- GT		
Capsule	1234 1411-1430	CTG-AGC-CAT-TAA-TCG-ATA- TG	846 pb	0,2 mM
	1301 2257-2238	TCC-CAC-TTA-CGT-AAT-CTG-AG		

Tableau 2 : Amorces utilisées pour confirmer la présence des plasmides pXO1 et pXO2 (OIE 2010).

La PCR peut être conduite dans des volumes de 50 µl en utilisant les amorces précédentes et respectivement 200 µM de dATP, de dCTP, de dTTP et dGTP, 1,5 mM de MgCl₂ et 2,5 unités d'ADN polymérase ampli Taq, le tout en tampon NH₄, suivi de l'addition de 5 µl de l'extrait d'ADN. Un gel à 2 % d'agarose peut être efficacement utilisé avec ces petits fragments.

Autre possibilité, des perles « Ready-To-GoTM » sont commercialisées par Pharmacia Biotech². Elles sont chargées en réactifs (à l'exception de l'amorce et de l'acide nucléique), prêtes à l'emploi (réaction sous un volume de 25 µl), déshydratées et stable à température ambiante. L'extrait d'ADN peut être ajouté sous un volume de 2,5 µl.

Le cycle PCR suivant peut être adopté : 1 × 95 °C pendant 5 min ; 30 × 95 °C pendant 30 s suivis de 55 °C pendant 30 s, puis 72 °C pendant 30 s ; 1 × 72 °C pendant 5 min ; et enfin refroidir à 4 °C. Il est à noter que, en usage depuis quelques années dans les laboratoire de référence de la Fièvre charbonneuse, les amorces données dans le tableau ci-dessus ont été satisfaisantes pour confirmer la présence ou l'absence de pXO1 et/ou pXO2 dans les cultures pures d'isolats obtenus de prélèvements d'animaux ou d'échantillons du milieu ambiant. Elles sont inopérantes, néanmoins, pour détecter directement *B. anthracis* dans de tels prélèvements.

En conclusion, l'absence de mobilité, la présence d'une capsule, l'absence d'hémolyse en 24 heures, la sensibilité habituelle à la pénicilline et le pouvoir pathogène expérimental pour le cobaye suffisent, en tenant compte du contexte, à diagnostiquer *Bacillus anthracis*. Cette identification devra, ultérieurement, être confirmée par l'étude d'autres caractères : sensibilité au phage gamma, fermentation des sucres, présence dans la paroi d'un polysaccharide constitué de N-acétyl-D-glucosamine et de D-galactose (Euzéby 2009)

II- Épreuves sérologiques

Historiquement, le diagnostic de la fièvre charbonneuse chez l'animal ne nécessitait pas le recours à la sérologie. Soit l'atteinte de l'animal était déduite de la clinique ou de l'épidémiologie et était traitée en conséquence, soit il était mort. Le développement des réactions sérologiques est né de l'intérêt porté à la recherche de la réponse humorale chez l'homme, et, dans une moindre mesure chez l'animal, pour évaluer les vaccins ainsi que pour

les études épidémiologiques tenant compte des séroconversions naturellement acquises chez l'homme, le bétail et les mammifères sauvages.

La meilleure méthode sérologique, couramment utilisée, est la méthode immuno-enzymatique (ELISA) conduite en plaques de micro-titrage revêtues d'antigène protecteur, composant de la toxine charbonneuse, à raison de 3 à 5 µg/ml dans un tampon carbonate de fixation de pH élevé (9,5). Les antigènes de la toxine se révèlent très spécifiques de *B. anthracis*, mais, malgré cela, ne sont pas commercialisés. Ce qui signifie que la sérologie de la fièvre charbonneuse demeure confinée dans quelques laboratoires spécialisés. Diverses variantes d'ELISA existent et peuvent être trouvées décrites dans les manuels de laboratoire ; elles peuvent toutes être utilisées en sérologie, bien que certains sérums se révèlent plus difficiles à traiter que d'autres. Un conseil utile est de faire appel à du lait en poudre reconstitué comme agent bloquant et d'augmenter sa concentration jusqu'à ce que le contrôle négatif donne des résultats négatifs fiables. (OIE 2000)

III- Épreuve d'hypersensibilité (Anthraxine™)

En Europe Centrale et de l'Est, une épreuve cutanée utilisant l'Anthraxine, d'abord enregistrée dans l'ancienne URSS en 1966, a été largement utilisée pour des diagnostics rétrospectifs de charbon humain et animal ainsi que pour évaluer les vaccins. Il s'agit d'un complexe protéine/polysaccharide/acide nucléique, thermostable, disponible dans le commerce, dérivé du liquide oedémateux produit chez l'animal suite à l'injection de la souche vaccinale STI ou de la souche Zenkowsky de *B. anthracis*. L'épreuve comprend l'injection intradermique de 0,1 ml d'Anthraxine et la recherche, après 24 h, au lieu d'injection, d'une réaction érythémateuse avec induration, persistant au moins 48 h. Cette réaction d'hypersensibilité de type retardé est considérée comme liée à l'immunité à médiation cellulaire du charbon et a été reconnue comme permettant de faire un diagnostic rétrospectif quelques 31 ans après une infection primaire, dans jusqu'à 72 % des cas. Elle a été utilisée avec succès dans une enquête rétrospective suite à une série de cas de charbon apparus en Suisse, dans un atelier textile assurant le mélange de fibres synthétiques avec des poils de chèvres en provenance du Pakistan. La fiabilité diagnostique de l'Anthraxine, comme celle de la réaction d'Ascoli, dépend d'avantage de la nature de la fièvre charbonneuse que de la spécificité des antigènes impliqués (OIE 2000).

IV- Avancées dans les techniques de diagnostic

De nombreuses études s'intéressent de plus en plus depuis quelques années à l'amélioration des techniques de PCR pour aider au diagnostic de *Bacillus anthracis*. L'identification du germe est facile et seul le diagnostic différentiel *Bacillus anthracis*/*Bacillus cereus* pose quelques problèmes. L'utilisation de PCR multiplexe permet par exemple de les différencier génotypiquement en s'appuyant sur les quatre génotypes possible de virulence de *B. anthracis* : pXO1⁺/pXO2⁺, pXO1⁺/pXO2⁻, pXO1⁻/pXO2⁺ ou pXO1⁻/pXO2⁻ (Kim 2005). Un contrôle interne d'amplification (IAC) a été développé pour la détection du gène rpoB en utilisant la technologie TaqMan. Les oligonucléotides synthétiques de l'IAC ont été clonés en utilisant le vecteur pDG1730 pour une intégration ectopique dans l'hôte *Bacillus subtilis*. Ainsi il n'y a pas de réaction croisée et la limite de détection pour la cible et l'ADN de l'IAC correspond à la copie d'un seul gène. Cette méthode de contrôle interne d'amplification devrait permettre de diminuer le taux de faux-positifs et de faux-négatifs rencontrés lors de PCR conventionnelles (Sohni 2008). Une PCR en temps réel utilisant plusieurs sondes moléculaires ayant différents allèles cibles se révèle un bon outil de diagnostic pour détecter et différencier *Bacillus anthracis* d'autres types de *Bacillus*. Si l'on prend comme allèles cibles capA, capB, capC (capsule), lef, pag (toxine) et 16srRNA (gène commun de détection de *Bacillus spp.*), la sensibilité et la spécificité de ce test est de 100% excepté pour la cible 16srRNA dont la spécificité est de 82% (Hadjinicolaou 2009).

Différentes recherches se sont également intéressées à des dispositifs d'analyse par biopuces (ou microarray). Cette biotechnologie récente permet d'analyser le niveau d'expression des gènes (transcrits) dans une cellule, un tissu, un organe, un organisme ou encore un mélange complexe, à un moment donné et dans un état donné par rapport à un échantillon de référence. Son application permet par exemple de détecter et de distinguer sur un même dispositif *Burkholderia pseudomallei* (agent de la mélioïdose), *Bacillus anthracis* et *Francisella tularensis* (agent de la tularémie) dans le sérum de patients malades, d'animaux atteints ou vaccinés. L'immunoréactivité de l'anthrose, sucre constituant spécifique des spores de *Bacillus anthracis* est utilisé comme biomarqueur spécifique de l'anthrax dans une étude de Parthasarathy et al. (2008). Cette méthode a d'ailleurs prouvé son efficacité pour l'identification de *Bacillus anthracis* dans un échantillon environnemental de plusieurs pathogènes sans problème de faux-positifs qui ont pu être observés lors de PCR conventionnelles (Burton 2006).

RÉGLEMENTATION SANITAIRE

En médecine vétérinaire, la fièvre charbonneuse est une **maladie réputée contagieuse à déclaration obligatoire et inscrite sur la liste B de l'OIE**. En médecine humaine, c'est une **maladie professionnelle** (Terrier 2010).

L'identification du germe est possible par les laboratoires départementaux équipés d'un local P3 et ayant une certaine pratique. Leur première identification devra être confirmée par le Laboratoire National de Référence (LNR) :

AFSSA Maisons-Alfort

Laboratoire d'études et de recherches en pathologie animale et zoonoses

23, avenue du Général de Gaulle

94706 MAISONS-ALFORT Cedex

Tél. : 01 49 77 13 00.

La confirmation de la présence de la bactérie se fait par culture puis par PCR selon les méthodes indiquées par l'Office International des Epizooties (OIE).

Les experts et les adresses des laboratoires de références de l'OIE sont :

Dr Belly Golsteyn-Thomas

Canadian Food Inspection Agency, PO Box 640, Township Rd 9-1, Lethbridge,
Alberta T1J 3Z4

CANADA

Tel : (1.403) 382.55.51

Fax : (1.403) 381.12.02

Email : belly.golsteyn-Thomas@inspection.gc.ca

Dr Ginger R. Harvey

National Veterinary Services Laboratories, P.O. Box 844, Ames, IA 50010

ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

Tel : (1.515) 663.75.65

Fax : (1.515) 663.75.69

Email : ginger.r.harvey@aphis.usda.gov

➤ **En cas de suspicion de fièvre charbonneuse :**

- Informer les personnes exposées des risques encourus

- Prendre les précautions nécessaires pour éviter la dissémination de la bactérie:

Orifices naturels bouchés (coton + désinfectant), véhicules étanches, désinfectés...

- Déclarer la suspicion au DDPP

➤ **Si le diagnostic est confirmé :** un arrêté préfectoral de mise sous surveillance peut être demandé.

-mise en interdit des locaux

-isolement et le marquage des malades

-interdiction de hâter la mort de ces animaux par effusion de sang ou de les diriger vers un abattoir

-destruction des cadavres dans un clos d'équarrissage

-traitement des malades et vaccination des contaminés possibles par le vétérinaire sanitaire

Surveillance levée 15 jours après disparition du dernier cas et la désinfection.

➤ Les garanties recommandées par l'EAZA sont une quarantaine de 30 jours pour les animaux importés (Kaandorp 2004).

La réglementation française et européenne classe l'agent de la fièvre charbonneuse dans la catégorie 3 et exige donc que toute manipulation de *Bacillus anthracis* nécessite un niveau de confinement numéro 3.

Aux USA, la réglementation actuelle recommande d'utiliser des pratiques et des équipements de biosécurité de niveau 2 pour toutes les activités comportant l'utilisation de quantité diagnostique de culture infectieuse. Le niveau 3 de biosécurité est requis pour la manipulation et la production de grande quantité de culture et lors d'analyses d'échantillons environnementaux.

B. anthracis est de plus classé agent de bioterrorisme.

PROPHYLAXIE ET TRAITEMENT

La fièvre charbonneuse a **une répartition mondiale**. En certains points, elle apparaît avec une fréquence particulière, ce qui peut être imputé aux propriétés du sol aussi bien qu'aux déclarations plus ou moins systématiques aux autorités sanitaires du pays.

En France, la maladie apparaît de façon **sporadique**. Notre pays s'est peu à peu débarrassé de la maladie, mais il existe toujours des zones à risque où l'on pratique la vaccination. Il est donc important de connaître les règles de prophylaxie.

I- Prophylaxie

a- Lutte

Le bacille est facile à détruire, contrairement à **la spore qui est très résistante**. Ainsi dépolluer le sol contaminé par les spores est impossible, le sol devient inutilisable. Il faut donc :

- éviter de contaminer l'environnement (autopsies très réglementées en "plein champ" des animaux suspects, destruction des cadavres par incinération ou enfouissement dans une fosse d'au moins 2 mètres de profondeur et contenant de la chaux vive).

- réaliser une bonne désinfection des locaux (traitement thermiques, désinfectants)

L'antibioprohylaxie peut être utilisée, chez l'homme et chez l'animal non vacciné, lorsque les risques de contamination sont réels. Chez l'animal, l'antibiotique le plus utilisé est la pénicilline G.

b- Vaccination

La vaccination est couramment pratiquée chez les animaux et plus rarement chez l'homme.

Le vaccin vivant atténué de Pasteur et son dérivé, le vaccin Delpy, ont été obtenus en chauffant une souche virulente à 42 °C ce qui favorise la perte du plasmide pXO1 (codant

pour les toxines). Ces vaccins peuvent être encore virulents pour l'animal et ils ne sont plus utilisés en France.

Le vaccin Sterne (Sterne 1937) est un vaccin vivant constitué d'une suspension de spores produites par une souche (souvent la souche 34F2), ayant perdu le plasmide pXO2 et donc non capsulée. Le vaccin Sterne, adjuvé à la saponine, est mondialement utilisé chez l'animal. La germination des spores contenues dans le vaccin engendre des bacilles non capsulés, facilement phagocytés mais pouvant produire de petites quantités de toxine suscitant l'apparition d'anticorps neutralisants. Administré à un animal affaibli, ce vaccin peut donner naissance à un charbon vaccinal. Il représente la souche la plus largement utilisée dans le monde pour la production de vaccin anti-charbonneux. (Euzéby 2009)

En France, le seul commercialisé est le Carbovax® de Merial. Il procure une protection pendant environ un an (Terrier 2010) et est destiné seulement aux bovins et aux petits ruminants.

De nombreuses études s'intéressent à l'amélioration du vaccin, et notamment l'utilisation de vaccins inactivés. L'*Anthrax vaccin adsorbé* (AVA) est le seul vaccin autorisé contre l'Anthrax chez l'Homme aux Etats-Unis. Il s'agit d'un vaccin inactivé, préparé à partir d'une souche non capsulée connue sous le nom V770-NP1-R contenant un mélange de produits cellulaires, y compris PA (Protective Antigen) et l'hydroxyde d'aluminium comme adjuvant. Ivins et al. a évalué les effets à court, à moyen et long terme de l'AVA chez le macaque rhésus (Ivins 1996). Des Macaques vaccinés 2 semaines auparavant développent des immunoglobulines G anti-PA. Un taux de survie de 100% a été observée à 8 et 38 semaines post-vaccination chez les singes exposés de 161 à 760 DL50 de spores de *B. anthracis* par inhalation et sept des huit macaques ont survécu à un aérosol de 239 à 535 DL50 de spores de *B. anthracis* 2 ans post-vaccination. Le défaut de cette étude est que le titre en anti-PA déterminé par méthode ELISA a été évalué seulement à 2, 8 et 99 semaines après la vaccination, ce qui exclut l'évaluation de la crête de titrage d'anticorps et le taux de décroissance des anticorps anti-PA. Ivins et al. a ensuite comparé l'efficacité de PA recombiné (PA83) avec divers adjuvants (hydroxyde d'aluminium, monophosphoryl A, saponine) à l'AVA standard (Ivins 1998). On constate que chaque vaccin assure une bonne protection (>90%). Cette étude a été la première à mettre en évidence une réponse immunitaire à la fois humorale et à médiation cellulaire suite à une vaccination à base de PA.

La capacité d'un vaccin à protéger contre diverses souches de *B. anthracis* est essentielle. Fellows et al. a montré que le vaccin AVA procure une protection relative chez le

cochon d'inde contre différentes souches de *B. anthracis* mais une très haute protection contre ces mêmes isolats chez le macaque rhésus (Fellows 2001).

Pris dans son ensemble, ces études démontrent que AVA et PA fournissent des vaccins assurant une protection de haut niveau chez le macaque rhésus. Toutefois, il existe un manque important de données sur le développement de l'immunité à médiation humorale et cellulaire après la vaccination de primates non humains. La réponse prédominante des lymphocyte T et des cytokines Th2 a été démontrée mais de nombreux mécanismes restent à expliquer (Phipps 2004).

Pour terminer, des chercheurs ont constaté de manière fortuite lors d'une étude sur la pathogénie de la forme pulmonaire de l'anthrax que *Serratia marcescens* (contractée lors d'une infection nosocomiale) peut induire une protection chez les singes exposés aux spores de *B. anthracis* (Leffel 2008).

II- Traitement

La fièvre charbonneuse est une des rares maladies contagieuses qu'il faut traiter car on diminue ainsi le nombre de germes.

- il doit être **précoce** (pendant la phase fébrile)
- **Pénicilline G** (10000 UI/kg/j): jusqu'à 24 h après retour à température normale.
- il existe quelques souches résistantes, dans ce cas on utilise d'autres antibiotiques : gentamicine, chloramphénicol, ciprofloxacine, doxycycline, clindamycine, rifampicine, vancomycine, clarithromycine... La tétracycline, active *in vitro*, se révèle peu efficace *in vivo* (Euzéby 2009).

Attention : - si le traitement est effectué après la phase précoce fébrile, la libération brutale des toxines lors de la mort des bactéries entraîne la mort de l'animal.

- si le traitement est mis en place juste après la vaccination il ne faut pas oublier de revacciner après.

LES FIÈVRES HÉMORRAGIQUES SIMIENNES

Les virus responsables des fièvres hémorragiques simiennes appartiennent principalement à quatre familles : *Bunyaviridae*, *Togaviridae*, *Filoviridae* et *Flaviviridae*.

On étudiera dans ce chapitre six fièvres hémorragiques virales :

- fièvre Crimée-Congo
- fièvre jaune
- fièvre de Mayaro
- maladie à virus Ebola
- maladie de Marburg
- maladie à virus Chikungunya

La famille des *Filoviridae*, compte deux représentants principaux : le virus de la **maladie de Marburg** et le **virus Ebola** qui regroupe plusieurs souches (Soudan, Zaïre, Reston) et qui sont des **Maladies Réputées Contageuses** (C.R. D. 223-21). Les autres maladies sont seulement réglementées pour l'importation de primates non humains mais dans un souci de clarté nous les traiterons toutes dans ce même chapitre.

PRÉSENTATION DES AGENTS

I- Généralités sur les fièvres hémorragiques simiennes

La fièvre d'Ebola cause une maladie gravissime dotée d'une forte mortalité. Les autres fièvres hémorragiques africaines ont une gravité généralement moins importante (Le portail de la science 2010).

Famille	Virus	Clinique	Vecteur dans la nature
<i>Filoviridae</i>	Ebola	Fièvre hémorragique d'Ebola	inconnu
	Marburg	Fièvre hémorragique de Marburg	inconnu
<i>Bunyaviridae</i>	Nairovirus Crimée-Congo	Fièvre hémorragique de Crimée-Congo	tique du genre <i>Hyalomma</i>
<i>Togaviridae</i>	Mayaro Chikungunya	Fièvre de Mayaro Maladie à virus Chikungunya	<i>Haemagogus sp.</i> moustique du genre <i>Aedes</i>
<i>Flaviviridae</i>	Amaril	Fièvre jaune	différents moustiques

Tableau 3 : Virus des fièvres hémorragiques simiennes et leur vecteur dans la nature.

II- Les Filovirus (Borio 2002)

Les fièvres hémorragiques d'Ebola et de Marburg sont dues respectivement à des membres des genres *Ebolavirus* et un *Marburgvirus*. Ces virus sont les uniques membres de la famille des *Filoviridae*. Le genre *Ebolavirus* comprend 5 espèces reconnues : Zaire *Ebolavirus*, Sudan *Ebolavirus*, Ivory Coast *Ebolavirus*, Reston *Ebolavirus* et Bundibugyo *Ebolavirus*. Le genre *Marburgvirus* ne comprend qu'une seule espèce nommée Lake Victoria *Marburgvirus*. Les fièvres hémorragiques d'Ebola et de Marburg sont endémiques dans de nombreuses régions d'Afrique sub-saharienne.

Les Filovirus sont détruits après passage à l'autoclave. Les désinfectants hospitaliers et l'hypochlorite de sodium peuvent également être utilisés.

a- Le virus Ebola



Illustration 3 : Virus Ebola vu au microscope électronique (D'après Wikipédia 2010).

La première épidémie de maladie d'Ebola, de juin à novembre 1976 au Soudan, ne fut identifiée que rétrospectivement. Parallèlement au Zaïre, une épidémie qui fut, elle, identifiée faisait 280 morts entre septembre et novembre 1976.

Lors de ces deux épidémies deux souches de virus sont alors isolées et appelées Ebola Zaïre et Ebola Soudan.

A partir de 1989, des singes Macaques *Cynomolgus*, tous originaires des Philippines meurent en série de fièvres hémorragiques dans des laboratoires aux États-Unis. La principale épidémie eut lieu dans une animalerie de quarantaine à Reston en Virginie, ville qui donna son nom à la souche alors isolée. Ce virus réapparaît régulièrement.

Plus récemment, en Côte d'Ivoire, une troupe de Chimpanzés suivie par des éthologues subit des pertes suite au passage d'une nouvelle souche, proche de la souche Zaïre. Il s'agit de la souche Ebola Côte d'Ivoire. Au Gabon et au Zaïre, les virus Ebola touchent régulièrement les populations humaines (Le Guenno 1995).

Le virus Ébola compte aujourd'hui cinq espèces: Zaïre, Soudan, Côte d'Ivoire, Bundibugyo et Reston.

Il s'agit d'un virus à ARN monocaténaire enveloppé dont la morphologie est semblable au virus de Marburg mais dont la structure antigénique diffère. Le virus Ebola est sensible aux solvants des lipides. Il est inactivé par la bêta propriolactone, le glutaraldéhyde, le formol, les antiseptiques usuels comme l'hypochlorite.

Il est inactivé par le chauffage à 60°C pendant une heure ainsi que par les rayons UV et Gamma. Les souches du virus sont conservées à -70°C.

Le réservoir animal du virus Ebola a été activement recherché et est resté longtemps inconnu. De récentes études tendent à montrer qu'il s'agit d'une espèce de chauve-souris.

b- Le virus Marburg

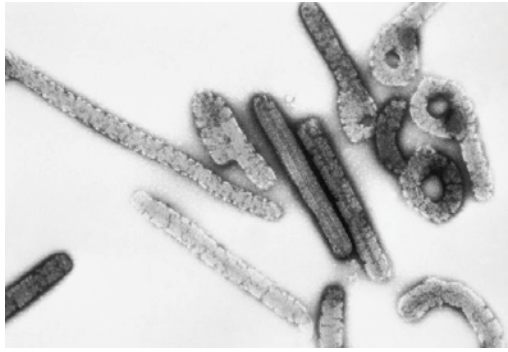


Illustration 4 : Particules virales de Marburg au microscope électronique (Wikipédia 2010)

C'est un virus à ARN monocaténaire et enveloppé. Il peut présenter plusieurs formes :

- bâtonnet à extrémité arrondie
- aspect allongé et sinueux
- forme d'anneau (Lodde 1998).

Le virus de Marburg est le premier qui a été décrit. Assez différent de l'autre souche, il apparaît très pathogène pour l'Homme. L'infection est provoquée par le contact avec des Singes Verts (*Chlorocebus aethiops*) importés. Cette maladie a touché des membres du personnel de laboratoires en Europe du Nord et Europe Centrale en 1967. D'autres cas très sporadiques sont apparus en Afrique du Sud en 1975 et au Kenya en 1980.

Tout comme pour Ebola, reste la question du réservoir. Cependant de récentes études tendent à prouver que la chauve-souris, et particulièrement la Roussette d'Egypte (*Rousettus aegyptiacus*) tiendrait ce rôle.

III- Le Nairovirus Crimée-Congo

La **fièvre hémorragique de Congo-Crimée (FHCC)** est due à un virus du groupe des *Nairovirus*, groupe constituant l'un des cinq genres de la famille des *Bunyaviridae*. C'est un arbovirus à ARN enveloppé, sphérique de 90 à 100 nm. L'arbovirus (abréviation de **arthropod born virus**) est un virus entretenu dans la nature par transmission biologique de vertébré à vertébré par l'intermédiaire d'arthropodes hématophages). Il existe 22 *Nairovirus* regroupés

en 6 sérogroupes. Le virus se réplique dans la cellule sans effet létal sur cette dernière et possède une certaine faculté d'évolution. Il s'agit d'une zoonose virale majeure souvent mortelle chez l'Homme, surtout connue en Afrique, Asie et Europe de l'Est.

Le virus de la FHCC est très fragile. Il est sensible aux UV (1 mn), à la chaleur (20h/37°C - 2h/45°C -10 mn/56°C). Il résiste partiellement à la lyophilisation. La congélation est la technique de choix pour la conservation de ces souches virales. Le virus est sensible aux solvants des lipides (chloroforme, éther, formol...) à l'eau de javel et aux détergents tels que le désoxycholate de sodium. Les solvants et détergents classiques assurent une désinfection efficace. Il se conserve dans la glycérine. Le pouvoir infectieux est maintenu pour un pH compris entre 6 et 9,5 avec un optimum entre 7 et 8. Il est rapidement inactivé par les pH acides (CNRS 2010).

IV- Les Alphavirus

a- Virus de Mayaro

Le virus Mayaro est un virus à ARN du groupe des *Alphavirus*, groupe A des arbovirus, de la famille des *Togaviridae*. Il est étroitement apparenté au virus de la fièvre de Semliki. Le virus Uruma de Bolivie est considéré comme une souche du virus de Mayaro.

Ce virus est sensible à la chaleur, il est conservé à -70°C ou à -196°C.

Importance :

Dans les zones d'endémie connues (en Bolivie, au Brésil, en Guyana, à Trinité-et-Tobago) 10 à 50% de la population possède des anticorps contre ce virus.

Quelques dates :

- 1955 : épidémie de 50 cas au Brésil.
- 1954 - 1955 : 20 colons atteints à Uruma.
- 1977 - 1978 : nouvelle épidémie au Brésil (Acha 2005).

b- Virus de Chikungunya

Le virus Chikungunya, qui signifie « marché courbé » en swahili, est un *Alphavirus*, arbovirus (groupe A des arbovirus) de la famille des *Togaviridae*. C'est un virus à ARN

monocaténaire linéaire, de diamètre 60-70 nm. Il existe une relation antigénique entre ce virus et le virus de Mayaro, O'nyong-nyong et Semliki. Les virions sphériques et à symétrie icosaédrique mesurent 50 nm à 60 nm de diamètre et possèdent une enveloppe.

Sa culture peut se réaliser par inoculation à une souris ou à un moustique ou encore sur culture cellulaire de moustique ou de mammifère.

Ce virus est très sensible à la chaleur, à l'éthanol à 70 %, à l'hypochlorite de sodium à 1 %, au glutaraldéhyde à 2 %, aux solvants des lipides, il est inactivé par la chaleur sèche ou humide > 58° C; il est sensible à la dessiccation. Le virus survit moins d'une journée dans un milieu de culture à 37° C. Pour le conserver, il faut le mettre dans de la glace carbonique (-70°C) ou dans de l'azote liquide (-170°C).

On note le pouvoir pathogène lors d'injection par voie intracérébrale au souriceau nouveau né. Cette particularité est largement utilisée pour l'isolement des arbovirus (Lodde 1998).

Le chikungunya n'est pas une maladie nouvelle. Le virus a été isolé pour la première fois en 1952-1953 lors d'une épidémie de fièvre qui sévissait sur le plateau du Makonde dans la province de Newala au Tanganyika (actuelle Tanzanie).

On dénombre deux principaux foyers de chikungunya :

- L'un asiatique, qui frappe régulièrement Java, ou l'Inde (près de 1,3 million de personnes infectées).

- L'autre africain. Les scientifiques du Centre national de références des arbovirus de l'Institut Pasteur ont identifié dès le mois de mai 2005 le virus à La Réunion. Le premier cas y a été enregistré le 22 février. Fin novembre, 4 500 personnes étaient contaminées. Au 24 février 2006, le virus du chikungunya infectait plus de 150 000 personnes, soit 20 % de la population de l'île, avec près de 120 000 nouveaux cas rien que pour le début de l'année 2006. La Réunion n'est d'ailleurs pas la seule île touchée dans cette région. Le chikungunya a fait son apparition aux Comores en juillet 2004. Le nord de Madagascar, Maurice, les Seychelles et Mayotte, avec plus de 5 000 cas officiellement déclarés, ne sont pas épargnés, même si l'on en parle finalement assez peu.

V- Virus Amaril

Le virus Amaril, agent de la fièvre jaune, est un *Flavivirus* (groupe B des arbovirus), arbovirus de la famille des *Flaviviridae*. La première épidémie semble être en 1648 au

Yucatan. Depuis, de nombreuses épidémies ont été décrites, dont celle de 1821 - plusieurs milliers de morts (20 000 selon certaines estimations) à Barcelone et celle de 1965 (plusieurs milliers de cas causant plusieurs centaines de morts au Sénégal).

Il existe une différence antigénique entre les souches africaines et américaines. Comme tous les flavivirus, le virion est enveloppé ; il mesure 40 nm de diamètre. Ce virus a des antigènes communs avec les virus du Nil occidental, Wesselsbron, et celui de la dengue entre autres (Acha 2005).

Il se réplique sur de nombreux types cellulaires, on peut utiliser par exemple :

- des reins de singes, de hamster, de porc
- des embryons de poulet
- des moustiques.

Il est sensible à la chaleur et aux solvants des lipides, et de même que pour le virus du Chikungunya, pour le conserver, il faut le mettre dans de la glace carbonique (-70°C) ou dans de l'azote liquide (-170°C) (Lodde 1998).

DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES

I- Répartition géographique et espèces sensibles (Acha 2005 et CNRS 2010)

Virus	Distribution	Espèces sensibles	Réservoir
Ebola	Soudan, Zaïre, Gabon, Congo. Asie pour la souche Ebola Reston.	Isolement ebolavirus et détection ARN viral chez : Gorilles, chimpanzé, céphalophe Détection d'anticorps contre ebolavirus chez : mandrille, babouin, singes colobes, guenon, chimpanzé, gorille, chien	roussette d'Egypte
Marburg	Afrique du sud, Kenya, Zimbabwe, Kenya, République Démocratique du Congo.	singe vert (<i>Chlorocebus aethiops</i>), babouin, rhésus	roussette d'Egypte
Nairovirus Crimée Congo	Cosmopolite, mais jamais détecté en Amérique ni en Australie.	Homme, lièvre, hérisson, bovins, équins, caprins, ovins, porcins.	tique
Mayaro	Bolivie, Brésil, Guyana, Trinité-et-Tobago, Surinam, Panama, Colombie, Pérou, Costa-Rica.	Homme = hôte accidentel	Oiseaux (<i>Collumbigallina sp.</i> , <i>Icterus spurius</i>), rongeurs (<i>Oryzomys</i> , <i>Proechimys</i> , <i>Nectomys</i>), moustiques, primates (ouistitis et singes hurleurs).
Chikungunya	Afrique subsaharienne, Inde, Asie.	Oiseaux, rongeurs, mouton, bœuf, chèvre, cheval, âne, chauve-souris, reptiles, Homme.	Singes verts, babouins, chimpanzés, macaques, entelles d'Asie, Colobes.
Amaril	Afrique et Amérique Latine.	Marsupiaux, rongeurs, insectivores, PNH, Homme.	PNH jouent un rôle important dans le maintien de l'infection mais réservoir réel est le vecteur : moustique.

Tableau 4 : Répartition géographique et espèces sensibles des virus des fièvres hémorragiques simiennes.

Les chauves-souris constituent le réservoir des filovirus. Les filovirus sont généralement asymptomatique chez les chauves-souris ; en revanche ces virus provoquent des symptômes chez les primates non-humains et certaines espèces de la faune sauvage (Bente 2009).

En Afrique, des épidémies d’Ebola ont été reliées à la mort de divers animaux : gorilles (*Gorilla gorilla*), chimpanzés (*Pan troglodytes*), mandrilles (*Mandrillus sp.*), cercopithèques (*Cercopithecus sp.*) et autres singes, céphalophes (*Céphalophus dorsalis*) une espèce d’antilopes des forêts, potamochères (*Potamochoerus porcus*).

II- Transmission (Acha 2005)

a- Le cas des arbovirus

Il s’agit de virus qui s’entretiennent dans la nature par cycles biologiques entre des hôtes vertébrés par l’intermédiaire d’arthropodes hématophages. Leur cycle, plus ou moins complexe, fait intervenir trois types d’acteurs : le virus (et son réservoir qui peut, à ce jour ne pas être connu dans toute sa complexité), l’arthropode vecteur et, à la fin de la chaîne épidémiologique, l’hôte vertébré. Il s’agit ici du cas des virus de trois familles : *Togaviridae* (Chikungunya et Mayaro), *Bunyaviridae* (FHCC) et *Flaviviridae* (fièvre jaune) (Georges 2000).

i) Le virus de Chikungunya

La source de contamination et le mode de transmission est le vecteur et c’est surtout le genre *Aedes* qui est en cause : *albopictus*, *aegypti*, *polynesiennis*, *furcifer taylori*. Le virus a été isolé aussi chez *Culex fatigans* et *Anopheles gambiae* mais la reproduction expérimentale de la maladie a été impossible.

Dans la nature, le cycle naturel de base est : singes-moustiques-singes. Cependant en zone urbaine, il existe probablement un cycle homme-moustique-homme.

ii) Le virus de Mayaro

Les principaux vecteurs sont les moustiques *Haemagogus spp.* et ils transmettent le virus par piqûre (ex : *Haemagogus janthinomys*, épidémie de Belterra). Les primates peuvent jouer le rôle d'hôtes amplificateurs du virus lors d'une épidémie, comme cela a été suspecté lors de l'épidémie de Belterra. Les ouistitis (*Callithrix argentata*) et les singes hurleurs (*Alouatta sp.*) constituent le réservoir principal du virus ; ils possèdent un taux élevé en anticorps et on a pu isoler le virus chez ces espèces.

On a isolé le virus aussi chez des moustiques *Culex*, *Mansonia*; *Aedes*, *Psorophore* et *Sabethes*.

iii) La fièvre jaune

Le **réservoir** du virus de la fièvre jaune est le moustique qui joue le rôle de **vecteur**, conserve toute sa vie durant son pouvoir infectieux et peut transmettre le virus par voie trans-ovarienne (OMS 2010). La fièvre jaune se présente sous deux modalités épidémiologiques : urbaine et sylvestre. Selon toute probabilité, la fièvre jaune urbaine a pour origine le cycle sylvestre. Le seul hôte connu de la forme urbaine est l'Homme et la maladie est transmise par un vecteur biologique *Aedes aegypti*. Le moustique s'infecte en piquant un individu en phase virémique et transmet l'infection à une autre personne sensible après 10 à 12 jours d'incubation extrinsèque. La fièvre jaune sylvestre, au contraire, est une zoonose dont les hôtes principaux sont les singes, l'Homme n'étant qu'un hôte accidentel. Le virus circule dans les forêts tropicales humides et se transmet d'un hôte à l'autre par la piqûre de moustiques infectés. Les cycles urbain et sylvestre sont indépendants et autonomes, mais l'infection peut passer d'un cycle à l'autre quand les conditions sont favorables.

Amérique latine :

Le virus est transmis par un moustique : *Haemagogus* (vecteur principal de la fièvre sylvestre en Amérique). Le cycle est exclusivement sylvestre en Amérique (alors qu'il est encore également urbain en Afrique). Les moustiques *Haemagogus janthinomys* et *Haemagogus spegazzini* vivent au sommet des arbres de la forêt. Plusieurs espèces de ce genre ont des habitudes diurnes et descendent au niveau du sol dans les zones déboisées. L'abattage des arbres fournit donc une occasion particulièrement propice au contact entre les moustiques et l'homme. Les moustiques *Aedes leucocelaenus* et *Sabethes chloropterus* (résistant à la

sécheresse) sont aussi infectés naturellement mais jouent un rôle secondaire. Les capucins (*Cebus*) sont des réservoirs importants car ils sont plus résistants.

Le danger d'une épidémie de fièvre urbaine disparue des Amériques persiste tant que son vecteur (*A. aegypti*) n'aura pas été complètement éliminé.

Afrique orientale et centrale

Fièvre jaune animale :

- *Aedes africanus* (passage du virus singe à singe)

Fièvre jaune sylvatique :

- *Aedes simpsoni* (vecteur en Éthiopie) vit dans les végétations à proximité des habitations.

- *Aedes africanus* (passage du virus singe à singe, éventuel rôle intermédiaire entre le singe et l'Homme).

Fièvre jaune urbaine :

- *Aedes aegypti* (principal intermédiaire d'homme à homme) (Lodde 1998).

iiii) La fièvre hémorragique Crimée-Congo

Il existe différentes sources de contamination :

- **Infection naturelle** : la tique infectée est la principale source de contamination humaine. Les animaux virémiques et leurs cadavres constituent une source secondaire.

- **Infection nosocomiale** : les malades atteints de FHCC sont une source importante de contamination pour leurs proches ou pour le personnel hospitalier et sont à l'origine de cas le plus souvent mortels.

- **Infections accidentelles ou de laboratoire** : la contamination se fait par l'intermédiaire des prélèvements effectués sur les malades (sang, sécrétions, carcasses) ou des cultures virales. Sang en phase virémique, sécrétions corporelles des malades (oro-nasales surtout), carcasses d'animaux infectés, cadavres humains, tissus de tiques infectées.

- **Sources de contamination de la tique** : elles sont représentées par les espèces animales capables d'assurer la circulation du virus à des titres suffisamment élevés pour infecter la tique. Les hôtes vertébrés les plus efficaces sont ceux qui restent en bonne santé, mais chez qui la durée de virémie est suffisante (1 semaine au moins) pour infecter de très nombreux vecteurs compétents. Un grand nombre de petits vertébrés sensibles dont les populations se renouvellent rapidement (rongeur et lagomorphes) ou un petit nombre de grands mammifères (bétail) peuvent produire des effets semblables.

On observe deux types de transmission :

- **Transmission horizontale indirecte** : le virus de la FHCC est essentiellement transmis par l'intermédiaire d'un arthropode acarien : la tique. Elle assure la transmission biologique du virus du réservoir animal à l'homme victime. La transmission biologique implique un maintien voire une multiplication du virus au sein du vecteur en l'absence de sang de vertébré et dépasse donc le simple transport mécanique de l'agent dû à la contamination des pièces buccales. L'homme s'infecte lorsqu'il est piqué par une tique infectée ou quand il écrase les tiques avec les mains, le virus pénétrant alors par les excoriations cutanées. 29 espèces de tiques sont actuellement reconnues comme vecteurs potentiels du virus. Les genres représentés sont : *Hyalomma*, *Boophilus*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Alveonatus* et *Amblyomma* pour la famille des *Ixodidae*, *Argas* et *Ornithodoros* pour les *Argasidae*. Les vecteurs les plus importants sont : *Hyalomma anatolicum anatolicum* et *H. marginatum marginatum* pour l'Europe centrale, le Bassin méditerranéen, *Boophilus microplus* pour les régions orientales et afrotropicales. En France, le danger pourrait provenir des genres *Ixodes*, *Rhipicephalus* et *Argas*.

- **Transmission horizontale directe** : d'homme à homme possible par contact direct, par le sang ou du matériel contaminé par du sang.

b- Cas des Filovirus

Le niveau de contagiosité des Filovirus est très important.

i) Ebola

La salive, le sang, les urines, les fèces, la sueur, le sperme, les vomissures des malades sont riches en virus et constituent les principales sources de contamination.

Chez l'animal, des études en condition de laboratoire, ont prouvé que plusieurs mois après la contamination, le virus n'était plus retrouvé dans l'organisme. Seuls certains territoires tels que la chambre antérieure de l'oeil, les testicules, au statut immunologique particulier, peuvent présenter un risque au delà de cette période. Passé ce délai, le virus n'a jamais été retrouvé même à la suite d'un traitement immunosuppresseur.

La quarantaine semble donc présenter des garanties de sécurité suffisante.

Les modes de contamination sont nombreux : par voie génitale, par morsure, par voie respiratoire, par les liquides physiologiques qui s'échappent des cadavres, par contact avec les muqueuses oculaires et oropharyngées. L'origine des épidémies se fait par le biais des grands singes de la forêt équatoriale ; ceux-ci sont contaminés par des fientes ou des morsures des chauves-souris (réservoir potentiel de la maladie) qui sont porteuses du virus sans en présenter les symptômes.

ii) Marburg

Les animaux infectés peuvent excréter le virus dans les urines et la salive. Le virus a été retrouvé dans le sperme d'une personne guérie de l'infection.

Il existe différents modes de transmission :

- par le matériel servant à l'entretien des singes
- par le sang et les organes des animaux contaminés
- par les excoriations de la peau.

Le virus passe les muqueuses surtout celles des premières voies aériennes (Brack 1987).

EXPRESSION CLINIQUE

Chez l'Homme comme chez les primates non-humains, le tableau clinique des fièvres hémorragiques peut être grave jusqu'à une issue mortelle.

Les formes inapparentes ont des taux de prévalence dans tous les cas beaucoup plus élevés (quoique sûrement variables en fonction des virus) que ceux des formes symptomatiques, de l'ordre d'une forme apparente pour 10 à 100 formes inapparentes. Soulignons que si la fièvre est le dénominateur commun, les symptômes d'hémorragie peuvent manquer, ou être très discrets. Ils doivent donc être soigneusement recherchés par le clinicien (Georges 2000).

Tableau 5 : Expression clinique des fièvres hémorragiques chez les primates non-humains (Acha 2005, Kandoorp 2004 et Fowler 2003)

Virus	Incubation	Description clinique
Ebola	3-9 jours	Baisse brutal de l'état général, fièvre, anorexie totale, écoulement nasal, éruption cutanée, diarrhée, anomalies de la coagulation, augmentation des enzymes hépatiques, splénomégalie, thrombocytopenie.
Marburg	2-6 jours	Asymptomatique chez le <i>Chlorocebus aethiops</i> . Mortel chez les autres espèces : fièvre, anorexie, abattement, amaigrissement, pétéchies, leucopénie, thrombocytopenie.
Nairovirus Crimée Congo	1-3 jours	Asymptomatique
Mayaro	3-9 jours	Séropositivité de certains primates mais pas de signe clinique.
Chikungunya		Asymptomatique
Amaril	2-3 jours	Singes du vieux-monde : maladie inapparente. Singes du nouveau monde : une importante fièvre, des tremblements, de la léthargie, des vomissements, un ictère et des hémorragies multiples.

Pour les maladies provoquées par les Filovirus, la biochimie peut être intéressante. En effet, le critère le plus fiable est l'augmentation en Lactate Déshydrogénase (LDH) à des valeurs dépassant 15000 U/l. Les ASAT et les ALAT augmentent aussi.

MÉTHODES DIAGNOSTIQUES

Face à la gravité des ces maladies qui concernent autant l'Homme que les primates non-humains, il est capital de posséder des moyens efficaces de détection précoce des virus. En effet le niveau de contagion est parfois tel qu'il est souvent trop tard lorsque le diagnostic clinique est établi. Il est également utile de connaître les zones d'endémie de ces virus afin de ne pas importer la maladie lors de l'acquisition de primates.

I- Diagnostic différentiel

Parmi les diagnostics différentiels à évoquer, certains relèvent de la routine (virus des hépatites, paludisme, typhoïde, méningo-coccémies...), d'autres sont de diagnostic plus délicat et relèvent de centres de référence. Tous ces diagnostics doivent être évoqués mais en attendant de pouvoir trancher, il importe de prendre immédiatement les précautions maximales.

II- Diagnostic de laboratoire (Zeller 2000)

Les avantages et inconvénients des différentes méthodes sont résumés ci-après :

➤ **Sérologie**

Inactivation des prélèvements: β -propiolactone ou irradiation.

- IgM par immuno-capture Elisa.
- IgG par Elisa.
- Immunofluorescence pour un diagnostic rétrospectif.
- Western blot
- Radio immuno precipitation assay (RIPA)
- Fixation du complément
- Confirmation par une autre technique requise pour certains virus.

Avantages: rapidité de l'Elisa, méthode de choix. La technique Western blot est appréciée pour sa spécificité et sert en général de confirmation d'un autre, préférée pour sa sensibilité.

Inconvénient: délai d'apparition des IgM; demande d'un 2^{ème} prélèvement.

➤ **Détection virale**

RT-PCR (nested)

À partir du sang total, sérum, biopsie, liquide pleural, salive...

Avantages: sensibilité, assez rapide.

Réalisable in situ; importance en épidémiologie moléculaire.

Inconvénients: choix des amorces; faux négatifs ou positifs; contaminations possibles, confirmations nécessaires.

➤ **Antigène-capture**

Technique Elisa.

Avantages: rapidité, permet de traiter de nombreux échantillons; valable pour immunohistochimie, hybridation in situ.

Inconvénients: parfois peu sensible, absence de réactifs; emploi limité à certains virus.

➤ **Isolement**

Sur cellules Vero E6 (ATCC 1008) et/ou de moustiques (C6/36).

Détection par immunofluorescence par anticorps polyclonaux, puis monoclonaux si nécessaire, microscopie électronique possible.

Avantages: permet l'isolement de souches.

Inconvénients: délai de réponse, très aléatoire pour certains virus.

Méthode de référence: la culture

L'isolement du virus constitue le diagnostic de certitude, il est réalisé sur sang total ou sérum, éventuellement sur fragment de biopsies. Il est obtenu sur les cellules Vero E6 (ATCC 1008), lignée qui peut permettre l'isolement de tous les virus de FH; mais certaines lignées sont plus favorables que d'autres à la multiplication de certains virus (cellules SW13, C6/36, MA 104 ...).

L'isolement est plus ou moins facile selon les souches; dans les meilleurs cas une culture peut être obtenue en 2 ou 4 jours. Mais le virus n'a pas d'effet cytopathique.

La démonstration de la positivité (culture positive) se fera généralement par réaction d'antigènes en immunofluorescence (IFI) avec des sérums polyclonaux, voire si nécessaire

monoclonaux. La microscopie électronique peut être utile si on suspecte de nouvelles souches pour lesquelles des réactions ne seraient pas disponibles.

Les techniques de biologie moléculaire avec amplification génique par RT-PCR suivie d'une révélation spécifique voire d'un séquençage, sont de plus en plus utilisées dans les laboratoires, tant pour caractériser le virus que pour déterminer sa phylogénie. Pour le diagnostic, on a recours à des « primers universels » pour les Filovirus qui permettent le diagnostic par PCR de toutes les souches connues de Marburg et d'Ebola.

Sur des prélèvements tardifs, le virus est rarement isolé, mais le génome viral peut être détecté par amplification génique à partir d'ARN extraits de cellules mononucléées.

Autres méthodes de diagnostic direct

Recherche d'antigènes: pour Ebola, le sérum des malades contient, outre le virus, de grandes quantités de la fraction de la glycoprotéine d'enveloppe sécrétée. La meilleure technique de détection d'antigènes spécifiques dans le sérum repose sur une capture d'antigène, rapide, fiable et qui peut être pratiquée sur des prélèvements inactivés par la chaleur, la bêta-propiolactone ou par irradiation. La capture d'antigènes est le seul test qui permet de diagnostiquer en quelques heures un cas de fièvre hémorragique au stade de la virémie avant séroconversion.

Recherche de génome: on peut pratiquer la recherche de génome par RT-PCR avec des amorces multiples directement sur le sang ou sur les tissus sans passer par l'étape de culture. On peut aussi avoir une réponse en 24-48 heures; le délai minimal peut être ramené à 6-8 heures.

L'abondance des antigènes dans les biopsies de peau a permis de proposer un diagnostic post mortem par immunohistochimie, cette approche diagnostique a l'avantage d'être praticable sur prélèvements fixés au formol et donc sur échantillons expédiés sans danger au laboratoire spécialisé.

La microscopie électronique est utilisable à chaque fois que des prélèvements sont riches en virus.

Diagnostic indirect sérologique

Dans les années quatre-vingt, seule l'immunofluorescence indirecte était utilisée pour rechercher les anticorps. Cette technique avait l'inconvénient de se positiver tardivement, et donnait lieu à de nombreux résultats faussement positifs. La recherche d'anti-corps neutralisants est peu pratiquée; ces anticorps sont très spécifiques, mais nécessitent des

quantités importantes de virus dangereux. La capture d'IgM en Elisa est beaucoup plus fiable, elle permet un diagnostic précoce (positivité entre le 3^{ème} et le 6^{ème} jour pour certains auteurs, vers le 7^{ème}, 10^{ème} jour pour d'autres).

– Délais de positivité :

La virémie et l'antigénémie sont très intenses à la phase aiguë. On peut trouver plus de 10⁶ unités infectieuses/ml dans le sang lors des infections à virus Ebola. Le virus Marburg peut aussi être retrouvé (10³ à 10⁶) dans la salive et les urines. Les virus peuvent être isolés chez les patients au stade aigu de la maladie. Dans un petit nombre de cas, la virémie peut être décelée jusqu'à la mort, ou au plus durant une semaine après le début des symptômes. L'antigénémie est décelable durant une dizaine de jours. Du virus viable peut être retrouvé en post mortem et des cas ont été rapportés de contamination à la faveur des soins de corps des cadavres. Pour détecter les anticorps, il faut bien sûr que le patient survive, si les IgM apparaissent précocement, elles persistent rarement plus de trois mois; les IgG sont décelables durant plusieurs années.

– Limites :

Pour la recherche tant des antigènes que des anticorps (par Elisa), il n'existe pas de réactifs commerciaux distribués. Chaque laboratoire de référence produit actuellement les siens et ces tests ne sont pas disponibles à large échelle. Dans un premier temps, on a utilisé comme source d'antigène des lysats de cellules Vero préparés en tampon borate/triton, mais pour obtenir des tests plus spécifiques on a eu recours à une purification virale à partir du surnageant, technique lourde et dangereuse. Pour s'affranchir des cultures dangereuses, on a développé des expressions de protéines virales (essentiellement nucléoprotéine et glycoprotéine) exprimées dans des cellules d'eucaryotes ou de procaryotes, mais ces techniques n'ont pas à ce jour abouti à des trousse de diagnostic commercialisées ou même à large diffusion, y compris au sein des centres de référence. Pour l'amplification génique, il faut être prudent quant à l'interprétation de résultats négatifs, car il suffit d'une modification de la séquence dite conservée pour que les oligonucléotides n'hybrident plus. Pour Le Guenno et Bouloy, ceci s'applique principalement aux Filovirus dont seulement six représentants (le virus Marburg et les 4 sérotypes de virus Ebola) sont connus à ce jour.

III- Récentes découvertes

Des chercheurs ont développé un test de terrain rapide, fiable et peu onéreux pour détecter deux souches du virus de l’Ebola.

En 30 minutes, grâce à une technique d’immunofiltration, le test détecte la présence des protéines virales des souches du Zaïre et du Soudan du virus de l’Ebola dans des échantillons d’urine et de sérum. Les échantillons sont inactivés chimiquement afin d’éviter toute infection parmi ceux qui les manipulent.

A l’origine, les chercheurs souhaitaient créer un test qui détecte toutes les souches du virus, mais leur technique n’est sensible qu’aux souches du Zaïre et du Soudan.

Ils ont testé leur méthode sur le terrain avec des échantillons obtenus lors d’une éclosion de fièvre hémorragique Ebola à Mbomo et à Mbanza en République du Congo en décembre 2003.

Grâce à son prix relativement faible et au fait qu’aucun équipement technique n’est nécessaire, ce test pourrait aider les pays en développement à obtenir des diagnostics précoces lors d’éclosions du virus de l’Ebola selon le chercheur principal de cette étude Andreas Lucht, de l’Institut de Microbiologie Bundeswehr, en Allemagne, au Réseau Sciences et Développement

Il pourrait surtout se révéler utile dans les régions endémiques où les analyses pourraient être effectuées immédiatement, sur place. Selon Lucht, le test a déjà été utilisé en coopération avec l’Organisation Mondiale de la Santé et le Ministère de la Santé de la République du Congo, et le personnel local a été formé pour l’utiliser dans des régions sans électricité ni eau courante.

L’équipe s’attèle désormais au développement d’une version plus sophistiquée du test, capable de détecter les anticorps contre le virus présents à des stades plus avancés de l’infection.

Utilisable sur un échantillon d’urine, ce test est plus sûr que ceux qui utilisent des échantillons de sang, en plus d’être acceptable d’un point de vue culturel pour les communautés africaines.

Virus	Méthodes diagnostiques utilisées
Ebola	<p>Diagnostic virologique : virus isolé à partir d'animaux malades (laboratoire de confinement L4) par RT-PCR, capture d'antigène par ELISA, microscopie électronique.</p> <p>Diagnostic sérologique : essentiellement l'immunofluorescence indirecte.</p> <p>Sur l'animal mort :</p> <p>Ebola Reston : forte dilatation de la rate, sécheresse des tissus, augmentation du volume des reins, hémorragies dans divers organes.</p> <p>Ebola Zaïre : atteinte cérébrale (le cerveau est parsemé de taches hémorragiques) et destruction des tissus sous-cutanés, la peau est irritée, couverte de taches rouges visibles entre les poils clairsemés, hémorragie interne généralisée, le foie est dilaté (nécrose diffuse du parenchyme sans réaction inflammatoire), hémorragies intestinales.</p>
Marburg	<p>Sérologie : Immunofluorescence indirecte, IgM par immuno-capture ELISA, IgG par ELSA, Western-blot.</p> <p>Virologie : ELISA, mise en culture, immunohistochimie, microscopie électronique.</p>
Nairovirus Crimée Congo	<p>Sérologie : immunofluorescence indirecte, ELISA plus sensible, plus spécifique, plus rapide et plus reproductible.</p> <p>Diagnostic virologique : isolement du virus après inoculation intracérébrale à des souris ou à partir de cultures cellulaires, détection d'antigène par immunofluorescence directe (Labo L4).</p>
Mayaro	Essentiellement sérologique car absence de signe clinique.
Chikungunya	Essentiellement sérologique car absence de signe clinique.
Amaril	<p>Histologie : on découvre des inclusions intranucléaires.</p> <p>Virologie : mise en culture, RT-PCR.</p> <p>Sérologie : test ELISA.</p>

Tableau 6 : Méthodes diagnostiques utilisées pour le virus des fièvres hémorragiques simiennes.

RÉGLEMENTATION SANITAIRE

I- La réglementation actuelle sur la manipulation du virus

Agent biologique	Classification selon arrêté du 18 juillet 1994	Classification selon directive 2000/54/CE du parlement européen	U.S. Department of Health and Human Services
Ebola	4	4	4
Marburg	4	4	4
Nairovirus Crimée Congo	4	4	4
Mayaro	3	3	2
Chikungunya	3	3	3
Fièvre jaune	3	3	3

Tableau 7 : Classification réglementaire des virus des fièvres hémorragiques simiennes.

La réglementation en vigueur concernant la manipulation des agents biologiques est régie par l'article R231-61-1 du code du travail, cet article est en vigueur depuis le 6 mai 1994. Cet article indique que «le groupe 4 comprend les agents biologiques qui provoquent des maladies graves chez l'homme et constituent un danger sérieux pour les travailleurs ; le risque de leur propagation dans la collectivité est élevé ; il n'existe généralement ni prophylaxie ni traitement efficace. ». La directive 2000/54/CE indique également que « les activités comportant la manipulation d'un agent biologique doivent être exécutées [...] uniquement dans des zones de travail correspondant au moins au niveau de confinement numéro 4, pour un agent biologique du groupe 4 ».

Ainsi les réglementations française et européenne classent les agents des fièvres hémorragiques simiennes dans les groupes 3 et 4 et exigent que toute manipulation de ces virus nécessite un niveau de confinement adapté (annexe 2).

Aux USA, la réglementation actuelle recommande un niveau de biosécurité de niveau 2, 3 et 4 selon le virus manipulé (U.S. Department of Health and Human Services, 2007).

II- Réglementation actuelle sur l'importation de primates non-humains concernant les fièvres hémorragiques simiennes

L'arrêté du 19 Avril 2002 (annexe 2) fixant les conditions sanitaires pour l'importation et le transit, sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outre-mer, des animaux vivants et de certains de leurs produits visés à l'article L. 236-1 du code rural, exige qu'un vétérinaire officiel certifie que tous les primates non-humains importés ou transitant sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outre-mer en provenance de pays tiers destinés à des établissements d'expérimentation animale, des établissements d'élevage spécialisés, des établissements fournisseurs et à des établissements de présentation au public à caractère fixe ou mobile « sont originaires et proviennent d'un pays tiers dans lequel aucun cas de fièvres hémorragiques simiennes (fièvre de Crimée-Congo, fièvre jaune, fièvre de Mayaro, maladies à virus Ebola, maladie de Marburg, maladie à virus Kungunya) n'a été constaté au cours des deux dernières années ». Pour la maladie à virus Chikungunya, la lecture du texte est parfois rapide par le vétérinaire du pays exportateur.

III- Les mesures à prendre en cas de découverte d'animal positif

La fièvre de Crimée-Congo, la fièvre de Mayaro, la fièvre jaune, et la maladie à virus Chikungunya ne sont pas à l'heure actuelle en France des maladies légalement réputées contagieuses ou à déclaration obligatoire, à ce titre il n'existe pas de réglementation précise régissant le cas où un animal vivant en France est découvert comme infecté par l'un de ces virus. Le diagnostic d'infection peut être réalisé par une épreuve de dépistage sérologique ou par détection du virus, de ses antigènes ou de son génome chez cet animal selon l'agent incriminé.

Par contre, les maladies à virus Ebola et maladie de Marburg sont des maladies réputées contagieuses (MRC) et doivent donc en cas de suspicion être déclarées au DDPP.

IV- Les laboratoires et experts de référence (Kaandorp 2004)

❖ Maladie de Marburg :

- CDC Atlanta/ Georgia, USA

- NRZ für tropische infektionserreger am
Bernhard-Nocht-Institut für
Tropenmedizin
Robert-Koch-Str. 74
D 20359 Hamburg
Phone: 040-42818-401
Fax: 040-42818-400
e-mail: Schmitz@rrz.uni-hamburg.de

- Konsiliarlaboratorium für Bunyaviren
und Filoviren, Institut für Virologie
Philipps-Universität Marburg,
Robert-Koch-Str.17
D 35037 Marburg
Tel.: 06421/ 286 6253/ 6254
Fax: 06421/ 286-8962
e-mail: klenke@mail.uni-marburg.de
slenczka@mail.uni-marburg.de

Experts à consulter :

- Prof. Dr. B. Fleischer, NRZ, Hamburg
Prof. Dr. H. Schmitz, NRZ, Hamburg
Prof. Dr. H. Klenk, Konsiliarlaboratorium Marburg

❖ Ebola :

- MZD für tropische infektionserreger

amBernhard-Nocht-Institut für
Tropenmedizin
Berhard Nocht-Str. 74
20359 Hamburg
Phone: 040-42818-401
Fax: 040-42818-400
e-mail: MZD@bni-hamburg.de

- CDC Atlanta/ Georgia, USA

- The Simian Diagnostic Laboratory at
Virus Reference Laboratories, Inc
7540 Louis Pasteur Road
SAN ANTONIO/ Tx. 78229
Tel.: (210) 614-7350
Fax: (210) 614-7355

Experts à consulter :

Prof. Dr. B. Fleischer, NRZ, Hamburg
Prof. Dr. H. Schmitz, NRZ, Hamburg

- **Fièvre hémorragique de Crimée-Congo : laboratoire de référence de l'OIE**

- Dr Michèle Bouloy
Unité de génétique moléculaire des Bunyavirus, Département de Virologie, Institut
Pasteur
25 rue du Dr Roux
75724 Paris cedex 15
FRANCE
Tel: (33.1) 40.61.31.57 Fax: (33.1) 40.61.31.51
Email: [E-mail: mbouloy@pasteur.fr](mailto:mbouloy@pasteur.fr)

- **Fièvre jaune:**

➤ Nationales Referenzzentrum für
tropische infektionserreger am
Bernhard-Nocht-Institut für
Tropenmedizin
Robert-Koch-Str. 17
D 20359 Hamburg
Phone: 040-42818-401
Fax: 040-42818-400
e-mail: MZD@uni-hamburg.de

Experts à consulter :

Prof. Dr. B. Fleischer, NRZ, Hamburg

Prof. Dr. H. Schmitz, NRZ, Hamburg

La réglementation actuelle impose un niveau de biosécurité de niveau 4 pour la maladie d'Ebola, de Marburg et la Fièvre Hémorragique de Crimée-Congo et donc de travailler en laboratoire P4. Il est donc possible d'envoyer les prélèvements au laboratoire Jean Mérieux.

Laboratoire Jean Mérieux INSERM
21, avenue Tony Garnier
69007 Lyon

Le diagnostic est réalisé par la mise en évidence du génome par amplification génique, le diagnostic est alors réalisé en quelques heures mais n'est applicable qu'en période aiguë de la maladie. A un stade plus tardif, le laboratoire peut mettre en évidence des anticorps spécifiques de type IgM par technique ELISA ou par immunofluorescence.

De plus, le Bernhard-Nocht-Institut en Allemagne est un laboratoire de référence pour l'ensemble des six fièvres hémorragiques simiennes.

NRZ für tropische Infektionserreger
am Bernhard-Nocht-Institut
für Tropenmedizin
Bernhard-Nocht-Str. 74
20359 Hamburg
Telefon: 040/ 42818-401
Telefax: 040/ 42818-400
E-mail : Labordiagnostik@bni-hamburg.de

Les différents tests utilisés sont :

- IgG par immunocapture ELISA
- IgM par immunocapture ELISA
- Culture
- PCR.

PROPHYLAXIE ET TRAITEMENT

I- Prophylaxie

a) Virus Ebola

Chez l'animal :

Le CDC a édicté un certain nombre de règles pour la manipulation des primates durant le transit et la quarantaine. La « compliance » à ces règles est obligatoire aux USA pour importer des primates. Une quarantaine de 31 jours est obligatoire. Il est indispensable de présenter une sérologie négative, contre ce type de virus pour pouvoir faire sortir les primates de quarantaine. Si la sérologie est positive pour un des animaux d'un lot, la quarantaine doit se prolonger pour tout le lot, afin de détecter d'éventuelles séroconversions. Les mesures de sécurité édictées par le CDC sont des mesures classiques conseillées pour la manipulation d'animaux de laboratoire. Il est surtout important de ne pas mélanger les animaux en quarantaine à d'autres animaux. Une attention est portée à la manipulation des cages contenant les animaux. Des gants en cuir et des vêtements de protection résistants doivent être portés. Ces cages doivent être physiquement séparées de celles contenant d'autres animaux pendant la durée du transport. Elles ne doivent pas présenter de parties tranchantes ou susceptibles de provoquer des blessures. Les animaux ne doivent pas être manipulés directement. Ils doivent être sortis des cages uniquement en présence d'un vétérinaire. Tous les traitements administrés aux animaux doivent être notés. Une trace de tous les animaux passant en quarantaine doit être conservée (n° de lot, maladie, injection, pays d'importation). Chaque animal doit être identifié par un tatouage.

Chez l'homme :

- Avant tout, il faut éviter la transmission interhumaine :
 - isoler les malades (les soins doivent être effectués dans des lieux isolés),
 - être prudent avec le matériel servant à soigner les malades,
 - le personnel soignant doit être qualifié, en nombre limité et muni de vêtements lui assurant une protection intégrale.
- Respect des règles d'hygiène :
 - ne pas manger, fumer, boire ou entreposer des aliments dans l'animalerie,

- lavage des mains après manipulation et en fin de poste,
- tenue de travail personnelle changée tous les jours,
- port de gants et de masque pour le nettoyage des cages et le changement de la litière.

➤ Vaccination

Un vaccin a récemment été montré efficace chez le macaque

b) Le virus Marburg

Chez l'animal :

- Tous les singes contaminés sont euthanasiés et leurs cadavres (carcasse, viscères, liquides organiques) sont détruits.
- Etre prudent lors de la manipulation du sang et des organes des singes contaminés.
- Les animaux doivent être en bonne santé (quarantaine sur le lieu de capture avant l'exportation)
- Le transport doit être direct, sans escale, et sans aucun contact avec d'autres animaux
- Les cages doivent être de taille correcte et conçues pour éviter que les animaux se blessent.
- Un confinement maximum doit être observé lors des transbordements.
- A l'arrivée une quarantaine minimum de 6 semaines doit être pratiquée.

Chez l'homme

Déclaration immédiate et systématique de toute atteinte humaine.

Les euthanasies, les autopsies, les préparations de culture doivent se faire avec beaucoup de précaution : le personnel doit porter un masque, des gants, des lunettes. Le niveau de sécurité microbiologique requis pour la manipulation de ce virus est celui du groupe 4.

➤ Vaccination

Aucun vaccin n'existe actuellement.

c) Fièvre hémorragique Crimée-Congo

Contrôle de la population de tiques :

- traiter l'environnement et les aires de jeux
- connaissance du statut sérologique des hôtes par enquêtes sérologiques et isolement des virus dans les populations de tiques.

Vaccination

Pas de vaccination ni de chimioprévention actuellement disponibles.

d) Fièvre de Mayaro

En zone d'endémie, les moyens de protection sont les vêtements, les moustiquaires et les panneaux grillagés aux portes et aux fenêtres afin d'empêcher les moustiques de pénétrer dans les locaux d'élevage.

e) Maladie à virus Chikungunya

En zone infectée

- Supprimer les vecteurs (réduire la population vectrice) : *A. aegypti*, *A. albopictus*
- Epannage aérien d'insecticides à très bas volume dans les zones urbaines et péri-urbaines (Inde).
- Réduction du nombre de gîtes larvaires par application de traitement larvicides (ex : téméphos).
- Elimination des déchets urbains retenant l'eau tels que les vieux pneus et les récipients ménagers.
- Introduction d'agents de lutte biologique comme *Bacillus thuringiensis*.

Chez l'homme

- Respect des précautions de laboratoire
- Utilisation de répulsif contre les vecteurs
- Aménagement des maisons (installation de moustiquaires).
- Les piqûres sont en période diurne.

Vaccination

Il existe un vaccin vivant atténué expérimental aux USA. Utilisation de sérum de plasma ou de gammaglobulines possible.

f) Fièvre jaune

Sanitaire

- En zone infectée
 - Supprimer les vecteurs (réduire la population vectrice)
 - Utilisation d'insecticides non ou peu toxiques (coûteux)
 - Des agents bactériens
 - Des prédateurs
 - Suppression des gîtes potentiels non indispensables (récipients abandonnés, pneus...)
 - Moyen de contrôle en zone d'endémie : utilisation des primates gardés en cage, en milieu forestier qui servent de sentinelles : leur pathologie, leur mort et l'isolement du virus en cause permettent aussi de surveiller la résurgence de telles affections. On réalise des prélèvements hématologiques, on réalise des sérologies et des coprologies sur les sentinelles.
 - Lutter contre des hôtes : les faire disparaître ou les vacciner. Pour les empêcher de s'approcher des habitations, on peut créer des zones tampons pour empêcher les singes de parvenir jusqu'aux zones habitées.

Protection de l'homme

- Respect des précautions de laboratoire
 - Utilisation de répulsif contre les vecteurs
 - Aménagement des maisons (moustiquaires...)
 - Règles d'hygiène de base dans l'animalerie
 - Ne pas manger, fumer, boire ou entreposer des aliments
 - Se laver les mains après chaque manipulation
 - Changer sa tenue de travail quotidiennement
 - Port de gants
 - Port de masque lors du nettoyage des cages et du changement de la litière.
 - En zone indemne
 - Les primates non humains importés doivent subir une quarantaine dans un enclos avec double moustiquaire pendant 9 jours et un transport dans une cage désinsectisée.
- Si l'animal meurt dans les dix jours qui suivent son arrivée, il doit être autopsié pour vérifier l'absence de lésions de fièvre jaune.
- Interdire l'introduction d'animaux en provenance des zones infectées.
 - Faire attention aux vecteurs sauvages incontrôlables comme les oiseaux migrateurs.

Vaccination

Avec un vaccin de choix 17D produit sur embryon de poulet.

C'est un vaccin à virus vivant atténué, lyophilisé assurant une protection de longue durée (on fait le rappel tous les dix ans).

➤ Remarques

- 73% des personnes vaccinées ont une sérologie positive ; cela est suffisant en cas d'épidémie mais non contre les cas sporadiques.

- On ne doit pas l'utiliser chez la femme enceinte.

- Il est apparu des encéphalites consécutives à la vaccination.

Ne pas se vacciner le même jour contre la fièvre jaune et contre un autre arbovirus du même groupe sinon le taux d'anticorps vaccinaux est moindre.

- La persistance des anticorps neutralisants après une dose vaccinale du virus 17D est longue (16 voire parfois 19 ans après l'injection).

- Utilisation de sérum de plasma ou de gammaglobulines possible

II- Traitement

Il n'existe pas de traitement pour ces maladies chez les animaux. On peut tenter un traitement symptomatique dans le cas de la fièvre jaune (réhydratation et protecteurs hépatiques) mais cela reste souvent illusoire.

HERPÈSVIROSE SIMIENNE DE TYPE B

Ce virus est un agent de zoonose. Le virus de l'herpès virose B du macaque est le seul herpès virus de primate connu à l'heure actuelle pour être pathogène pour l'homme. Le virus présente un neurotropisme marqué chez l'homme et est responsable d'une encéphalomyélite le plus fréquemment mortelle en l'absence de traitement. Ce virus dont la séquence entière est parfaitement connue demeure encore mystérieux, entre autre en ce qui concerne les facteurs favorisant le franchissement de la barrière d'espèce entre le macaque et l'homme, mais aussi en ce qui concerne ses facteurs de virulence chez l'homme.

La maladie animale induite par ce virus, bien que bénigne chez son hôte naturel le macaque, pose le problème du risque de transmission du virus à l'homme. Ce dernier n'est pas protégé contre le virus du macaque bien que les anticorps humains anti-HSV-1 – et anti-HSV-2 – réagissent fortement avec les virus du macaque. Il existe encore de nombreux problèmes concernant cette maladie animale. Il s'agit aujourd'hui d'une MRC.

PRÉSENTATION DE L'AGENT

I- Classification

La taxonomie internationale désigne le virus responsable de l'herpès virose B du macaque sous le nom *Cercopithecine herpesvirus 1* « CeHV-1 ». Son numéro d'identification taxonomique dans Genbank est le 10325, son nom anglais commun est « B virus ». Le CeHV-1 appartient au genre *Simplexvirus* de la sous-famille des *Alphaherpesvirinae* et est membre de la famille des *Herpesviridae*.

Synonymes du CeHV-1 : « simian herpes B », virus SHBV, « herpes virus B », « herpes B virus », « Simian herpesvirus B », « Simian herpes B virus », « Herpesvirus simiae », « Cercopithecoid herpesvirus 1 », « monkey B virus ».

Par la suite, le virus sera désigné sous l'acronyme **CeHV-1**.

Les *Alphaherpesvirinae* regroupent de nombreux agents viraux de grande importance médicale et économique chez l'homme et l'animal. Membres de la famille des *Herpesviridae*, ces virus se caractérisent dans leur structure par un génome, constitué d'une molécule d'ADN bicaténaire, entouré d'un tégument de nature protéique. L'ensemble est enveloppé d'une bicouche lipidique où viennent s'ancrer des glycoprotéines virales. Les *Alphaherpesvirinae* se distinguent des sous-familles *Beta-* et *Gammaherpesvirinae* par un cycle de multiplication court, une propagation rapide de l'infection en culture cellulaire, une lyse efficace des cellules infectées et la capacité d'établir des infections latentes au niveau des neurones des ganglions des racines postérieures médullaires sensibles.

Tableau 8 : classification des Simplexvirus

<u>Genre</u>	<u>Espèce (nom commun)</u>	<u>Espèce hôte</u>
Simplexvirus	<i>Ateline herpesvirus 1</i> (Spider monkey herpesvirus)	<i>Ateles spp.</i>
	<i>Bovine herpesvirus 2</i> (Bovine ulcerative mammillitis virus)	<i>Bos spp.</i>
	<i>Cercopithecine herpesvirus 1</i> (CeHV-1)	<i>Macaca spp.</i>
	<i>Cercopithecine herpesvirus 2</i> (SA8 ou CeHV-2)	<i>Chlorocebus aethiops</i>
	<i>Cercopithecine herpesvirus 16</i> (Herpesvirus papio 2 HVP2 ou CeHV-16)	<i>Papio spp.</i>
	<i>Chimpanzee herpesvirus</i> (nouveau virus isolé et caractérisé en 2005)	<i>Pan troglodytes</i>
	<i>Human herpesvirus 1</i> (HHV1 ou HSV-1)	<i>Homo sapiens</i>
	<i>Human herpesvirus 2</i> (HHV2 ou HSV-2)	<i>Homo sapiens</i>
	<i>Macropodid herpesvirus 1</i> (Parma wallaby herpesvirus)	<i>Macropus spp.</i>
	<i>Macropodid herpesvirus 2</i> (Dorcopsis wallaby herpesvirus)	<i>Macropus spp.</i>
	<i>Saimiriine herpesvirus 1</i> (Marmoset herpesvirus)	<i>Saimiri sciureus</i>

Parmi la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*, le genre *Simplexvirus* nous intéresse ici particulièrement. Le CeHV-1 appartient en effet à ce genre tout comme d'autres virus avec lesquels il partage de nombreuses caractéristiques génétiques, moléculaires et antigéniques. Les caractéristiques physiopathologiques de l'infection par ces différents virus chez leurs hôtes naturels respectifs sont également très proches.

II- Principaux caractères virologiques

a) Les caractéristiques structurales du virion

Comme tous les *Herpesviridae*, le CeHV-1 qui appartient au genre *Simplexvirus*, tout comme les virus humains *Herpes simplex 1* et *2*, consiste en un nucléoïde renfermé dans une capsidie entouré d'un tégument lui même enrobé dans une enveloppe.

- Le nucléoïde ou core, mesure 40 nm, et correspond à l'assemblage toroïdal de l'ADN viral et de protéines. Il montre une symétrie rotatoire et présente des fibres protéiques, sur lesquels est enroulé l'ADN viral, dont les extrémités sont ancrées à la surface interne de la capsidie. L'ADN viral est double brin et linéaire. Son poids moléculaire est d'environ $107 \pm 8,1 \times 10^6$ Da et sa taille de 156 789 paires de bases.
- La capsidie protéique, d'un diamètre de 100 nm environ, contient le nucléoïde. Elle est constituée de 162 capsomères, dont 12 pentamériques et 150 hexamériques et présente une symétrie icosaédrique.
- Le tégument, structure située entre la capsidie et l'enveloppe, est réparti de façon asymétrique autour de la nucléocapsidie.
- La structure la plus externe, l'enveloppe, confère une morphologie sphérique au virus. Elle présente l'apparence d'une bicouche lipidique trilamellaire typique des membranes cellulaires. Elle est en fait arrachée à la cellule hôte lors du bourgeonnement viral. Des glycoprotéines virales sont ancrées dans l'enveloppe formant de nombreuses protubérances ou spicules d'environ 8 nm. La taille des particules virales enveloppées peut varier de 160 à 180 nm.

Certaines capsides apparaissent vides, d'autres contiennent un nucléoïde dense aux électrons de forme toroïdale et correspondent à des nucléocapsides.

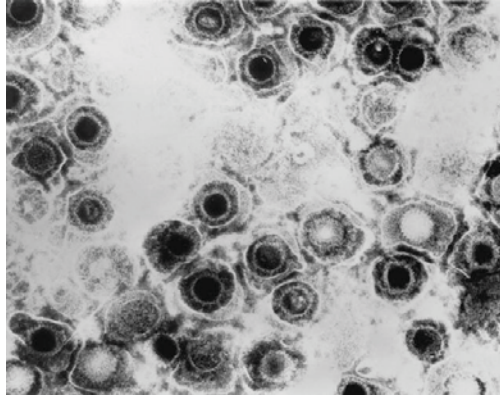


Illustration 5 : Herpès simplex virus

(Micrographie de Centers for Disease Control and Prevention, the United States Department of Health and Human Services, 1981)

Le virus demeure viable dans la salive du singe, dans le tissu nerveux central et dans les cultures de cellules de rein de singe 7 jours à 37°C. Le virus est stable dans un milieu de culture cellulaire d'un pH 7,2 à 4°C pendant au moins 8 semaines et sur une longue période à -80°C sans chute significative du titre infectieux. Une congélation du virus à -20°C ou à -72°C induit une diminution du titre infectieux d'environ 2 log (Krech 1954).

Le pouvoir infectieux du virus requiert l'intégrité de l'enveloppe qui est très sensible à la dégradation par les solvants des lipides et par les solutions de détergents. Le virus est sensible également aux ultraviolets, à l'exposition à un pH acide ou basique, à l'hypochlorite de sodium 1% (eau de Javel dilué au 1/10), à l'éthanol à 70%, au glutaraldéhyde à 2%, au formaldéhyde. Par ailleurs le virus est inactivé par la chaleur (50-60°C pendant 30 minutes). En conclusion, la décontamination de tout matériel souillé par le virus est relativement aisée du fait de la fragilité du virus qui sera détruit par désinfection chimique ou par la chaleur (vapeur, incinération).

b) Le génome

Perelygina et de ses collaborateurs (Perelygina 2003), ont caractérisé pour la première fois la séquence complète du génome du CeHV-1 ce qui a permis l'analyse comparative avec les séquences des HSV humains de type 1 et 2 et facilite toutes les études génétiques et moléculaires menées sur le CeHV-1. La composition en bases G+C du génome du CeHV-1 est de 74.5% contre 67-68% pour les virus herpès simplex humains (HSV). La composition en

G+C est plus élevée dans toutes les régions du CeHV-1 en comparaison des HSV de type 1 et 2 (HSV-1 et HSV-2). Le CeHV-1 démontre la teneur la plus élevée en G+C parmi les herpèsviridés connus. Cette grande richesse du génome en bases guanines et cytosines aura de fortes répercussions sur toutes les réactions de PCR tentées sur l'ADN viral. Tout d'abord la conception d'amorces spécifiques sera plus difficile en raison de la présence de nombreux enchaînements de guanines ou cytosines tout au long du génome viral mais aussi en raison de la haute température de fusion des deux brins de l'ADN viral (fort TM). L'adjonction de produits, comme la bêtaïne, capables de favoriser la fusion des deux brins, est le plus souvent nécessaire (Hirano 2000).

En dehors de ces répercussions sur la manipulation *in vitro* du génome viral (PCR, séquençage), la richesse en G et C a pour conséquence une richesse en motifs CpG. Cette richesse est responsable de la forte affinité des fragments de génome viral pour le récepteur TLR9. Cette propriété fait que les virus du groupe herpès simplex sont parmi les virus les plus forts inducteurs de la synthèse d'interféron alpha par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Hochrein 2004, Lund 2003).

c) Les protéines virales

Les protéines du CeHV-1 ont été caractérisées par des techniques classiques (Western blot en particulier) avant que la connaissance du génome viral permette l'étude de leur structure primaire. Il existe une grande similitude entre les protéines du CeHV-1 et celles des virus herpès simplex humains. Cette similitude est le miroir moléculaire des similitudes observées entre les maladies humaines induites par les HSV et la maladie induite par le CeHV-1 chez le macaque. Les différences observées entre les différentes maladies font s'interroger sur les bases moléculaires du tropisme électif de ce virus pour certains territoires cutanéomuqueux (Perlegyna 2003).

d) La variabilité génétique du CeHV-1

Il existe différents génotypes de CeHV-1 au sein de la population de macaque répartis suivant les espèces de macaque. Cependant actuellement il n'existe aucune preuve scientifique en faveur d'une corrélation entre la virulence des différentes souches virales, vis-à-vis de l'homme ou de l'animal, et leur génotype (Smith 1998). Dans le doute, et en l'état

actuel des connaissances, la gestion du risque infectieux liée à la manipulation des macaques, de leurs fluides ou de leurs tissus devra donc être la même que l'espèce de macaque soit le rhésus ou une toute autre espèce.

Dans le cas des zoos et animaleries de primates, le côtoiement d'espèces de primate d'origines diverses peut amener à des contaminations d'une espèce de macaque par une souche de CeHV-1 qu'elle ne côtoie pas dans la nature. Il faut surtout noter que d'autres espèces de primates que les macaques peuvent, dans ce contexte, être contaminées par le virus, en particulier les singes du nouveau monde chez lesquels le virus est pathogène avec des méningo-encéphalites mortelles.

III- Pathogénie

La primo-infection par le CeHV-1 chez le macaque est similaire à celle qui est décrite pour les HSV chez l'homme. Lors d'un premier contact avec le virus (primo-infection symptomatique ou asymptomatique), le virus pénètre la muqueuse buccale ou génitale à la faveur d'une microabrasion, à la suite d'un contact direct avec des sécrétions infectées ou avec une surface muqueuse. D'après une étude menée par Gosztonyi, l'infection par le CeHV-1 chez la souris est suivie d'un cheminement centripète du virus vers le système nerveux central qui est tout au long de ce parcours strictement restreint aux structures nerveuses. Pendant l'infection primaire, les particules virales infectent les terminaisons nerveuses sensibles correspondantes au territoire tissulaire impliqué lors de l'infection. Le virus, sous la forme de capsides virales, gagne enfin par cette voie rétro-axonale le corps neuronal des ganglions sensitifs (trigéminals, sacrés) où se produit une multiplication virale dans certains neurones permissifs (Gosztonyi 1992). Le virus peut aussi se propager d'un neurone à l'autre grâce aux connexions naturelles du neurone infecté c'est à dire grâce aux synapses de celui-ci. Ce transport trans-synaptique se produit d'une manière antérograde et rétrograde. Le transport rétrograde se produit lors des récurrences de la maladie. Le transport antérograde lorsqu'il affecte le système nerveux central peut aboutir au développement d'une encéphalomyélite.

Suite à l'infection primaire, il va s'établir une infection latente qui commence environ dix jours après le début de l'infection et va durer toute la vie : le ganglion trigéminal et les ganglions sacrés en sont les sites les plus fréquents (Vizoso 1975, Weigler 1995). Cet état de

latence caractérisé par une persistance du génome viral dans certains neurones représente pour le virus l'avantage d'échapper à la réponse immune et aux drogues antivirales qui n'agissent que sur la réplication virale (par voie de conséquence le traitement antiviral est bien incapable d'éradiquer les virus tapis dans les neurones où ils ne se multiplient pas).

Il a été montré qu'il existait, dans certaines circonstances, une possibilité de réactivation d'une infection ganglionnaire latente qui est à l'origine des récurrences herpétiques cutanéomuqueuses. Chez le macaque, les réactivations ont lieu à la faveur de divers stress comme la mise bas (Anderson 1994), la quarantaine et les manipulations des animaux en captivité (Zwartouw 1984), lors du pic d'activité sexuelle lors de la période de reproduction. La réactivation virale est particulièrement rythmée par le cycle reproductif chez les macaques rhésus et ceux du Japon avec un pic d'activité en novembre (Huff 2003). Chez le macaque crabier qui présente une activité reproductrice moins rythmée, ce pic est moins facile à mettre en évidence.

Des données récentes suggèrent la présence de facteurs à demi-vie brève, capables d'exercer un effet inhibiteur sur la réactivation comme le facteur de croissance neuronal (NGF) (Rozenberg 2002).

DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES

Sabin a décrit pour la première fois, en 1934, une maladie mortelle survenue chez un jeune médecin accidentellement mordu par un macaque rhésus. Sabin montra qu'elle était due à un virus auquel il donna le nom de virus B, B étant l'initiale de la première victime humaine connue (Toma 2006 et Sabin 1934).

I- Répartition géographique

En Inde 73 % de la population posséderait des anticorps antitherpesvirus. 25 % à 60 % des macaques sauvages adultes sont séropositifs. En Asie du sud-est (Acha 2005).

II- Espèces sensibles

a) Les espèces concernées naturellement

L'infection par le CeHV-1 a été décrite principalement chez les macaques rhésus (*Macaca mulatta*) et les macaques crabiers (*Macaca fascicularis*), deux espèces particulièrement utilisées dans la recherche biomédicale. Le CeHV-1 a été également isolé chez le macaque à face rouge ou macaque brun (*Macaca arctoides*), le macaque à queue de cochon (*Macaca nemestrina*), le macaque japonais (*Macaca fuscata*), le macaque bonnet chinois (*Macaca radiata*), et le macaque de Formose (*Macaca cyclopis*) (Weigler 1992). Il a également été montré l'infection de macaques du Tibet (*Macaca thibetana*), de macaques à queue de lion (*Macaca silemus*) et de macaques de Tonkean (*Macaca tonkeana*).

Il existe toute fois une colonie de macaques crabiers indemne de toute infection par le CeHV-1. La colonie de macaques crabiers isolée sur l'île Maurice est en effet indemne de toute infection par le CeHV-1, à tel point qu'il n'est pas nécessaire de réaliser de test sérologique anti-CeHV-1 avant l'importation de ces animaux en France. Il faut toutefois être prudent une fois ces animaux arrivés en France et éviter tout contact entre ces animaux et des macaques d'une autre origine car ces animaux sont tout à fait sensible à l'infection par le CeHV-1.

b) Les espèces sensibles en captivité ou expérimentalement

Il a cependant été décrit de nombreuses infections par le CeHV-1 chez d'autres espèces de singes, pour lesquelles cette infection est fréquemment fatale. Une infection accidentelle a ainsi été décrite chez huit cercopithèques de Brazza (*Cercopithecus neglectus*) probablement contaminés par des macaques à queue de lion (Thompson 2000), chez trois singes patas ou singes rouges (*Erythrocebus patas*) et chez un colobe à épaules blanches (*Colobus abyssinicus*) ayant été en contact avec des macaques rhésus dans des zoos nord-américains (Loomis 1981). Enfin il a été décrit l'infection accidentelle d'une autre espèce de singes du Nouveau-Monde des singes capucins sajou apelle (*Cebus apella*) probablement contaminés par des macaques rhésus dans un laboratoire de recherche allemand (Coulibaly 2004). Il a également été étudié l'infection expérimentale par le CeHV-1 chez ces espèces de singes du Nouveau Monde. Cette infection expérimentale aura induit une maladie neurologique fatale chez au moins deux espèces de singes du Nouveau Monde, des singes capucins sajou apelle (*Cebus apella*) et des ouistitis (*Callithrix jacchus*) (Weigler 1992).

Il a enfin été étudié l'infection expérimentale et il en ressort que l'animal le plus sensible décrit jusqu'à présent est le lapin.

III- Transmission

a- Les sources de contamination

Animaux malades (salive, sécrétions génitales).

Animaux infectés latents doivent être considérés comme potentiellement infectieux toute leur vie. Le virus résiste très peu de temps dans le milieu ambiant.

b- Modes de transmission

Transmission directe

- Transmission vénérienne (le mode le plus important)
- par morsure et griffure,
- par aérosol très rares.

La transmission verticale du CeHV-1 n'a jusqu'à présent pas été clairement démontrée. En effet les nouveau-nés ne semblent pas être porteur du virus et les anticorps anti-CeHV-1 présents chez eux sont d'origine maternelle et décroissent avec le temps.

Transmission indirecte

- Aliments souillés, matériel : très rare car le virus ne vit pas dans l'environnement.

EXPRESSION CLINIQUE

I- Les signes cliniques de la forme classique chez le macaque

a) La primo-infection

La durée d'incubation de la maladie induite par le CeHV-1 est de 2 à 5 jours chez le macaque. Le plus souvent, les infections naturelles sont subcliniques, en effet il aura fallu plus de 25 ans après son premier isolement chez l'homme pour redécouvrir le virus chez le macaque et enfin décrire la maladie induite par ce virus chez son hôte naturel (Keeble 1960). Ainsi l'incidence exacte de l'apparitions de signes cliniques lors de la primo-infection n'est pas connue, mais plusieurs expériences d'infection de macaques séronégatifs pour les anticorps anti-CeHV-1 ont montré que fréquemment les animaux s'infectaient par le virus puis excrétaient celui-ci localement dans leurs sécrétions muqueuses et se séroconvertissaient sans l'apparition d'aucun signe clinique locaux détectables (Lees 1991).

L'infection peut également se traduire par un syndrome fébrile et des symptômes locaux. Parfois les lésions locales s'accompagnent d'une réaction générale passagère et bénigne sous la forme de lymphadénopathies et d'un syndrome fébrile avec anorexie, faiblesse et irritabilité des animaux. L'isolement du virus dans la cavité buccale des animaux infectés expérimentalement est possible dès 6 heures post-infection alors qu'il n'y a aucun signe clinique (Lees 1991).

b) La latence virale et les récurrences par réinfection endogène

Elle est de règle dans la forme classique. Comme pour les virus herpès simplex chez les humains, le CeHV-1 peut devenir latent dans les ganglions sensoriels et causer des infections récurrentes chez les macaques. L'excrétion intermittente du virus dans la salive peut être accompagnée de lésions locales de type herpétiques, mais se produit très fréquemment chez les singes de manière totalement asymptomatiques (Huff 2003).

Les signes cliniques de la maladie peuvent être observés chez le macaque lors de la primoinfection mais également lors de récurrences de la maladie. Lors des récurrences, les animaux ne présentent le plus souvent aucune altération de l'état général en dehors parfois

d'une légère hyperthermie, d'un léger jetage nasal mucopurulent qui disparaît après une dizaine de jours, d'une conjonctivite d'intensité variable ou enfin d'une diarrhée. Ces signes cliniques peuvent être accompagnés de lésions souvent discrètes voire indétectables au niveau oral, génital, oculaire et rarement cutané (Keeble 1960).

II- Aspect lésionnel

Les lésions sont identiques dans la phase de primo-infection et lors des phases de récurrence.

a) Sur le plan macroscopique

L'infection primaire de type buccal induit une gingivo-stomatite caractérisée par l'apparition de vésicules simples ou multiples qui se rompent en 3 ou 4 jours, laissant place à des ulcères. Ces ulcères mesurent de 5 millimètres à 2 centimètres de diamètre et jusqu'à 5 millimètres de profondeur. Les ulcères se développent rapidement en lésions fibrinonécrotiques qui forment une croûte hémorragique sur la lèvre ; dans la cavité buccale les lésions restent blanches et semblent fibrineuses. Les lésions intra buccales sont localisées le plus souvent sur la face dorsale de la langue et de la muqueuse buccale et au niveau de la jonction cutanéomuqueuse des lèvres. Les lésions peuvent également apparaître sur la peau et la conjonctive. Les lésions liées à l'infection primaire n'induisent généralement que des signes localisés légers chez les singes et guérissent par granulation sans laisser de cicatrice en 7 à 14 jours. Les signes cliniques de l'infection primaire sont habituellement légers et dans la plupart des cas ces signes sont indétectables. L'infection secondaire des lésions par des bactéries et des mycètes se produit parfois, aggravant alors les lésions et ralentissant la guérison de celle-ci (Weigler 1992).

b) Sur le plan microscopique

L'examen histologique des tissus lésionnels montre que les lésions induites lors de l'infection par le CeHV-1 ressemblent à celles induites lors de l'infection par les virus herpès simplex chez les humains. Ces lésions ressemblent à celles observées dans les cultures cellulaires et sont caractérisées par une dégénérescence par ballonnisation (arrondissement du

noyau et effondrement du cytoplasme avec apparition d'une forte réfringence) des cellules épithéliales, par une infiltration leucocytaire, par la formation de syncytiums, par la nécrose des cellules épithéliales et par la présence des corps d'inclusion intranucléaires éosinophiles dans les cellules en début de phase de dégénérescence (Keeble 1960, Anderson 1994, Weigler 1992). Une inflammation légère peut également être présente et varie en fonction du degré d'infection secondaire de lésions.

L'étude histologique du système nerveux central de macaques infectés par le CeHV-1 montre, dans 75% des cas, un engorgement leucocytaire des vaisseaux et une réaction inflammatoire microgliale dans la région des racines des nerfs trijumeaux et faciaux, ainsi que sur le trajet descendant de ces nerfs, il n'a cependant pas été noté de modification des neurones dans les régions atteintes (Keeble 1960).

III- Formes cliniques atypiques

Bien que l'infection par le CeHV-1 soit peu pathogène pour son hôte naturel voire le plus fréquemment asymptomatique, certains cas de maladie mortelle due au CeHV-1 ont été répertoriés chez le macaque. Plusieurs cas d'infection disséminée par le CeHV-1 ont été décrits chez des macaques rhésus et crabiers. Ces formes systémiques sont particulièrement graves et souvent mortelles.

Il existe ainsi différentes formes atypiques de l'infection par le CeHV-1 :

- une forme généralisée (Simon 1993)
- une forme encéphalitique (Daniel 1975)
- une forme ophtalmique grave (Anderson 1994)
- des formes aggravées par une immunodépression.

MÉTHODES DIAGNOSTIQUES

I- Sérologie

a) Tests de neutralisation, RIA, Western Blot et ELISA

i) Test de neutralisation

Cette méthode est la méthode historique de sérodiagnostic. Elle permet également d'obtenir un résultat sérologique qualitatif. En effet, seuls les anticorps neutralisants pour le CeHV-1 sont détectés par cette technique. Cette méthode présente donc l'avantage d'une bonne spécificité mais souffre d'une sensibilité plus faible que les méthodes radio-immunologiques ou ELISA.

Le test de neutralisation reste un test de référence à l'heure actuelle, cependant sa mise en oeuvre reste lourde en raison de la pathogénicité du CeHV-1 et sa réalisation nécessite un laboratoire d'un niveau de confinement 3.

ii) Dosages radio-immunologiques

L'équipe de Lees (Lees 1991) a mis au point un test sérologique fondé sur la technique du dosage radio-immunologique pour détecter la présence d'immunoglobuline anti-CeHV-1 de la classe de IgM et IgG d'une manière quantitative et qualitative.

Cette même équipe utilisa également un test radio-immunologique compétitif. Ainsi ils ont pu démontrer que ce type de test permettait d'obtenir des résultats comparables à ceux obtenus avec le test de séroneutralisation.

iii) Le Western Blot

Première technique ayant permis de distinguer les sérums contenant des anticorps spécifiques du CeHV-1 de ceux contenant des anticorps spécifiques d'autres *Simplexvirus*. Technique lourde à mettre en oeuvre, qui n'est pas la plus sensible mais qui demeure la technique de référence pour l'identification des anticorps dépistés.

iiii) Les tests ELISA

La méthode ELISA est à l'heure actuelle la méthode la plus rapide pour le diagnostic sérologique du CeHV-1. Cette méthode est également facile à mettre en oeuvre et très sensible.

D'une manière générale, la méthode ELISA pour le diagnostic sérologique du CeHV-1 suit le principe suivant :

- adsorption sur une plaque ou une bille des antigènes viraux, incubation des sérums de macaque à tester et fixation des anticorps spécifiques du CeHV-1 sur les antigènes présents.
- les anticorps de macaques fixés sur les antigènes viraux sont ensuite détectés par un système couplé à une enzyme (le plus souvent une anti-immunoglobuline humaine).
- révélation de la fixation des anticorps de macaque sur les antigènes par adjonction du substrat de l'enzyme puis quantification de la réaction enzymatique.

Le test ELISA est la méthode la plus sensible mais ne permet pas de différencier les sérums contenant des anticorps spécifiques du CeHV-1 de ceux contenant des anticorps spécifiques d'autres Simplexvirus. Ce test n'est donc pas très adapté au diagnostic sérologique chez l'homme, mais convient au diagnostic sérologique chez le macaque. De ce point de vue l'utilisation de tests ELISA basés sur des antigènes extraits de virus herpès proches de CeHV1 (SA8, Herpes papio virus 2 et HSV) pour tester les sérums de macaques se sont avérés tout à fait satisfaisants pourvu que le test donne des performances égales à celle de l'ELISA basé sur l'utilisation d'antigènes du virus CeHV1.

➤ **Les antigènes utilisables pour la recherche des anticorps anti-CeHV-1 chez les macaques**

La production d'extraits antigéniques issus de cultures cellulaires du CeHV1 pour leur utilisation dans le Western Blot ou l'ELISA est bien entendu la meilleure solution afin de préparer un test de qualité. Cependant les risques sanitaires et la nécessité d'utiliser un laboratoire P3, qui accompagnent la culture de ce virus ont amené de nombreux virologistes à tester des extraits antigéniques provenant d'autres *Simplexvirus* proches du CeHV1.

Des tests ELISA basés sur les antigènes de SA8 (Takano 2001), de HSV-1 ou de HVP-2 (Ohsawa 1999) ont été testés et ont permis d'obtenir d'excellents résultats en

comparaison avec un test ELISA basé sur le CeHV-1. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que le SA8, le HSV-1 et le HVP-2 sont des virus présentant une sécurité de manipulation beaucoup plus grande que le CeHV-1 (niveau de confinement biologique 3). Il existe toutefois un grand avantage dans l'utilisation de HSV-1 qui réside principalement dans la disponibilité de nombreux kits commerciaux. Ces kits ELISA présentent en effet l'avantage d'être validés et certifiés mais permettent aussi de s'affranchir totalement de toute manipulation de virus pour la préparation d'extraits antigéniques.

Coutrot et al. (2007) ont testé les performances d'une trousse commercialisée pour le dépistage et la quantification des IgG humaines anti-HSV1 et anti-HSV2 : le kit COBAS CORE Anti-HSV-I/II EIA® de Roche Diagnostic GmbH (D-68298 Mannheim). Ce test est un dosage d'anticorps immunoenzymatique indirect en phase solide sur bille de polystyrène revêtue d'antigènes. Le test est pris en charge par un automate (Cobas Core II) qui assure le pipetage des échantillons et toutes les étapes d'incubation, de lavage de la bille et de lecture de la réaction. Ce test révèle la fixation des anticorps par des anti-IgG humaines produits chez la chèvre. Ces réactifs donnent d'excellents résultats avec les IgG de macaque (Coutrot 2007).

La sensibilité et la spécificité du test ont été évaluées par rapport aux résultats sérologiques obtenus sur les mêmes sérums par différents laboratoires de référence. Au total, ils ont ainsi étudié dans ce test la réactivité de 328 sérums de macaque de statut sérologique connu.

L'analyse des résultats des tests sérologiques herpès réalisés chez le macaque démontre que le test ELISA Cobas Core II commercialisé pour le dépistage des anticorps anti-HSV chez l'homme, permet une détection efficace des anticorps anti-CeHV1 dans les sérums de macaque.

Toujours pour des raisons de sécurité, il a été produit des glycoprotéines recombinantes du CeHV1 et testé leur potentiel diagnostique. Les glycoprotéines B, C, E et G ont ainsi été produites par des cellules d'insecte (Sf-9) grâce à système d'expression utilisant un baculovirus et la glycoprotéine D a été produite par des cellules de hamster (CHO).

Il en ressort que les tests utilisant les glycoprotéines B, C, D, et G ont un potentiel diagnostique élevé pour le sérodiagnostic de l'infection par le CeHV1 chez les macaques, tandis que la glycoprotéine G peut être un antigène valable pour la discrimination entre les anticorps induits par le CeHV1 et ceux induits par d'autres alphaherpèsvirus étroitement liés comme HSV1 et 2 chez l'homme (Perelygina 2005).

b) Problèmes posés par la sérologie

Le diagnostic de l'infection par le CeHV1 chez les macaques par l'intermédiaire d'un test sérologique peut parfois poser problème. Quelle que soit la méthode mise en œuvre pour la recherche des anticorps, le résultat ne reflète pas directement la présence du virus chez un animal. Il existe des résultats faussement positifs ou faussement négatifs.

i) Les sérologies faussement négatives

Il apparaît à la lumière de quelques cas (Anderson 1994) que des macaques peuvent être infectés par le CeHV1 bien que l'on soit incapable de détecter des anticorps sériques chez ces animaux. La sérologie ne permet donc pas, y compris grâce aux méthodes les plus sensibles comme l'ELISA, de détecter l'ensemble des animaux infectés par le CeHV1. La séroprévalence dans une population de macaques est donc différente de la prévalence de l'infection réelle par le CeHV1.

ii) Les sérologies faussement positives

Les tests sérologiques nécessitent l'emploi d'antigènes viraux. Or ces antigènes viraux ne peuvent être produits qu'à partir de culture cellulaire. Pour utiliser ces antigènes viraux, il est nécessaire de les extraire. Les antigènes viraux ainsi obtenus sont donc généralement contaminés par des antigènes provenant des cellules utilisées pour la culture. Il peut arriver que les animaux, essentiellement dans le cas de maladies auto-immunes, présentent des anticorps capables de reconnaître les antigènes contaminants d'origine cellulaire. Dans ce cas le test sérologique pourra être faussement positif.

II- Polymérisation en chaîne (PCR)

Elle peut être réalisée soit sur l'ADN extrait des prélèvements muqueux soit après mise en culture du virus contenu dans ces prélèvements. La proche parenté phylogénique du CeHV1 avec les autres Simplexvirus comme le SA8, l'HVP2, mais aussi les HSV1 et HSV2, a amené les chercheurs à proposer différentes méthodes de PCR permettant d'amplifier spécifiquement l'ADN du CeHV1.

Coutrot et al ont testé les réactions de trois PCR : PCR conventionnelle « gGS4 », PCR nichée « gC » et PCR quantitative « gB ». Les réactions de PCR “gGS4” et “gC” ont été déclarées positives lorsqu’un fragment amplifié, respectivement de 209 paires de bases et de 148 paires de bases, a pu être détecté dans le produit de PCR après électrophorèse sur gel d’agarose 1% et négatives en son absence. Comme attendu, toutes les réactions de PCR se sont révélées négatives avec l’ADN extrait des échantillons de Macaques Mauriciens (cette population est indemne du CeVH1). Ces échantillons ont alors servi de contrôles négatifs dans toutes les manipulations.

En ce qui concerne les écouvillons prélevés chez des animaux séropositifs, on observe que la quasi totalité (23 sur 24) donne un résultat positif par PCR quantitative “gB”. Sur ces vingt-quatre échantillons, douze ont été donnés positifs avec les deux techniques de PCR, PCR conventionnelle “gGS4” et PCR quantitative “gB”. Dans tous les cas on observe que le nombre de copies trouvées dans l’ADN extrait de ces écouvillons (de 0 à 400 copies) est très faible en comparaison avec l’ADN extrait des ganglions trijumeaux du macaque. Il est à noter qu’aucune des réactions de PCR nichée “gC” réalisées sur l’ADN extraits des différents écouvillons n’a donné de résultat positif, seul l’ADN extrait des ganglions trijumeaux d’un macaque séropositif issu des Phillipines a permis l’amplification du fragment d’ADN attendu.

Afin de s’assurer de la spécificité des réactions, les réactions de PCR conventionnelle “gGS4”, de PCR nichée “gC” et de PCR quantitative “gB” ont été testées sur de l’ADN viral extrait de cultures de HSV1 et HSV2. Les deux PCR, l’une conventionnelle et l’autre nichée, n’ont pas permis d’amplification sur l’ADN de HSV1 ou HSV2. La PCR quantitative s’est révélée négative avec l’ADN de HSV1 ou HSV2. Dans le cas de HSV2, les amorces ne permettent pas l’amplification de la séquence cible, et dans le cas de HSV1, il y a bel et bien amplification mais la sonde spécifique du CeHV1 n’hybride pas les fragments amplifiés à partir de HSV1 (2 mutations ponctuelles au niveau de la séquence cible de la sonde) Il apparaît donc que les réactions de PCR testées sont très spécifiques du CeHV1 et ne donnent aucune réaction avec le génome des deux HSV humains. Cela permet d’exclure toute possibilité de réaction de PCR faussement positive par contamination de l’échantillon par les HSV humains que ce soit lors du prélèvement par écouvillonnage sur l’animal ou lors de la manipulation de l’échantillon au laboratoire d’analyse.

D’après les résultats obtenus sur les écouvillons prélevés chez les animaux séropositifs, les différentes réactions de PCR ont été classées par ordre de sensibilité en fonction des résultats obtenus sur les écouvillons prélevés chez des animaux séropositifs : la PCR quantitative “gB” est la réaction la plus sensible avec 23 positifs sur 24, suit la PCR

conventionnelle “gGS4” avec 12 positifs sur 24 et enfin la PCR nichée “gC” est la réaction la moins sensible car aucune des réactions réalisée avec les écouvillons prélevés chez des animaux séropositifs ne s’est révélée positive. La spécificité de la PCR quantitative est meilleure de par l’emploi de deux amorces de PCR et d’une sonde contrairement à la PCR conventionnelle dont la spécificité ne repose que sur celle des deux amorces (Coutrot 2007).

RÉGLEMENTATION SANITAIRE

I- La réglementation actuelle sur la manipulation du virus

D'après l'arrêté du 18 Juillet 1994 (annexe 2), publié au Journal officiel de la République française le 30 juillet 1994, fixant la liste des agents biologiques pathogènes, le CeHV-1 fait partie du groupe 3 de la classification des agents biologiques. De même d'après la directive 2000/54/CE du parlement européen du 18 septembre 2000, le CeHV-1 fait également partie du groupe 3 de la classification des agents biologiques fixée par cette directive. La réglementation en vigueur concernant la manipulation des agents biologiques est régie par l'article R231-61-1 du code du travail, cet article est en vigueur depuis le 6 mai 1994.

Ainsi la réglementation française et européenne exige que toute manipulation du CeHV-1 nécessite un niveau de confinement numéro 3.

Aux USA, la réglementation actuelle recommande d'utiliser des pratiques et des équipements de biosécurité de niveau 2 pour toutes les activités comportant l'utilisation ou la manipulation des tissus, des fluides corporels et des matériaux issus de tissu ou de culture primaire de macaques. Le niveau 3 de biosécurité est requis pour les activités impliquant la manipulation de matériaux contenant ou suspecté de contenir du CeHV-1, ceci incluant la propagation *in vitro* du virus dans un but diagnostic. Le niveau 4 de biosécurité est recommandé pour la production et la manipulation de grande quantité de CeHV-1 (U.S. Department of Health and Human Services, 2007).

II- La réglementation actuelle sur l'importation des macaques concernant le CeHV-1

L'arrêté du 19 Avril 2002 (annexe 2) fixant les conditions sanitaires pour l'importation et le transit, sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outre-mer, des animaux vivants et de certains de leurs produits visés à l'article L. 236-1 du code rural, exige qu'un vétérinaire officiel certifie que tous les animaux du genre *Macaca* importés ou transitant sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outre-mer en provenance des pays tiers destinés à des établissements de présentation au public à caractère mobile, visés

par ce texte «Ont été soumis [...] à une épreuve de dépistage sérologique annuelle avec résultat négatif de l'herpès virose B [...] dans un laboratoire autorisé ou à une épreuve de dépistage sérologique avec résultat négatif de l'herpès virose B, réalisée dans les 40 jours précédant le chargement».

Ce même arrêté, exige qu'un vétérinaire officiel certifie que tous les animaux du genre *Macaca* importés ou transitant sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outremer, destinés à des établissements d'expérimentation animale, des établissements d'élevage spécialisés, des établissements fournisseurs (au sens du décret 87-848 modifié du 19 octobre 1987) et des établissements de présentation au public à caractère fixe, en provenance des pays tiers, « ont été soumis [...] à une épreuve de dépistage sérologique avec résultat négatif de l'herpès virose B [...] Cette disposition ne s'applique pas aux macaques à longue queue ou macaques crabiers (*Macaca fascicularis*) originaires et en provenance de l'île Maurice ».

Ainsi d'une manière générale, l'importation de tout animal du genre *Macaca* ne peut se faire que si l'animal a subi une épreuve de dépistage sérologique et est séronégatif pour le CeHV-1. Cette disposition n'étant pas obligatoire pour les macaques originaires et en provenance de l'île Maurice. En effet la colonie de macaques crabiers vivant sur cette île est réputée naturellement indemne de CeHV-1.

Le texte actuel précise que le vétérinaire officiel certifie que l'animal a subi une épreuve de dépistage sérologique avec résultat négatif de l'herpès virose B, réalisé dans un laboratoire autorisé. Cependant il n'existe à l'heure actuelle aucune liste de laboratoires autorisés à pratiquer ces tests. En pratique ces tests sont réalisés par certains laboratoires de référence (voir ci-après). Ces tests peuvent également être réalisés dans les pays où sont élevés les macaques (par exemple en Chine) par des laboratoires indépendants.

III- Les mesures à prendre en cas de découverte d'animal positif

L'herpès virose à CeHV-1 est à l'heure actuelle en France une **maladie réputée contagieuse**, à ce titre toute découverte d'un primate infecté vivant en France donne lieu à déclaration au préfet (DDPP) et à l'application des mesures de police sanitaire. Le diagnostic d'infection par le CeHV-1 peut être réalisé par détection du virus chez cet animal. Bien que la

sérologie soit la méthode plus sensible aujourd'hui, il n'y a pas de texte disant que la sérologie est le moyen de diagnostic reconnu (pour les MRC les méthodes de diagnostic doivent être officielles), à défaut de texte c'est la mise en évidence de l'agent pathogène qui est le moyen reconnu. L'utilisation de la sérologie seule est un abus actuellement, de plus cette méthode ne permet en aucun cas un diagnostic de certitude quant à l'infection ou non d'un animal par le CeHV-1, quelque soit le laboratoire de référence qui a pratiqué le test. Selon le décret du 17 février 2006 du Code Rural, Art. D. 223-21, alinéa II : « Les MRC sont mises en évidence dans des conditions fixées par arrêté du Ministre chargé de l'Agriculture ; en l'absence de dispositions réglementaires particulières, l'existence de la maladie est établie par isolement de l'agent pathogène, à la suite d'un examen réalisé par un laboratoire d'analyse agréé. » De même que aucun texte ne donne la conduite spécifique à tenir.

La seule méthode de diagnostic de certitude disponible actuellement reste l'euthanasie de l'animal en cause suivie de la recherche par PCR de la présence du génome du virus dans les ganglions trijumeaux et lombo-sacrés de l'animal (méthode validée à Toulouse, Countrot 2006).

L'infection par le CeHV-1 aboutie à une infection permanente de l'hôte et cet hôte peut être potentiellement excréteur de virus, y compris en l'absence de tout signe clinique. Cet animal présente donc un risque pour toute personne amenée à avoir des contacts avec celui-ci ou son environnement. Lors de la découverte de l'infection d'un animal par le CeHV-1, que ce soit un hôte naturel du virus ou non, il est conseillé de sacrifier l'animal et d'incinérer le cadavre. Les laboratoires équipés pour la virologie et l'immunologie peuvent toute fois procéder à des essais de mise en évidence du virus ou de recherche des anticorps neutralisants.

Aux USA, la réglementation actuelle recommande que toutes les colonies de macaques, même celles connues pour être exemptes d'animal séropositif pour le CeHV-1, devraient être présumées comme naturellement infectées. Les animaux avec les lésions orales suggestives d'une infection active par le CeHV-1 doivent être identifiés et manipulés avec une attention extrême. Pour les études réalisées avec des animaux infectés expérimentalement par le CeHV-1 les textes conseillent une animalerie remplissant les conditions de biosécurité de niveau 4 (U.S. Department of Health and Human Services, 2007). En France il n'existe pas de texte régissant la manipulation des animaux infectés par le CeHV-1 alors que la réglementation française et européenne limite la culture du virus en secteur protégé de type 3

Tableau 9 : Laboratoires de référence de l'herpès-virose B

Laboratoire	Tests disponibles
<p>Dr. Julia Hilliard B Virus Research and Resource Laboratory Georgia State University PO Box 4118 Atlanta, GA 30302-4118 - USA <i>Tel : (404) 651-0808</i> E-Mail: biojkh@panther.gsu.edu</p>	<p>Culture, tests sérologiques et PCR sur échantillons simiens et humains</p>
<p>Dr. David Brown Enteric, Respiratory, and Neurological Virus Laboratory Central Public Health Laboratory 61 Colindale Ave. London NW9 5HT - England <i>Tel : (44) 208-200-4400</i> E-Mail: dbrown@phls.org.uk</p>	<p>Culture, tests sérologiques et PCR sur échantillons simiens et humains</p>
<p>VRL Laboratories 7540 Louis Pasteur Drive San Antonio, Texas 78229 - USA <i>Tel : (877) 615-7275</i> <i>Fax : (877) 615-7771</i> Site Web : http://www.vrllabs.com/</p>	<p>Culture, tests sérologiques et PCR sur échantillons simiens et humains</p>
<p>BioReliance Simian Diagnostic Laboratory 14920 Broschart Road Rockville, MD 20850 - USA <i>Tel : (301) 610-2227</i> <i>Fax : (301) 610-2587</i> E-Mail: ahs@bioreliance.com Site Web: http://www.bioreliance.com/simian.html</p>	<p>Tests sérologiques sur échantillons simiens uniquement</p>
<p>Vet Diagnostics Victoria House Small Dole BN5 9XE - Henfield West Sussex - United Kingdom</p>	<p>Tests sérologiques sur échantillons simiens uniquement</p>
<p>Primate Viral Diagnostic Biomedical Primate Research Centre Lange Kleiweg 139 2288 GJ Rijswijk The Netherlands <i>Phone : +31 (0) 15.284.2855</i> <i>Fax : +31 (0) 15.284.3986</i> email : niphuis@bprc.nl</p>	<p>Tests sérologiques sur échantillons simiens uniquement</p>
<p>Shin Nakamura Department of Cellular and Molecular Biology Primate Research Institute Kyoto University Inuyama, Aichi 484-8506 - Japan</p>	<p>Tests sérologiques sur échantillons simiens uniquement</p>

En pratique, les laboratoires listés plus haut sont tous à l'étranger et deux seulement sont en Europe, il n'y a pas de laboratoire « officiel » en France. Le transport des échantillons passe pour tous les laboratoires situés en dehors de l'Union Européenne par une demande de CITES. Les procédures administratives sont lourdes et les coûts de transport onéreux. Pour faciliter le dépistage sérologique dans les laboratoires français, le laboratoire d'analyse médicale du Docteur M. Blancher-Sardou (Toulouse) propose de réaliser des tests de sérologie herpès chez le macaque.

Laboratoire d'analyse médicale, 16 Boulevard de Strasbourg, 31000, Toulouse, FRANCE

E-mail : blancher.a@chu-toulouse.fr

Tél : 05 61 32 34 32

I- Prophylaxie et prévention

a) Chez l'animal

➤ Quarantaine clinique :

La quarantaine clinique des animaux n'est pas légalement obligatoire à l'arrivée des animaux en France étant donné que ces animaux en ont déjà subi une dans leur pays d'origine avant leur importation. Cependant la réglementation impose que les animaux restent dans leur premier lieu d'accueil en France pendant une durée minimale de 30 jours. Dans la pratique cette période peut être mise à profit pour le dépistage clinique et biologique de toute affection qui mettrait en danger soit l'animal lui-même soit les animaux avec lesquels il sera en contact soit les personnels qui s'occupent de ces animaux.

➤ La sérologie anti-CeHV-1 chez le macaque :

Une surveillance du statut sérologique des macaques vis à vis du CeHV-1 est une bonne mesure de prévention du risque de contamination de l'homme par cet agent. Cette surveillance du statut sérologique des macaques vis-à-vis du CeHV-1 permet en effet d'identifier les animaux porteurs. Cependant quelque soit la nature du dépistage sérologique réalisé, et de manière indépendante du laboratoire expert qui gère ce dépistage, il existe une faible proportion d'animaux porteurs du virus mais incapables de développer un taux d'anticorps dépassant le seuil de détection sérologique.

En dehors de la période quarantaine, le dépistage sérologique du CeHV-1 peut être réalisé sur tous les animaux d'une colonie avec une périodicité qui dépendra du mode de stabulation et de la fréquence de l'introduction de nouveaux individus.

➤ La PCR CeHV-1 chez le macaque :

C'est à l'heure actuelle la méthode la plus sensible pour le dépistage du virus chez les macaques. Pour dépister le virus encore faut-il avoir une chance qu'il soit présent dans le prélèvement biologique étudié. Il y a une absence totale du virus dans les muqueuses pendant les périodes de latence infectieuse. On ne peut avoir une chance de mettre en évidence le virus

chez un animal porteur en phase de latence que dans les ganglions des racines sensitives postérieures (ce qui bien entendu n'est possible qu'en cas d'autopsie de l'animal). Les prélèvements biologiques qui peuvent être réalisés sur l'animal vivant sont des prélèvements des muqueuses et éventuellement des conjonctives oculaires par écouvillonnage.

La recherche de l'ADN viral par PCR peut être utile lorsqu'un animal présente une sérologie douteuse à plusieurs reprises ou chez les animaux séronégatifs présentant des signes cliniques en faveur d'une infection par le CeHV-1. Dans ce dernier cas soit on se situe à la période de séronégativité au début d'une primo-infection soit l'animal peut présenter un déficit immunitaire grave (parfois iatrogène) qui l'empêche de développer des anticorps anti-CeHV-1.

b) Chez l'homme

Des recommandations peuvent être faites :

- La manipulation des animaux devra se faire de façon à éviter les morsures et les griffures. Elles devront être conduites soit après tranquillisation des sujets, soit à l'aide de dispositifs prévenant les contacts directs : fonds de cage mobiles, cages de transfert...
- Port de gants anti-morsure (Kevlar) et d'un masque adéquat, de même que de vêtements de travail régulièrement changés et stérilisés. Les avant-bras devront être spécialement protégés.
- Les mesures d'hygiène classiques devront être strictement appliquées : douche après le travail, interdiction de manger, fumer, boire dans les animaleries.
- Stériliser avant destruction tout matériel souillé perforant.
- Lors du nettoyage des cages, on évitera la formation d'aérosols (appareils à haute pression).
- Lors des autopsies, il faut commencer par inspecter la cavité buccale.

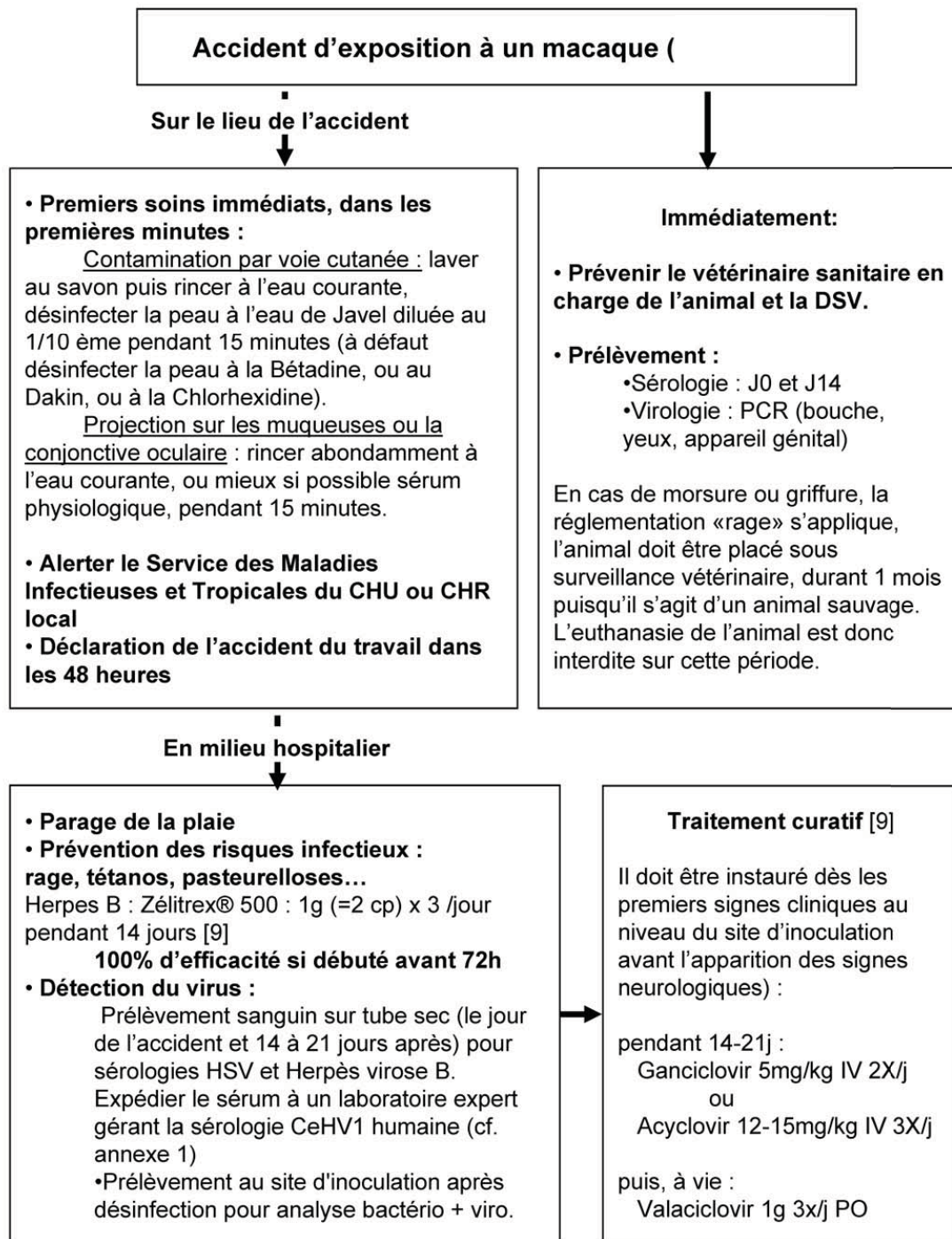


Figure 2 : Conduite à tenir en cas de suspicion de transmission d'un macaque à l'homme (Coutrot 2007).

II- Le traitement de l'herpès virose B chez l'animal

a) Le traitement médical

Le traitement médical des animaux est dangereux et inutile. Si un animal est infecté par le CeHV-1, le traitement de celui-ci par une des molécules antivirales disponibles actuellement sera totalement inefficace puisque le virus non répliquatif n'y est absolument pas sensible, ainsi ces molécules n'ont aucune activité sur le virus en état de latence dans les ganglions nerveux et ne permettent donc pas d'éradiquer le CeHV-1 chez un animal infecté. Le seul traitement logique serait de traiter le macaque infecté à vie mais cela est à exclure totalement car le risque de résistance est majeur. Si la résistance apparaît chez le macaque, il devient alors impossible de soigner les humains qui pourraient se contaminer. En conclusion il est impératif de ne jamais donner de traitement antiviral quel qu'il soit aux animaux porteurs du CeHV-1.

Comme dans le cas de la tuberculose chez les animaux domestiques, l'herpès virose B ne doit donc pas être traitée chez les animaux. L'euthanasie pourra par ailleurs être conseillée pour les animaux qui seront diagnostiqués comme porteurs du CeHV-1 en raison des forts risques qu'ils font encourir à l'homme et de l'incurabilité de cette maladie chez les animaux porteurs.

b) La vaccination anti-CeHV-1

Le CeHV-1 est endémique dans de nombreuses populations captives de macaque et constitue une menace sérieuse pour les humains qui travaillent en contact avec ces macaques ou leurs tissus. Un vaccin qui pourrait empêcher ou limiter l'infection par le CeHV-1 chez le macaque diminuerait le risque professionnel.

À cet effet, une équipe de chercheur a mis au point un plasmide exprimant la glycoprotéine B du CeHV-1 en vue de vacciner par l'ADN des macaques. Ce vaccin a été testé pour son immunogénicité chez la souris et le macaque rhésus et les résultats démontrent donc que l'immunisation par l'ADN pourrait être employée afin d'induire une immunité contre une glycoprotéine de CeHV-1 chez les macaques non infectés (Loomis-Huff 2001).

Une autre équipe a également construit un plasmide en vue d'une utilisation vaccinale, ce plasmide exprimant la glycoprotéine D du CeHV-1. Ainsi, ce vaccin par l'ADN dérivé du

gène de la glycoprotéine D du CeHV-1 a permis d'induire une immunité humorale et cellulaire efficace contre la glycoprotéine D chez les macaques vaccinés (Hirano 2002).

Il n'a cependant pas du tout été prouvé que cette immunisation puisse empêcher l'infection des animaux par le CeHV-1 ou dans le cas contraire empêcher l'excrétion du virus par ces animaux. Cela n'est en effet pas sûr que l'immunité induite par de tels vaccins soit plus efficace pour limiter l'excrétion virale que l'immunité naturelle contre le virus déjà mise en défaut par ce dernier. De plus en cas de vaccination des animaux il pourrait devenir difficile de différencier les animaux vaccinés des animaux infectés. L'utilisation d'un tel vaccin chez l'animal supposera donc avant tout que ce vaccin démontre une efficacité préventive et curative à toute épreuve chez le macaque.

MALADIE D'AUJESZKY

La maladie d'Aujeszky est une maladie infectieuse, contagieuse, d'origine virale qui affecte les porcs et d'autres espèces animales (herbivores et carnivores). Elle est inscrite sur la liste de l'OIE et sur la liste des Maladies Réputées Contagieuses pour toutes les espèces de mammifères.

PRÉSENTATION DE L'AGENT

I- Classification

La maladie d'Aujeszky est due à l'**herpèsvirus porcin 1**, virus enveloppé à ADN appartenant à la **famille des Herpesviridae** et la **sous-famille des Alphaherpesvirinae** (Kandoorp 2004).

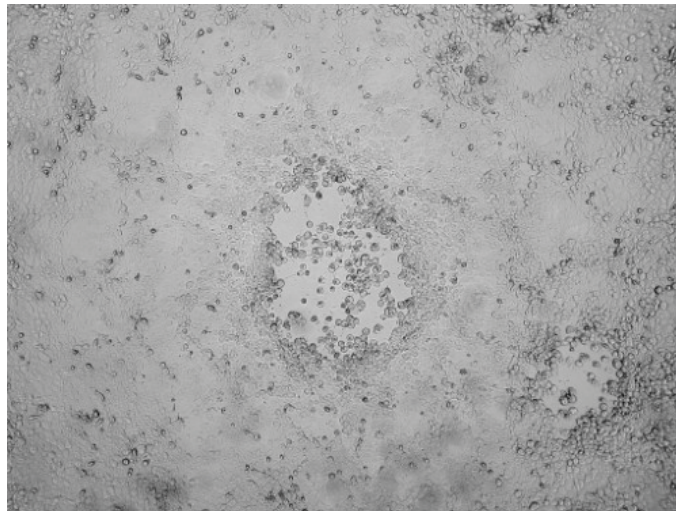


Illustration 6 : Virus Aujeszky (Centre d'Etude et de Recherches Vétérinaires et Agrochimiques 2010)

II- Principales caractéristiques

C'est un virus à ADN, à symétrie cubique, enveloppé. Les souches sauvages de virus ont un pouvoir pathogène marqué par un neurotropisme qui est responsable à la fois d'encéphalomyélite et de persistance à l'état latent dans les ganglions nerveux des suidés.

En fonction de la température (entre 4°C et 25°C) et du pH (entre 6 et 8), le virus peut survivre plusieurs semaines dans la viande en maturation, l'urine, le fumier, le sol... Il est sensible aux solvants des lipides et aux désinfectants classiques (hypochlorite de sodium, soude, formol, dérivés phénolés...).

Pouvoir antigène et immunogène :

Il n'existe qu'un seul type antigénique du virus de la maladie d'Aujeszky. Certaines glycoprotéines possèdent un pouvoir immunogène, comme les glycoprotéines gB, gC, gD ; d'autres n'en présentent pas, comme la glycoprotéine gE. Des souches de vaccins privées du fragment de génome codant pour la glycoprotéine gE permettent, associées à des coffrets ELISA pour la recherche des anticorps anti-gE, de distinguer les animaux vaccinés avec ces vaccins délétés (gE-) des animaux infectés ; ces derniers possèdent des anticorps anti-gE, tandis que les animaux simplement vaccinés n'en ont pas.

Après l'infection, les suidés produisent des anticorps décelables à partir du huitième jour environ et la réponse demeure positive ultérieurement.

III- Pathogénie

Chez les suidés, le pouvoir pathogène est fonction de l'âge des animaux : chez les adultes, l'infection n'est jamais mortelle alors qu'elle l'est systématiquement chez les jeunes porcelets. Dans les autres espèces animales sensibles, l'infection est toujours rapidement fatale (Toma 2010).

Le virus pénètre habituellement par la voie respiratoire (infection aéroportée) et gagne le système nerveux central (méningo-encéphalite) et s'étend à la moëlle épinière par voie nerveuse.

DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES

I- Répartition géographique

On la retrouve dans tous les pays pratiquant l'élevage de porcs. La répartition géographique précise de la maladie est difficile à établir du fait de l'absence d'information officielle. Cependant, elle a été déclarée à l'Office International des Epizooties pour de nombreux pays d'Amérique et notamment Cuba.

Une enquête sérologique concernant cette maladie a été conduite, en 2002, en Guadeloupe parmi les porcs issus d'élevages organisés sur l'île. Cette étude n'a révélé aucune réponse sérologique positive et a ainsi conduit à conclure à l'absence de la maladie d'Aujeszky au sein des effectifs porcins organisés guadeloupéens.

II- Espèces sensibles

Les espèces habituellement atteintes sont les **suidés, domestiques et sauvages** et constituent ainsi un double réservoir de la maladie.

La maladie a été identifiée chez d'autres espèces de mammifères domestiques ou sauvages (chiens, bovins, ovins, ...). Le porc est le seul hôte naturel de l'herpèsvirus porcin pour lequel il peut être infecté de manière subclinique et latente. Les autres mammifères peuvent également être infectés par un contact direct ou indirect avec des porcs contaminés, ce qui mène inévitablement à la mort de ces animaux. La transmission à l'homme n'a fait l'objet d'aucune publication au cours des trois dernières décennies. Les descriptions des cas cliniques anciens n'ont jamais été confirmées ce qui nous laisse penser que la **maladie d'Aujeszky n'est pas une zoonose**.

III- Transmission

Sources

- Exclusivement les porcs et sangliers malades ou porteurs sains

- Les animaux vaccinés peuvent constituer un réservoir car ils peuvent porter le virus
- Autres espèces : culs-de-sac épidémiologiques

Matières virulentes

- Sécrétions bucco-nasales
- Sécrétions génitales
- Lait, cadavres, abats et viande de porc

Modalités

- Transmission directe : par contact, par la saillie, par le lait
- Transmission indirecte : locaux, matériel, aérosols, alimentation (eaux grasses contenant du virus qui résiste longtemps dans les viandes)...

Les voies de pénétration

- Voies oro-nasale et génitale
- Les carnivores se contaminent en ingérant des abats ou de la viande crue de suidés, voire par morsure ou contact direct (action de chasse).

EXPRESSION CLINIQUE

La maladie d'Aujeszky ou pseudorage est due à un alphaherpèsvirus qui infecte le système nerveux central et d'autres organes, comme l'appareil respiratoire, de nombreux mammifères sauf l'homme et les grands singes (Kandoorp 2004). Elle atteint essentiellement le porc, son hôte naturel, qui demeure infecté de façon chronique après guérison clinique

Les signes cliniques chez les espèces autres que le porc sont proches de ceux de la rage d'où son nom de "pseudo-rage". Le tableau clinique est dominé par une encéphalomyélite, paralysie du pharynx et prurit conduisant à la mort en moins de 48 heures (plus rapide que la rage).

Carnivores : infection fréquente, prurit mutilant au point d'inoculation, encéphalomyélite, apathie, inquiétude mais pas d'agressivité, paralysie du pharynx, ptyalisme, mort rapide (6-48 heures). Automutilation de la gueule chez les chiens.

Ruminants : mêmes signes cliniques avec grincement des dents et piétinement.

Equidés : mêmes signes cliniques mais absence de prurit.

Il existe aussi des formes foudroyantes (mort brutale), gastro-intestinales (vomissements, diarrhées) ou frustes (ENVL 2010).

L'infection chez les primates n'est pas documentée, il s'agit de cas anecdotiques.

MÉTHODES DIAGNOSTIQUES

Un diagnostic de maladie d'Aujeszky peut être fait en mettant en évidence le virus (isolement du virus ou amplification en chaîne par polymérase [PCR]) ou chez les suidés vivants, par une recherche d'anticorps.

L'isolement du virus de la maladie d'Aujeszky est utilisé pour le diagnostic des formes cliniques de la maladie, mais d'autres techniques sont nécessaires pour le diagnostic des infections latentes. Cependant, à part les suidés, la plupart des espèces animales atteintes ne vivent pas suffisamment longtemps après l'infection pour produire une quantité décelable d'anticorps.

Nous nous intéresserons donc particulièrement aux techniques d'isolement du virus et de PCR.

I- Identification de l'agent pathogène

a) Isolement du virus

Suite à l'apparition de signes cliniques (par exemple des encéphalites chez les herbivores et carnivores), le diagnostic de la maladie d'Aujeszky peut être confirmé par isolement du virus, *post mortem*, à partir surtout de l'encéphale, des amygdales, des poumons et de la rate.

Les prélèvements sont homogénéisés dans de l'eau physiologique ou du milieu de culture cellulaire contenant des antibiotiques et la suspension est clarifiée par centrifugation à 900 *g* pendant 10 min. Le liquide surnageant est utilisé pour l'inoculation de la culture cellulaire. De nombreuses cultures cellulaires (cellules mères ou lignées cellulaires) sont sensibles au virus de la maladie d'Aujeszky, mais en général on utilise une lignée de cellules de rein de porc (PK-15). Le milieu de culture des cellules doit contenir des antibiotiques (comme 200 UI/ml de pénicilline ; 100 µg/ml de streptomycine ; 100 µg/ml de polymyxine et 3 µg/ml de fungizone).

Le virus de la maladie d'Aujeszky produit un effet cytopathogène (ECP) qui apparaît généralement en 24 à 72 h, mais les cultures cellulaires doivent être incubées 5 à 6 jours. On voit apparaître des cellules réfringentes dans la couche cellulaire, puis le tapis cellulaire se décolle. Des syncytiums d'aspect et de taille variables se développent. En l'absence de tout ECP, il est recommandé de faire un passage aveugle. Une information complémentaire peut être obtenue en colorant à l'hématoxyline-éosine des lamelles supportant la culture cellulaire, en vue de mettre en évidence les inclusions acidophiles intranucléaires caractéristiques d'une infection par herpèsvirus, avec margination de la chromatine. Le virus peut également être identifié par immunofluorescence, immunoperoxydase ou neutralisation par un sérum spécifique.

L'isolement du virus de la maladie d'Aujeszky permet de confirmer la suspicion, mais son échec ne permet pas de garantir l'absence d'infection.

b) Identification du virus par amplification en chaîne par polymérase

La technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) peut être utilisée pour révéler la présence du génome du virus dans des échantillons provenant d'organes ou de sécrétions. De nombreux laboratoires ont établi des protocoles efficaces mais, à l'heure actuelle, il n'existe pas au niveau international de protocole normalisé.

Cette technique est fondée sur l'amplification sélective d'une partie spécifique du génome en utilisant deux amorces situées à chaque extrémité de la séquence choisie. Dans un premier temps, l'ADN complet est isolé à l'aide de techniques classiques (à savoir la digestion par la protéinase K et l'extraction par le phénol-chloroforme) ou à l'aide de kit d'extraction de l'ADN disponibles dans le commerce. La séquence cible peut être amplifiée jusqu'à 106 fois à l'aide de cycles de dénaturation de l'ADN donnant des fragments d'ADN simple brin, d'hybridation des amorces et de synthèse des séquences complémentaires avec une ADN polymérase thermostable. Les amorces doivent être choisies de façon à amplifier une séquence conservée parmi les souches de virus de la maladie d'Aujeszky, par exemple des fragments des gènes gB ou gD qui codent des glycoprotéines essentielles.

Le produit amplifié peut être identifié par son poids moléculaire, déterminé par migration en gel d'agarose, et une confirmation peut être faite par la méthode d'hybridation Southern en

utilisant une sonde complémentaire. Des techniques récentes utilisent une hybridation en milieu liquide avec des sondes marquées par enzymes ce qui donne une réaction colorée après incubation avec un substrat approprié. Des techniques plus récentes font appel à des sondes fluorescentes couplées à l'action d'une exonucléase et le suivi en temps réel de l'évolution du produit, ce qui permet en même temps l'amplification et la confirmation des fragments d'ADN, et augmente ainsi la rapidité et la spécificité de la PCR.

Dans tous les cas, le principal avantage de la PCR par rapport aux techniques classiques d'isolement du virus est la rapidité puisque, avec les équipements les plus modernes, le processus complet d'identification et de confirmation peut se faire en un jour. Cependant, en raison de la nature de l'épreuve, de nombreuses précautions doivent être prises pour éviter la contamination des échantillons avec de l'ADN étranger provenant de réactions antérieures ou d'une contamination de l'environnement du laboratoire (OIE 2010).

II- Épreuves sérologiques

Toute technique sérologique doit être suffisamment sensible pour donner une réponse positive avec le sérum étalon international de l'OIE. Ce sérum peut être obtenu auprès du Laboratoire de référence de l'OIE pour la maladie d'Aujeszky situé en France. Pour les échanges internationaux, l'épreuve doit être suffisamment sensible pour fournir une réponse positive avec la dilution au demi du sérum étalon.

La neutralisation virale a été reconnue comme la méthode sérologique de référence, mais pour le diagnostic et le dépistage, elle a été largement remplacée par la méthode ELISA qui permet une application sur une bien plus grande échelle. Les épreuves peuvent être réalisées sur une grande variété de produits (sérum, sang total, lait) mais le sérum est préférable.

Une épreuve d'agglutination au latex a été mise au point et peut être utilisée pour le dépistage.

Cependant, ces techniques restent essentiellement réservées aux suidés car les autres espèces dont les primates ne survivent pas assez longtemps pour développer des anticorps.

RÉGLEMENTATION SANITAIRE

La maladie animale figure sur la liste B de l'OIE. C'est une MRC à déclaration obligatoire pour tous les mammifères. La maladie humaine n'est pas à déclaration obligatoire. Ce n'est pas une maladie professionnelle, elle ne peut pas être indemnisée par des régimes spécifiques.

Selon l'article 5 de l'arrêté du 28 janvier 2009 :

Le virus de la maladie d'Aujeszky, son génome et ses antigènes ne sont détenus, manipulés ou utilisés à des fins de recherche, de diagnostic ou de fabrication que dans des établissements autorisés par le ministre chargé de l'agriculture.

Le laboratoire de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments — site de Ploufragan — unité de virologie et immunologie porcine est désigné comme laboratoire national de référence pour le diagnostic de la maladie d'Aujeszky.

La liste des laboratoires agréés pour le diagnostic de la maladie d'Aujeszky est fixée par instruction du ministre chargé de l'agriculture.

Pour la recherche de la maladie d'Aujeszky effectuée dans le cadre du présent arrêté, sont autorisées les méthodes de diagnostic et de dépistage suivantes :

- diagnostic sérologique par épreuve immuno-enzymatique pour recherche des anticorps anti-gE ou anti-gB pratiquée sur sérum ou buvard individuel, ou sur mélange de sérums (ou de buvards) ;
- diagnostic virologique par isolement viral ;
- toute autre méthode autorisée par le ministre chargé de l'agriculture.

Laboratoire de Référence National et de l'OIE :

AFSSA PLOUFRAGAN
Unité de Virologie et Immunologie Porcines
Chef d'Unité M.F. LE POTIER
BP 53, 22440 Ploufragan
Tél. : 02-96-01-62-22

Laboratoire de Référence de l'OIE :

ENVA Maisons-Alfort
Professeur B. TOMA
7, avenue du Général de Gaulle
94704 Maisons-Alfort
Tél. : 01-43-96-71-33
Fax : 01-43-96-71-31
E-Mail : bftoma@vet-alfort.fr

Analyse virologique :

Le diagnostic virologique de la maladie d'Aujeszky est réalisé dans le cas des suspicions cliniques chez le porc, le chien, le chat, la vache, les primates ou tout autre mammifère à l'exclusion des humains. L'analyse mise en œuvre est l'isolement viral dont le résultat positif confirme la maladie. Lors d'une suspicion clinique, le diagnostic de la rage est d'abord établi.

PROPHYLAXIE ET TRAITEMENT

I- Prophylaxie

Seule la réglementation concernant les mesures de police sanitaire relatives à la maladie d'Aujeszky des suidés domestiques et sauvages en élevage est définie. Aucune mesure de police sanitaire n'est définie réglementairement pour la maladie d'Aujeszky des espèces sauvages. La gestion des suspicions dans la faune sauvage pourrait se faire sur la base des recommandations suivantes :

- Contacter le Centre National de Référence.

*** ENVA Maisons-Alfort**

Professeur B. TOMA

*** AFSSA PLOUFRAGAN**

- Réaliser et envoyer les prélèvements : le centre national de référence fournit les instructions nécessaires à la réalisation et à l'expédition des prélèvements.
- Réaliser une enquête sur l'importance et la nature des flux d'animaux.
- Concertation avec le Comité Départemental de Lutte contre les Epizooties Majeures pour l'élaboration du plan local de gestion sanitaire.
- Restreindre voire prohiber la circulation des animaux.
- Appliquer des mesures d'hygiène au déplacement des personnes matériaux et matériels : désinfection des véhicules, bottes, outils.

Prévention en zoo :

- Eviter le contact entre des suidés et des espèces sensibles.
- Ne pas donner de la viande de porc crue.
- La vaccination est possible chez les chiens, les chats et les porcs mais celle-ci n'est pas documentée chez les espèces sauvages comme les primates (Kandoorp 2004).

II- Traitement

Il n'existe pas de traitement.

LA RAGE

La rage est une maladie infectieuse, virulente, inoculable en général par une **morsure**, **une griffade**. Cette maladie commune à l'Homme et à la plupart des mammifères est due à un rhabdovirus neurotrope : le virus rabique. Sur le plan clinique, elle est caractérisée, après une **longue période d'incubation**, par une **encéphalomyélite mortelle** en règle générale, accompagnée, le plus souvent, de signes d'excitation, d'agressivité ou de paralysies. Sur le plan histologique, la signature de l'infection rabique est constituée par la présence d'inclusions cytoplasmiques acidophiles dans certaines cellules nerveuses : les corps de Negri.

PRÉSENTATION DE L'AGENT

I- Classification

La rage est due à un virus neurotrope du genre *Lyssavirus* de la famille des *Rhabdoviridae*, elle est transmissible à tous les mammifères.

La culture de ce virus a plusieurs applications pratiques :

- production de virus pour la préparation de vaccins à virus vivant ou inactivé ;
- modification de souches de virus (ERA) ;
- titrage des anticorps des sérums ;
- étude de la structure du virus, de ses composants, de sa cinétique de multiplication... ;
- diagnostic de la rage.

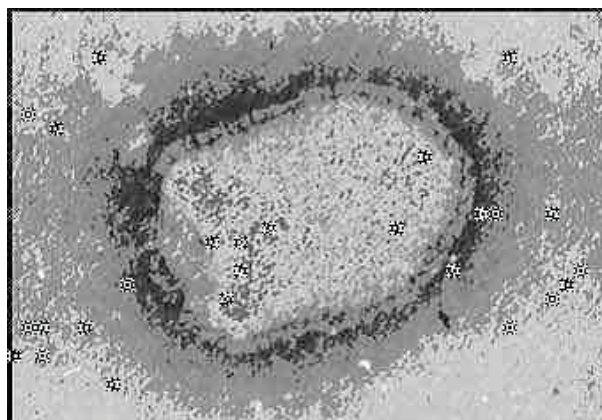


Illustration 7 : virus de la rage vu au microscope électronique à transmission (Médicopédia 2010).

II- Principaux caractères virologiques

a) Morphologie

C'est un virus à ARN monocaténaire linéaire. Le virion mesure 180 nm de longueur sur 75 nm de diamètre. Chaque particule contient une nucléocapside hélicoïdale enveloppée par une double couche lipidique. Des spicules (glycoprotéines) sont insérées à la surface de l'enveloppe. Il est constitué de cinq protéines (Acha 2005).

b) Culture

Elle peut se réaliser :

- sur les cellules rénales de souris, de hamster, de porc, de bovin (fœtus), de chien et de singe
- sur les fibroblastes d'embryons de poulet
- sur glandes salivaires de chien.

c) Sensibilité et résistance

Le virus est détruit par la chaleur (15 mn à 50°C), la lumière, les UV et partiellement par la dessiccation lente. Il est également inactivé par les solvants des lipides (éther, chloroforme), les ammoniums quaternaires, l'eau de javel, les solutions savonneuses, l'acide phénique, le formol, la bétapropiolactone, l'acétyl-éthylènimine. Il résiste à la putréfaction, est conservé par le froid, la lyophilisation et la glycérine à 50 % (Lodde 1998).

d) Antigènes et induction d'anticorps

Il faut noter l'unicité antigénique du virus rabique, ce qui signifie que toutes les souches de virus rabique possèdent la même spécificité antigénique. Par des techniques très fines, seulement (anticorps monoclonaux produits en culture cellulaire, carte génomique), on arrive à mettre en évidence des différences entre les souches de virus rabique. Ces différences permettent de reconnaître diverses souches (origine géographique en particulier, ou caractère sauvage).

On connaît deux antigènes majeurs du virus rabique :

- La protéine (P.M. 62.000) de la nucléocapside : cet antigène interne entraîne la formation d'anticorps révélés par les techniques de précipitation, de fixation du complément et d'immunofluorescence et, dans une faible mesure, d'anticorps neutralisants. La spécificité antigénique de cette protéine est commune à toutes les souches de virus de la rage et également à d'autres rhabdovirus que le virus de la rage. Les différentes espèces de rhabdovirus possédant ce même antigène interne ont été rassemblées pour former le genre *Lyssavirus* (ou « groupe » rabique) au sein des *Rhabdoviridae*.
- La glycoprotéine (P.M. 80.000) d'enveloppe entraîne la synthèse d'anticorps neutralisants. Tous les virus de la rage possèdent la même spécificité antigénique de cette glycoprotéine (réactions croisées complètes en séroneutralisation). En revanche, la spécificité de la glycoprotéine des autres espèces virales du genre *Lyssavirus* est différente, et la réaction de neutralisation permet de distinguer quatre sérotypes au sein du genre *Lyssavirus*.

e) Immunité antirabique

Le genre *Lyssavirus*, virus des *Rhabdoviridae*, a été subdivisé en plusieurs sérotypes, à savoir :

- **Sérotipe 1** : la catégorie qui englobe la plupart des virus responsables de la rage chez l'homme et les animaux, ainsi que les virus fixes de laboratoire. La souche prototype est appelée « challenge virus standard » (CVS).
- **Sérotipe 2** : le virus de la chauve souris Lagos « Lagos bat virus » ou LBV, isolé chez trois espèces de chiroptères frugivores au Nigéria, en République centrafricaine et en Afrique du Sud, ainsi que chez un chat au Zimbabwe.
- **Sérotipe 3** : le virus Mokola (MOK) isolé chez les musaraignes africaines, chez l'homme et plus récemment, chez un chien et des chats au Nigéria, au Cameroun et au Zimbabwe.
- **Sérotipe 4** : le virus Duvenhague (DUV), isolé chez l'homme en Afrique du Sud, puis chez des chauves-souris en Afrique du Sud et au Zimbabwe (Acha 2005).

Unicité immunogénique du virus rabique, avec de petites différences entre les souches, pouvant entraîner un défaut de protection croisée chez la souris, partiel entre les sérotypes 1, 2 et 4, ou total entre les sérotypes 1 et 3.

L'immunité est à la fois humorale et cellulaire :

- immunité humorale : l'élément immunogène majeur est la glycoprotéine d'enveloppe qui induit la synthèse d'anticorps neutralisants. Cette glycoprotéine peut être isolée, purifiée, et permet d'obtenir à elle seule, à titre expérimental, une bonne protection contre la rage. La nucléocapside peut également, dans certains cas, induire une réaction immunitaire protectrice. Applications pratiques : utilisation de sérum antirabique riche en anticorps neutralisants, dans la prophylaxie de la rage humaine ; estimation du degré d'immunité chez les individus vaccinés, par titrage de leurs anticorps neutralisants.

- immunité cellulaire : elle est mesurable expérimentalement par des tests *in vivo* (hypersensibilité de type retardé) ou *in vitro* dont l'application pratique n'est pas apparue, à ce jour, supérieure à celle de la mesure des taux d'anticorps. Elle joue cependant certainement un rôle complémentaire de l'immunité humorale dans les mécanismes de protection et dans les phénomènes immunopathologiques.

- interféron : le virus rabique vivant ou inactivé entraîne la production d'interféron ; par ailleurs, le virus rabique est sensible à l'action de l'interféron : il est possible de protéger des animaux contre le virus rabique par injection de substances inductrices d'interféron ou d'interféron homologue.

III- Pathogénie

Pour infecter un organisme, le virus rabique a besoin d'une porte d'entrée, le plus souvent sous forme d'une morsure ou de toute autre lésion traumatique. Très exceptionnellement, la voie aérienne est utilisée par le virus.

Le virus peut se multiplier à son point d'inoculation dans les cellules du muscle favorisant ainsi l'infection ultérieure des terminaisons nerveuses. Le neurone est la cellule de l'organisme la plus sensible au virus de la rage. Le virus va ainsi se multiplier principalement dans les neurones du cerveau.

L'infection rabique a une caractéristique très particulière, la diffusion du virus dans l'organisme ne se produit pas par la voie sanguine. C'est en empruntant les voies nerveuses que le virus va être transporté, dans un premier temps à partir du point d'inoculation périphérique vers le cerveau. Dans une seconde étape, le virus va se multiplier très activement dans le cerveau. Dans une troisième étape, le virus sera transporté du cerveau vers la périphérie, envahissant tout le système nerveux périphérique ainsi que certains organes. Dans

cette étape de multiplication virale en périphérie, il faut noter l'infection du muscle cardiaque qui est souvent le siège de lésions de myocardite, ainsi que la présence de virus dans les terminaisons nerveuses, dans l'oeil, la peau. Il faut signaler le cas des **glandes salivaires** où on observe une réplication virale importante. La production de particules virales dans les glandes salivaires permettra à l'animal infecté de transmettre la rage par morsure. Suivant les espèces, on observe des variations importantes dans le degré d'envahissement des différentes structures du cerveau.

DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES

I- Répartition géographique

La rage sévit sur tous les continents, mais elle est absente dans la plus grande partie de l'Océanie. Plusieurs pays sont actuellement indemnes, notamment : l'Île Maurice, la Barbade, la Jamaïque et plusieurs autres îles des Caraïbes, et l'Uruguay, aux Amériques ; le Japon en Asie ; la Bulgarie, l'Espagne en Europe... La rage n'a pas une répartition uniforme dans les pays infectés, où il peut y avoir des zones indemnes, des zones à faible ou forte endémicité, ainsi que des zones avec des foyers épidémiologiques (Acha 2005).

II- Espèces sensibles

Tous les mammifères, domestiques ou sauvages, et l'Homme sont réceptifs au virus rabique et peuvent être infectés dans les conditions naturelles (la réglementation française considère la rage comme MRC chez toutes les espèces animales).

L'infection naturelle existe chez presque tous les mammifères domestiques et sauvages mais le degré de réceptivité varie d'une espèce à l'autre.

- hommes
- bovins
- ovins
- caprins
- porcs
- moufettes
- mangoustes
- oiseaux : la rage acquise naturellement est exceptionnelle
- rats laveurs : animaux les plus sensibles au virus
- primates non humains : elle est plus fréquente chez les espèces du nouveau monde
- équins
- volailles
- chiens
- chats
- rongeurs
- chauves-souris
- renards
- Saïmiris *Saïmiri sciureus*
- Sajous *Cebus sp.*

- Ouistitis *Callithrix jacchus*
- Chimpanzés *Pan Troglodytes*
- Orangs-outans *Pongo pygmaeus*
- Macaques (infection expérimentale) : *Macaca mulatta*,
Macaca cynomolgus

Dans l'état de Céara, au Brésil, de 1991 à 1998, de nombreux cas de rage chez l'homme transmis par la faune sauvage ont été rapportés. Un nouveau variant du virus de la rage sans relation antigénique ou génétique avec n'importe quel autre variant de la rage connu trouvé chez les chauves-souris ou les mammifères terrestres en Amérique, a été identifiée. Le ouistiti, *Callithrix jacchus jacchus*, a été reconnu comme la source et le réservoir de ces cas de rage. Cette nouvelle source de virale de rage est bien adaptée à l'espèce des Tamarins (Batista-Morais 2000, Favoretto 2001, Almeda 2001).

III- Transmission

La rage encéphalomyélite mortelle affectant tous les mammifères et l'homme, est une zoonose majeure grave et très crainte dans le monde. Pourtant peu de mortalités humaines dues à une contamination par un contact avec les singes sont rapportées dans la littérature. Entre 1929 et 1970, huit cas de rage concernant des primates non humains seulement ont été recensés sur le territoire des États-Unis dont quatre sur des singes écureuils Sud Américains d'importation récente. Environ mille personnes dans le monde ont subi un traitement antirabique à la suite d'une morsure de singe enragé.

a) Source de contamination

i) Les organismes vivants

- **Animaux malades** : Ils constituent la **source essentielle** du virus, pendant la phase clinique de la maladie ;
- **Animaux excréteurs présymptomatiques** :

L'excrétion du virus est possible dans la salive **avant** les premiers signes cliniques de rage : source **très insidieuse**, à l'origine de la conduite à tenir en présence d'un animal mordeur

- **Animaux porteurs chroniques guéris** : Cette éventualité est tellement exceptionnelle qu'elle a une portée épidémiologique **nulle** ;
- **Animaux porteurs sains paradoxaux** : rôle épidémiologique quasi **nul** en Europe, malgré la confirmation de la transmission verticale de la rage chez certains muridés (Allemagne) et chez la chauve-souris.

Donc, en résumé, ce sont essentiellement les animaux enragés, dans les jours précédant les symptômes et pendant la phase clinique, qui représentent la source du virus rabique.

ii) Matières virulentes

Le virus se retrouve :

- dans les tissus d'animaux enragés : système nerveux, sang, glandes salivaires, surrénales, graisse brune interscapulaire.
- dans la salive : la concentration du virus dans la salive augmente

On trouve du virus rabique dans le système nerveux central et périphérique : tout le névraxe est virulent, à des degrés variables. Les zones d'élection sont : la corne d'Ammon, le cervelet, le bulbe, la moelle épinière, les ganglions des nerfs crâniens... La connaissance de ces zones d'élection conditionne la nature des prélèvements en vue du diagnostic expérimental de la rage.

iii) Le milieu extérieur

La salive d'un animal enragé souillant différents substrats reste-t-elle longtemps virulente ? : le virus rabique est un virus fragile, sensible à la lumière, la chaleur, l'oxygène de l'air... Par suite, les contaminations indirectes par objet souillé sont très rares, puisque le virus est rapidement inactivé. En revanche, en milieu protéique, le virus résiste bien (cadavre d'un animal mort de rage) et la transmission peut se faire par consommation des organes du cadavre d'un animal mort de rage (Toma 2006).

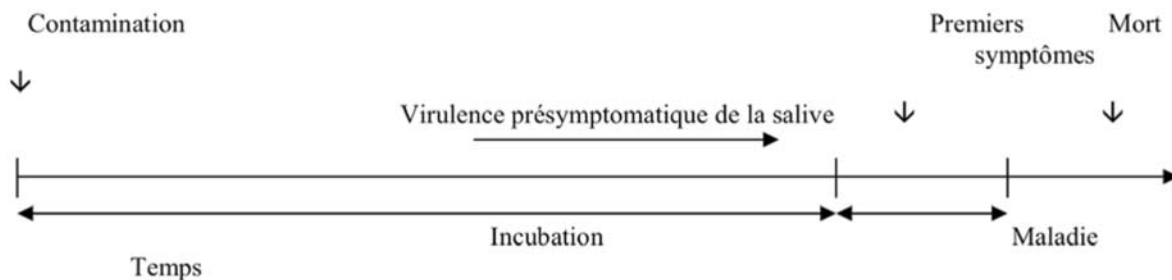


Figure 3 : Représentation schématique des trois périodes à connaître : l'incubation, la virulence présymptomatique et l'expression clinique.

b) Modes de transmission

La transmission aux singes se fait essentiellement par morsures, par léchage, par les muqueuses. En principe la peau est une barrière infranchissable pour le virus rabique ; cependant des microlésions, de simples excoriations suffisent pour assurer la pénétration du virus.

La transmission peut également se faire par blessure par objet souillé mais en raison de la fragilité du virus dans le milieu extérieur, ce type de contamination est rare.

La transmission par ingestion de viande d'animaux enrégés arrive parfois chez l'animal dans le milieu naturel.

La transmission in utero a été constatée dans les conditions naturelles chez le chien, le chat, le cobaye et la souris mais survient très rarement.

Il est vraisemblable que dans la nature les arthropodes hématophages piquant des animaux enrégés ne jouent aucun rôle dans la transmission de la maladie.

En résumé la clé de voûte de la transmission de la rage est la morsure et la griffade.

I- Symptômes

La symptomatologie de la rage est dominée par les faits suivants :

- **La longueur et l'incertitude de la durée d'incubation** de la maladie. Pour chaque espèce, des chiffres moyens peuvent être cités, mais on constate des variations considérables, notamment vers des durées atteignant parfois plusieurs années. L'incubation varie en fonction de facteurs déterminants comme la quantité de virions ou d'importance relative (type de souche, âge des individus contaminés, lieu anatomique de la contamination... : en règle générale, l'incubation est un peu plus longue lorsque la plaie d'inoculation est éloignée de la tête). Chez les singes lors d'infection naturelle, l'incubation semble durer de 7 semaines à plusieurs mois.

Lors d'infection expérimentale, les singes rhésus (*M. mulatta*) développent la maladie en 15 à 35 jours (Lodde 1998).

- Le **polymorphisme des symptômes**.
- Le virus rabique, virus neurotrope, déclenche un ensemble de troubles parmi lesquels dominant des **troubles nerveux** (psychiques, moteurs et organo-végétatifs).
- Il est classique de distinguer une «**forme furieuse** » et une « **forme silencieuse** » (Acha 2005).

La rage silencieuse ou rage mue : les signes les plus fréquents sont une encéphalite avec une hypersalivation, une automutilation, une paralysie, et parfois seulement des morts soudaines.

La rage furieuse : on note des signes d'agressivité.

- Enfin, on peut retenir comme règle fondamentale le caractère **inexorablement mortel** de la maladie déclarée. Cependant, dans certains cas exceptionnels on peut observer des formes frustes, silencieuses ou avortées auxquelles peuvent survivre certains rongeurs européens ou africains (*Mastomys natalensis*) ou certains chiens d'Asie ou d'Afrique (Ethiopie). Cette guérison peut être accompagnée d'excrétion du virus dans la salive (Toma 2006).

II- Lésions

a) Macroscopiques

Aucune lésion macroscopique n'a de valeur spécifique. On note souvent des corps étrangers divers dans l'estomac et l'absence de matières dans les segments postérieurs du tube digestif. Chez le chevreuil, on observe parfois une plaie frontale due aux chocs que s'est infligé l'animal contre les obstacles.

b) Microscopiques

On peut décrire des lésions non spécifiques et des lésions spécifiques du système nerveux.

➤ *Lésions non spécifiques :*

Lésions d'encéphalomyélite virale et lésions ganglionnaires. Lésions vasculaires, périvasculaires (manchons histio-lymphocytaires périvasculaires) et cellulaires (accumulation de cellules de la névroglie en foyers : gliose, ou autour des neurones : satellitose ; neuronophagie : destruction des neurones par des macrophages).

Ces lésions non spécifiques peuvent manquer ou être dues à d'autres virus : virus de la maladie de Carré, de la maladie d'Aujeszky, de la maladie de Borna, etc.

➤ *Lésions spécifiques : corps de Negri*

Inclusions éosinophiles intracytoplasmiques.

Siège : Les zones d'élection sont : la **corne d'Ammon** (assise interne des cellules pyramidales), les cellules pyramidales de l'écorce cérébrale, le cervelet (cellules de Purkinje)...

Forme et nombre : Ils ont une forme ovale ou arrondie, de 0,25 à 30 microns, en moyenne 4-5 microns ; ils sont situés dans le cytoplasme à raison d'un ou de quelques uns par cellule.

Structure : La substance fondamentale du corps de Negri, acidophile, est colorée en rouge par la technique de Mann (bleu de méthylène ; éosine) ; la structure du corps de Negri est **hétérogène**.

Nature : Les corps de Negri correspondent à des lieux de réplication intracytoplasmique du virus rabique ; au microscope électronique, on voit qu'ils sont formés d'une masse englobant

des agrégats de virions rabiques.

Intérêt : Les corps de Negri sont spécifiques de la rage. Leur présence, leur taille, leur nombre sont en relation directe avec la durée de la maladie clinique.

Pendant longtemps, le diagnostic de laboratoire de la rage a reposé sur la recherche des corps de Negri.

Cependant, dans plusieurs pays, le diagnostic histologique n'est plus utilisé. On lui préfère la recherche des antigènes viraux par immunofluorescence et l'isolement du virus en culture cellulaire.

MÉTHODES DIAGNOSTIQUES

I- Diagnostic de terrain

D'une façon générale, en région d'enzootie rabique :

- **Toute modification du comportement habituel d'un animal** (agressivité inhabituelle, abattement excessif...),
- **Toute gêne de la mastication ou de la déglutition**, doivent être considérés comme des éléments de suspicion.

En résumé :

- Le diagnostic clinique et épidémiologique de la rage est difficile ;
- La mise en observation d'un animal suspect de rage (ou simplement mordeur) est capitale ;
- Les plus grandes précautions sont nécessaires lors de l'examen clinique d'un animal suspect de rage ;
- Deux maladies peuvent coexister, une maladie banale et la rage ;
- Du vivant de l'animal, il n'existe pas de diagnostic expérimental qui permette rapidement d'avoir une réponse ; celui-ci prend toute sa valeur sur un animal mort (Toma 2006).

II- Diagnostic expérimental (OIE 2010 et Toma 2006)

a) Épreuves de la boratoire de routine

L'examen clinique ne peut conduire qu'à une suspicion de rage parce que les symptômes de la maladie ne sont pas caractéristiques et peuvent varier grandement d'un animal à l'autre. Le seul moyen d'établir un diagnostic fiable de rage est d'identifier le virus ou l'un de ses composants spécifiques au moyen d'épreuves de laboratoire.

Comme le virus rabique est rapidement inactivé, les échantillons suspects doivent être envoyés au laboratoire réfrigérés et par le moyen le plus rapide. Les conditions d'expédition

font partie de la « chaîne de diagnostic de la rage ».

➤ Plusieurs techniques de laboratoire peuvent être utilisées. Ces méthodes varient en efficacité, spécificité et fiabilité. Elles sont classiquement appliquées à du tissu cérébral, mais elles peuvent aussi être utilisées, bien qu'éventuellement de manière moins efficace, à d'autres tissus (les glandes salivaires par exemple). Dans l'encéphale, le virus est particulièrement abondant dans le thalamus, la protubérance annulaire et le bulbe rachidien. L'hippocampe (corne d'Ammon), le cervelet et différentes parties de l'encéphale donnent des résultats négatifs dans 3,9 à 11 % des encéphales infectés. La structure de choix est le thalamus qui donne un résultat positif dans tous les cas. Il est donc recommandé de collecter et de tester plusieurs échantillons d'encéphale en incluant la moelle épinière. Pour avoir accès à ces parties de l'encéphale, il est nécessaire de le retirer de la boîte crânienne après son ouverture en salle d'autopsie. Dans certaines conditions, (par exemple sur le terrain ou lors d'enquêtes épidémiologiques importantes), une méthode de prélèvement simplifiée par le trou occipital ou par la cavité orbitale peut être utilisée. La manipulation des différentes parties du système nerveux central en cas de suspicion de rage doit se faire précautionneusement. Il faut toujours porter des gants et éviter les aérosols. Instruments coupants, ciseaux et scalpels doivent être utilisés avec précaution pour éviter blessures et contamination.

i) Identification immunochimique de l'antigène du virus rabique

➤ *Epreuve d'immunofluorescence*

L'épreuve la plus utilisée pour le diagnostic de rage est l'immunofluorescence (IF), elle est recommandée à la fois par l'OMS et l'OIE. Cette épreuve peut être utilisée directement sur un étalement, elle peut aussi être utilisée pour confirmer la présence de l'antigène rabique dans des cellules ou l'encéphale de souris inoculées pour diagnostic. Sur des prélèvements frais, l'IF donne des résultats fiables dans plus de 95 à 99 % des cas. La sensibilité de l'IF dépend de l'échantillon (de sa qualité et de la manière dont il a été prélevé), du type de lyssavirus et de la compétence de l'équipe de diagnostic. Chez des animaux qui ont été vaccinés, la sensibilité de l'épreuve peut être inférieure à cause de la localisation de l'antigène, confiné au tronc cérébral. Pendant le diagnostic direct, les échantillons prélevés dans plusieurs zones de l'encéphale, y compris le tronc cérébral, sont fixés à froid dans le l'acétone pour analyse puis colorés avec une goutte de conjugué spécifique. Le conjugué antirabique

fluorescent peut être préparé au laboratoire. Les conjugués commerciaux sont soit des conjugués polyclonaux spécifiques du virus entier ou de sa nucléocapside, soit un mélange de différents anticorps monoclonaux. Dans l'épreuve d'IF, les agrégats spécifiques de nucléocapside sont identifiés par leur fluorescence. La spécificité et la sensibilité de ces conjugués antirabiques fluorescents vis-à-vis des variants locaux du virus doit être contrôlée avant leur utilisation.

L'IF peut être utilisée sur des prélèvements conservés en glycérol. Si l'échantillon a été formolé, l'IF peut être réalisée après un pré-traitement de ce dernier par des enzymes protéolytiques. Cependant, l'IF réalisée sur échantillons formolés puis traités reste moins fiable et plus lourde que lorsqu'elle est réalisée sur prélèvement frais.

Les amas d'antigène du virus rabique sont ensuite cherchés au microscope à fluorescence et ils apparaissent sous forme de points plus ou moins gros, colorés en vert brillant sur fond noir, avec un liseré plus lumineux.

Cette réaction possède plusieurs avantages : elle est rapide (la réponse peut être fournie dans la journée), moins onéreuse que les autres techniques et elle fournit d'excellents résultats. A l'AFSSA de Nancy, elle s'est révélée faussement négative dans 2 p. cent des cas de rage en moyenne.

Chez l'Homme, cette technique peut être appliquée du vivant de la personne suspecte, par coloration d'un calque de cornée, mais elle est difficile à interpréter (fluorescences non spécifiques). Elle est moins sensible que l'immunofluorescence réalisée sur système nerveux.

➤ *Epreuves immunochimiques*

Les anticorps peuvent être conjugués à une enzyme comme la peroxydase au lieu de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Ce conjugué peut être utilisé pour un diagnostic direct avec la même sensibilité que l'IF, mais avec un risque de résultats non spécifiques faussement positifs. Ce risque est considérablement réduit lorsque les techniciens sont bien formés. Il faut aussi souligner que cette technique nécessite une incubation supplémentaire par rapport à l'IF.

Le conjugué peroxydase peut être utilisé dans des épreuves immunohistochimiques sur des coupes de tissus fixés au formol.

ii) Détection de la réplication du virus rabique après inoculation

Ces épreuves détectent l'infectiosité d'une suspension tissulaire pour des cellules en culture ou des animaux de laboratoire. Ils devraient être utilisés à chaque fois que l'IF donne un résultat douteux ou lorsque l'IF donne un résultat négatif et qu'il y a eu exposition humaine.

➤ *Epreuve sur culture cellulaire*

Des lignées cellulaires de neuroblastomes, comme la lignée CCL-131 de l'American Type Culture Collection (ATCC) sont utilisées pour le diagnostic de routine de la rage. Les cellules sont cultivées dans du milieu d'Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) contenant 5 % de sérum de veau foetal (SVF) à 36 °C avec 5 % de CO₂. La sensibilité des neuroblastomes a été comparée à celle des cellules de rein de hamster nouveau-né (BHK-21). Cette lignée de neuroblastomes est sensible aux isolats sauvages sans aucun temps d'adaptation, mais elle devrait être testée vis-à-vis des variants locaux du virus rabique avant d'être utilisée. La présence du virus rabique dans les cellules est mise en évidence par IF. Le résultat est obtenu après au moins 18 h d'incubation (durée d'un cycle de réplication du virus dans les cellules); en général l'incubation est prolongée de 48 h voire de 4 jours dans certains laboratoires.

Cette épreuve est aussi sensible que l'épreuve d'inoculation à la souris. Lorsqu'un service de culture cellulaire existe dans le laboratoire, cette épreuve devrait remplacer cette dernière épreuve, car elle évite l'utilisation d'animaux vivants, elle est moins coûteuse et donne des résultats plus rapidement.

Il est souvent conseillé d'utiliser plus d'une épreuve par échantillon, au moins lorsqu'il y a eu exposition humaine.

➤ *Epreuve d'inoculation à la souris*

Cinq à dix souris de 3 à 4 semaines ou une portée de souriceaux nouveau-nés de 2 jours, sont inoculés par voie intracérébrale. L'inoculum est le surnageant clarifié d'un broyat à 20 % (poids/volume) de tissus nerveux (cortex, cornes d'Ammon, cervelet, bulbe rachidien) dans un

tampon isotonique contenant des antibiotiques. Pour réduire la souffrance animale, les souris doivent être anesthésiées lors de l'inoculation. Les souris sont contrôlées tous les jours pendant 28 jours, toute souris qui meurt pendant la période d'observation est testée par IF. L'utilisation de souriceaux permet d'obtenir des résultats plus rapidement, et il est possible de contrôler un souriceau par IF 5, 7, 9 et 11 jours après l'inoculation. Toute mort survenant durant les quatre premiers jours sera considérée comme non spécifique (due au stress/à une infection bactérienne etc.).

Cette épreuve *in vivo* devrait être remplacée lorsque c'est possible, pour respecter le bien-être animal. Elle est également coûteuse, surtout si elle utilise des souris exemptes d'organismes pathogènes spécifiés, et elle ne donne pas une réponse rapide par rapport aux épreuves d'inoculation *in vitro*. En revanche, lorsqu'elle est positive, une grande quantité de virus peut être isolée d'un seul encéphale de souris pour le typage de la souche. Un autre avantage de cette épreuve peu sophistiquée est qu'elle peut être facilement utilisée en pratique dans des situations où les compétences et les conditions matérielles ne permettent pas d'utiliser d'autres épreuves (comme les cultures cellulaires).

Ses défaillances chez les animaux enrégés sont du même ordre de grandeur que celles de l'immunofluorescence mais ne portent pas sur les mêmes cas : à l'AFSSA de Nancy, une réponse négative a été enregistrée dans 2 p. cent des cas de rage.

iii) Identification histologique des lésions cellulaires caractéristiques

Les corps de Negri sont constitués par l'agrégation de protéines virales, mais les techniques de coloration classiques ne révèlent que l'affinité de ces structures pour les colorants acidophiles. Les épreuves immunochimiques sont les seules épreuves histologiques spécifiques de la rage.

Un étalement non fixé de tissus peut être coloré par la méthode de Sellers, permettant un diagnostic en moins d'une heure. Les examens histologiques, tels que ceux utilisant la coloration de Mann, sont généralement réalisés sur du matériel fixé inclus en bloc de paraffine et donnent un résultat en trois jours. Ces techniques ont l'avantage de ne pas nécessiter d'équipement de laboratoire coûteux ni d'obliger à conserver les prélèvements fixés sous froid. Quelle que soit la méthode utilisée, l'infection est démontrée par la présence de corps d'inclusion acidophiles intracytoplasmiques. Les méthodes histologiques, notamment la

méthode de Sellers, ne peuvent plus être recommandées car elles sont très peu sensibles. Elles doivent donc être abandonnées.

b) Autres épreuves d'identification

Le test immuno-enzymatique ELISA qui détecte l'antigène rabique est une variante de l'épreuve immuno-chimique. Il est utile pour les grandes enquêtes épidémiologiques. Il ne doit être utilisé qu'après validation sur de nombreux prélèvements et dans différents laboratoires. La spécificité et la sensibilité des enzymes conjuguées antirabiques vis-à-vis des variants du virus prédominants dans la région doivent être vérifiées avant usage. L'ELISA doit être associé à un test de confirmation tel que l'IF ou l'isolement du virus.

Les épreuves précédemment décrites permettent de bien diagnostiquer la rage et d'isoler puis d'identifier le virus. Le typage de ces virus peut apporter d'utiles informations et doit être réalisé dans des laboratoires spécialisés (notamment les laboratoires de référence de l'OIE et de l'OMS). Pour réaliser ce typage, les techniques pourront recourir aux anticorps monoclonaux, aux sondes nucléiques ou à la PCR, puis au séquençage de certaines parties du génome. Cette caractérisation du virus permet de distinguer les souches vaccinales des souches sauvages, et de déterminer éventuellement l'origine géographique de ces dernières.

- **En résumé**, les techniques utilisées habituellement en France pour le diagnostic de la rage au laboratoire sont **l'immunofluorescence et l'inoculation aux cultures cellulaires**. Compte tenu des défaillances de chacune de ces techniques, il n'est pas possible de conclure à l'absence de rage au vu des résultats d'une seule technique. Le laboratoire met donc en oeuvre systématiquement ces deux techniques. Les spécialistes de l'Institut Pasteur de Paris considèrent qu'un animal qui a fourni une réponse négative à ces deux techniques n'hébergeait pas de virus dans ses glandes salivaires et, par conséquent, ne risquait pas d'avoir contaminé une personne mordue.

III- Épreuves sérologiques

Les épreuves sérologiques sont rarement utilisées lors d'enquêtes épidémiologiques en raison de la séroconversion tardive et du faible pourcentage d'animaux qui survivent à la maladie et qui pourraient donc présenter des anticorps post-infection. La principale application de la sérologie est de déterminer la réponse à la vaccination des animaux domestiques avant un déplacement international ou celle d'espèces sauvages réservoirs du virus après vaccination par voie orale. Pour le suivi des campagnes de vaccination orale, des épreuves de séroneutralisation virale sur cultures cellulaires sont préférées. Cependant, si des sérums de faible qualité sont analysés, l'épreuve de séroneutralisation sur culture cellulaire peut conduire à des réactions faussement positives du fait de la cytotoxicité des sérums. Pour de tels échantillons, un test ELISA indirect utilisant des plaques tapissées de glycoprotéine du virus rabique s'est montré aussi sensible et spécifique que l'épreuve de neutralisation sur cellules.

De plus des réactions croisées sont possibles avec d'autres *Lyssavirus* entraînant des résultats faussement positifs.

RÉGLEMENTATION SANITAIRE

I- La réglementation actuelle sur la manipulation du virus

D'après l'arrêté du 18 Juillet 1994 (annexe 2), publié au Journal officiel de la République française le 30 juillet 1994, fixant la liste des agents biologiques pathogènes, le virus de la rage fait partie du groupe 3 de la classification des agents biologiques. De même d'après la directive 2000/54/CE du parlement européen du 18 septembre 2000, il fait également partie du groupe 3 de la classification des agents biologiques fixée par cette directive.

Ainsi la réglementation française et européenne s'accorde à dire que la manipulation du virus de la rage nécessite un niveau de confinement numéro 3.

Aux USA, la réglementation actuelle recommande d'utiliser des pratiques et des équipements de biosécurité de niveau 2 pour toutes les activités comportant la manipulation de tissus ou d'animaux infectés. Le niveau 3 de biosécurité est recommandé pour la production et la manipulation de grande quantité de virus de la rage (U.S. Department of Health and Human Services, 2007).

II- La réglementation actuelle sur l'importation des primates non humains

L'arrêté du 19 Avril 2002 (annexe 2) fixant les conditions sanitaires pour l'importation et le transit, sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outre-mer, des animaux vivants et de certains de leurs produits visés à l'article L. 236-1 du code rural, exige qu'un vétérinaire officiel certifie que tous les animaux importés ou transitant sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outre-mer en provenance des pays tiers destinés à des établissements de présentation au public à caractère mobile, visés par ce texte « sont originaires et proviennent d'un établissement dans lequel aucun cas de tuberculose et de rage ou d'autres zoonoses n'a été constaté au cours des deux dernières années » et « sont soumis, à J0 à une épreuve de recherche, avec résultats négatifs, des anticorps neutralisant le virus rabique par un laboratoire officiel [...], puis vaccinés à J0 par injection d'un vaccin inactivé d'au moins une unité antigénique internationale (norme OMS – Organisation mondiale de la santé) [...] et soumis à nouveau J30 à une épreuve de titrage des anticorps

neutralisant le virus rabique par un laboratoire officiel [...], relevant un titre sérique au moins égal à 0,5 unités internationales par millilitre trente jours après la vaccination et expédiés à J120. Dans le cas d'animaux qui ont fait l'objet d'une revaccination sans rupture du protocole vaccinal prescrit par le fabricant, les animaux ont été soumis à une épreuve de titrage des anticorps neutralisant le virus rabique par un laboratoire officiel [...], relevant un titre sérique au moins égal à 0,5 unités internationales par millilitre, trente jours après ce rappel. »

Ce même arrêté, exige qu'un vétérinaire officiel certifie que tous les animaux importés ou transitant sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outremer, destinés à des établissements d'expérimentation animale, des établissements d'élevage spécialisés, des établissements fournisseurs (au sens du décret 87-848 modifié du 19 octobre 1987) et des établissements de présentation au public à caractère fixe, en provenance des pays tiers

« Ont été :

- soumis, dans le cas des animaux non vaccinés contre la rage, à deux épreuves de recherche, avec résultats négatifs, des anticorps neutralisant le virus rabique par un laboratoire officiel [...] réalisées à l'entrée des animaux en quarantaine [...] et dans les 10 jours précédant l'expédition
- soumis, à J 0 à une épreuve de recherche, avec résultats négatifs, des anticorps neutralisant le virus rabique par un laboratoire officiel [...] réalisées à l'entrée des animaux en quarantaine, puis vaccinés à J 0 par injection d'un vaccin inactivé d'au moins une unité antigénique internationale (norme OMS Organisation mondiale de la santé) [...] et soumis à nouveau J 30 à une épreuve de titrage des anticorps neutralisant le virus rabique par un laboratoire officiel [...], relevant un titre sérique au moins égal à 0,5 unité internationale par millilitre 30 jours après la vaccination et expédiés à J 120,
- proviennent d'un pays tiers indemne de rage au sens du code zoosanitaire international de l'Office international des épizooties dans lequel ils ont séjourné sans discontinuité. »

III- Les mesures à prendre en cas de découverte des animaux enrégés, suspects et des mordeurs

La rage est à l'heure actuelle en France une **maladie réputée contagieuse**, à ce titre toute découverte d'un primate infecté vivant en France donne lieu à déclaration au préfet

(directeur départemental de Protection des Populations) et à l'application des mesures de police sanitaire.

Tableau 10 : Mesures prises à l'égard des animaux en cas de rage (Toma 2006)

Catégorie de l'animal	Définition		Devenir
	Zone indemne	Zone atteinte	
Enragé	Animal pour lequel un diagnostic de rage a été établi par un organisme ou un laboratoire agréé par M.A. ou M.S.		Déclaration obligatoire Abattage immédiat Arrêté préfectoral de déclaration d'infection
Suspect	<ul style="list-style-type: none"> • Animal sensible qui présente des symptômes évoquant la rage et non susceptibles d'être rattachés de façon certaine à une autre maladie. • Animal sensible qui a mordu* ou griffé une personne ou un animal, sans raison apparente et contrairement à son comportement habituel. 		Déclaration obligatoire Mise sous surveillance par arrêté préfectoral
Mordeur ou griffeur	Animal sensible qui <ul style="list-style-type: none"> • quel que soit le lieu a mordu ou griffé une personne • a mordu ou griffé un animal domestique, ou sauvage en captivité, et provient depuis <1 an d'un département infecté ou d'un pays atteint 		Mise sous surveillance d'un vétérinaire sanitaire pendant 15-30 jours
Contaminé	Animal sensible qui a été mordu ou griffé par un animal reconnu enragé (au cours d'une période définie par A.M.) Carnivore qui a été en contact avec un animal reconnu enragé (contact vrai ou supposé) au cours d'une période définie par A.M.)		Déclaration obligatoire Non vaccinés : abattage (herbivores, porcins, en vue de consommation entre 48 heures et 8 jours) Valablement vaccinés : dérogation à l'abattage possible pour herbivores, porcins, carnivores
Eventuellement contaminé**	Animal sensible qui a été mordu ou griffé par un animal suspect (au cours d'une période définie par A.M.) Carnivore qui a été en contact (vrai ou supposé) avec un animal suspect (au cours d'une période définie par A.M.) Tout animal sensible non carnivore qui a été en contact avec un animal reconnu enragé (au cours d'une période définie par A.M.)		Attente du résultat de la surveillance de l'animal suspect à l'origine de l'éventuelle contamination. Mesures décidées par DSV : <ul style="list-style-type: none"> • Si animal à l'origine de la contamination : inconnu ou en fuite • Si animal éventuellement contaminé : non carnivore

Dans le cas de « mordeur ou griffeur », la mise sous surveillance d'un vétérinaire sanitaire est de 30 jours pour la faune sauvage.

IV- Laboratoires de référence (Kandoorp 2004)

Laboratoire européen de référence :

AFSSA Nancy
Laboratoire d'Etudes sur la Rage et la Pathologie des Animaux sauvages
Domaine de Pixérécourt, B.P. 9,
F- 54220 Malzéville, France

Laboratoire de référence pour l'OIE :

Dr J. Barrat ou Mme F. Cliquet
AFSSA Nancy,

Laboratoire d'études sur la B058 et la pathologie de animaux sauvages
Domaine de Pixérécourt, BP 9,
54220 Malzéville
France
Tel : 03.83.29.89.50 Fax : 03.83.29.89.59
Email : jbarrat@nancy.afssa.fr
Email : fclicquet@nancy.afssa.fr

Laboratoire national de référence :

- AFSSA Nancy, Domaine de Pixérécourt
B.P. 9, F-54220 Malzéville
- Laboratoire vétérinaire Départemental de Haute-Garonne
78, rue Boudou
F-31140 Launaguet
- Laboratoire Départemental de la Sarthe
128 rue de Beaugé
F-72018 Le Mans, Cédex 2
- Laboratoire Départemental d'Analyse du Pas-de-Calais
Parc des Bonnettes
2, rue du Genévrier
62022 Arras Cedex
Tel. : 03 21 51 46 54

Ces 4 laboratoires sont autorisés à contrôler l'efficacité de la vaccination contre la rage chez certains carnivores domestiques.

En cas de contamination humaine :

Institut Pasteur Paris par le canal des Laboratoires vétérinaires Départementaux

Institut Pasteur Paris
28 rue du Docteur Roux
75 724 Paris Cedex 15

PROPHYLAXIE ET TRAITEMENT

I- Prophylaxie

a) Prophylaxie sanitaire

Rage des animaux sauvages : le principe est de **réduire** très fortement **la population de l'espèce animale vectrice** dans une zone assez large **le long de la frontière avec un pays infecté**. Mais ces mesures à elles seules ne sont pas suffisantes pour protéger un pays indemne. En effet, l'expérience prouve que, sauf cas particuliers de disposition géographique favorable, les mesures mises en œuvre sont d'une efficacité insuffisante pour protéger un pays indemne contre l'extension d'une rage véhiculée par des animaux sauvages sauf s'il s'agit d'une île ou d'une presqu'île.

De plus il faut respecter un certain nombre de règles de base :

- ne jamais caresser un animal sauvage
- prendre des précautions vis-à-vis des cadavres
- instaurer une quarantaine de 6 mois lors d'acquisition de nouveaux animaux, en particulier pour les carnivores et les Chiroptères
- lors de morsures, faire un suivi de l'animal (surveillance de l'animal).
- port de gants résistants aux morsures
- port de masque chirurgical pour le nettoyage des cages et le changement des litières
- lors de morsures par un primate, on doit désinfecter correctement et proprement à cause du risque de transmission de la rage mais également du tétanos ou de *l'herpès virus simien*
- euthanasie de tout animal mordu par un animal enragé sauf s'il est correctement vacciné et identifié (décision prise par le Directeur de la DDPP).
- vaccination préventive pour les personnes exposées dans leur métier.

Protocole de nettoyage d'une plaie par morsure :

- laver au savon puis rincer à l'eau courante, désinfecter la peau à l'eau de Javel diluée au 1/10 ème pendant 15 minutes (à défaut désinfecter la peau à la Bétadine, ou au Dakin, ou à la Chlorhexidine) En cas de projection sur les muqueuses ou la conjonctive oculaire, rincer abondamment à l'eau courante, ou mieux si possible sérum physiologique, pendant 15 min.

- observer le singe pendant 30 jours

- envisager un traitement préventif consistant à injecter du sérum antirabique avec des gamma globulines ou à faire des rappels de vaccination.

- faire aussi un traitement antitétanique et administrer des antibiotiques propres à combattre les infections autres que la rage.

b) Prophylaxie médicale

On distingue de nombreux types de vaccins, qu'on peut classer selon leur caractère vivant ou inactivé :

- vaccins à **virus inactivé** : ils sont **dépourvus de virulence résiduelle**, sont **plus stables**, mais ont un **pouvoir immunogène plus limité** s'ils ne contiennent pas d'adjuvant. Pour les animaux domestiques en France, on n'emploie plus que des vaccins à base de virus rabique produit en culture cellulaire, puis inactivé, adjuvé ou non.

- vaccins à **virus vivant** : ils possèdent une **virulence résiduelle** qui peut s'avérer dangereuse, mais en contrepartie possèdent un **bon pouvoir immunogène** malgré un titre viral beaucoup plus faible que celui des vaccins à virus inactivés. Ils sont par contre plus **fragiles à la chaleur**. On peut citer des vaccins destinés aux animaux domestiques dans certains pays, tels que le vaccin H.E.P. pour le chien, les bovins et le chat, qui présente une virulence résiduelle très importante, ou les vaccins Flury L.E.P. pour le chien de plus de 3 mois, qui ont également une virulence résiduelle importante, même si elle est moins élevée que pour le vaccin H.E.P.: ces vaccins sont **strictement interdits en France**, car trop dangereux. Les seuls vaccins à virus vivant autorisés en France sont les vaccins utilisés chez les animaux sauvages, qui sont des vaccins à virus vivant atténué ou des vaccins préparés par génie génétique: on peut citer, selon une virulence résiduelle décroissante, le vaccin S.A.D.B19, le vaccin S.A.G.2 et le vaccin recombinant vaccine-rage élaboré par génie génétique, utilisés pour la vaccination orale des renards.

On peut donc réaliser la vaccination des primates avec un vaccin à virus inactivé. Seul problème, il n'y a pas d'étude systématique de l'efficacité des vaccins chez les différents primates avec épreuve d'inoculation.

II- Traitement

Chez l'animal, on ne met en œuvre aucun traitement de la rage déclarée.

LA TUBERCULOSE

La tuberculose est une maladie infectieuse, commune à l'homme et à de nombreuses espèces animales. Elle est due à diverses espèces bactériennes appartenant au genre *Mycobacterium* et est caractérisée :

- Cliniquement, par une évolution le plus souvent chronique et un grand polymorphisme
- Anatomiquement, par des lésions inflammatoires : les tubercules.

La tuberculose est une maladie d'importance capitale en médecine humaine et en médecine vétérinaire du fait de son potentiel zoonotique (Benet 2006).

PRÉSENTATION DE L'AGENT

I- Classification

Les bacilles tuberculeux sont des bactéries classées dans :

Classe : *Actinobacteria*

Ordre : *Actinomycetales*

Sous-ordre : *Corynebacteriaceae*

Famille : *Mycobacteriaceae*

Genre : *Mycobacterium* (Benet 2006)

Le genre *Mycobacterium* est très largement représenté avec plus de 90 espèces de mycobactéries décrites à ce jour et que l'on peut répartir en trois groupes : les **bactéries pathogènes**, parasites strict de l'homme et des animaux, les **bactéries opportunistes** et les **bactéries saprophytes**.

a) Les mycobactéries pathogènes

Les mycobactéries pathogènes sont typiquement scindées en deux catégories selon qu'elles appartiennent ou non au « complexe d'espèces *Mycobacterium tuberculosis* ».

Ce complexe regroupe les mycobactéries responsables de la tuberculose chez différentes espèces et sont souvent qualifiées de « bacilles tuberculeux ».

On compte donc :

- *M. tuberculosis* (homme)
- *M. bovis* (ruminants)
- *M. microti* (campagnol)
- *M. africanum* (homme, surtout présent en Afrique)
- *M. pinnipedii* (otarie)
- *M. canetti* (homme)
- *M. caprae* (chèvre)

Chez les primates, les mycobactéries les plus souvent isolées sont *M. tuberculosis*, *M. bovis* et *M. africanum*. Dans la suite de ce chapitre, on s'intéressera exclusivement aux mycobactéries de ce complexe.

Les mycobactéries pathogènes n'appartenant pas à ce complexe sont responsables de maladies graves mais différentes de la tuberculose :

- *M. leprae* (lèpre humaine)
- *M. lepraemurium* (lèpre murine)
- *M. farcinogenes* (farci du bœuf)
- *M. avium* (« tuberculose » aviaire)
- *M. avium paratuberculosis* (paratuberculose des ruminants, maladie de Crohn humaine)

b) Les mycobactéries opportunistes

Les mycobactéries opportunistes provoquent des infections peu ou pas contagieuses, souvent bénignes, mais cliniquement identiques à la tuberculose (localisations pulmonaire, ganglionnaire, mammaire, cutanée). Citons pour exemples *M. chelonae*, *M. intracellulare*, *M.*

marinum, *M. fortuitum*, *M. goodnae*, *M. ulcerans* et *M. xenopi* (Benet 2006).

c) Les mycobactéries saprophytes

Les mycobactéries saprophytes sont très nombreuses dans l'environnement (eau, sol, herbe, tube digestif, peau, muqueuse, lait...) et souvent très peu pathogènes. Citons pour exemples *M. gastri*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. terrae* et *M. elephantis* (Benet 2006).

Conséquence pratique :

Toute mycobactérie isolée doit faire l'objet de la détermination de l'espèce, afin de permettre l'évaluation de son rôle pathogène dans le processus étudié.

II- Principales caractéristiques des bacilles tuberculeux

a) Morphologie générale

D'un point de vue morphologique, les mycobactéries sont des organismes :

- droits ou légèrement incurvés,
- parfois ramifiés,
- longs et fins, en forme de bâtonnet (1,5-4 x 0,2-0,6 μm),
- asporulés et acapsulés,
- immobiles,
- présents tant à l'intérieur qu'à l'extérieur des cellules.



Illustration 8 : *Mycobacterium tuberculosis* (microscopie électronique, image CDC).

Ces caractéristiques morphologiques sont semblables pour toutes les mycobactéries et ne permettent donc pas de les distinguer les unes des autres. Le recours à d'autres moyens (caractères cultureux, biochimiques ou génétiques) est nécessaire afin d'identifier l'espèce en cause.

b) Propriétés tinctoriales

Les mycobactéries se colorent très mal par les techniques conventionnelles : leur paroi riche en lipides, rend difficile la pénétration des colorants. Cependant toutes les mycobactéries possèdent une propriété tinctoriale particulière : Bacille Acido-Alcool-Résistant ou B.A.R.R. ou coloration de ZIEHL-NIELSEN. Une fois colorées par la fuchsine ou par un fluochrome comme l'auramine, ces bactéries ne sont décolorables ni par les acides ni par l'alcool (Benet 2006). Cependant ceci ne permet pas d'identifier l'espèce mycobactérienne en cause.

c) Caractères cultureux

Les mycobactéries se différencient entre elles par leurs caractères cultureux : selon le groupe de mycobactéries, la croissance est rapide ou lente, les colonies pigmentées ou non et le milieu utilisé est plus ou moins exigeant.

En ce qui concerne les bacilles tuberculeux impliqués dans la tuberculose chez les primates (c'est-à-dire *M. tuberculosis*, *M. bovis* et *M. africanum*) :

- La mise en culture nécessite un milieu adapté, toujours enrichi (milieu de type Lowenstein-Jensen) et une température d'incubation de 37°C.
- Leur croissance est lente (temps de génération proche de 20 heures) : 12 jours d'incubation sont au minimum nécessaires avant le premier repiquage.
- Les colonies sont non pigmentées, mates, peu bombées et souvent irrégulières.
 - *M. tuberculosis* donne des colonies rugueuses de teinte beige (en vieillissant, aspect en chou fleur de couleur chamoisée) et présente une croissance qualifiée d'eugonique.
 - *M. bovis* donne de petites colonies lisses (taille d'une tête d'épingle) et présente une croissance dysgonique (c'est-à-dire d'aspect différent de celle de *M. tuberculosis*).
 - *M. africanum* donne de petites colonies d'aspect rugueux, crème, mates, avec un bourgeon central (aspect en « tache de bougie ») et à croissance « dysgonique ».

d) Caractéristiques biochimiques et génétiques

Le génome des mycobactéries possède un contenu en bases guanosine-cytosine (GC) élevé, en moyenne 65,6 %.

Leurs caractéristiques biochimiques permettent de les identifier lors d'isolement :

- *M. tuberculosis* : accumule de l'acide nicotinique (test à la niacine positif), croît en présence de TCH (acide thiophènedicarboxylique), est positif au test de la nitrate réductase et possède une catalase thermolabile.
- *M. bovis* : ne croît pas en présence de TCH, est négatif aux tests de la niacine et de la nitrate réductase et possède une catalase thermolabile (Denis 2007).

e) Sensibilités et résistances

Les caractéristiques structurales des bacilles tuberculeux, et notamment le fait que leur paroi contienne des acides mycoliques, expliquent les propriétés particulières de sensibilité et de résistance de cette famille. Citons quelques unes de ces propriétés :

- Les mycobactéries sont résistantes :
 - o au froid,
 - o à la dessiccation (environ 5 années de survie à l'état desséché),
 - o dans l'air et les poussières,
 - o aux antibiotiques usuels (pénicilline, tétracycline, chloramphénicol...),
 - o à certains antiseptiques et désinfectants chimiques (notamment aux acides et bases en solution).

- Les mycobactéries sont néanmoins sensibles :
 - o à la chaleur (20 minutes à 60°C, 20 secondes à 75°C),
 - o aux rayons Ultra Violet (UV),
 - o à la lumière naturelle (temps de survie à la lumière naturelle : 40 jours, contre 5 mois à l'obscurité),
 - o à certains antibiotiques, seul ou en association (dont l'isoniazide, l'éthambutol, la rifampicine et la pyrazinamide sont les principaux exemples), qualifiés d'antituberculeux
 - o à certains désinfectants utilisés à des doses adéquates (iode, alcool, dérivés phénoliques, hypochlorites, formol).

En bref, comparativement à d'autres bactéries, les bacilles tuberculeux présentent une assez bonne résistance dans l'environnement et vis à vis des antibactériens les plus couramment employés et il conviendra d'en tenir compte lors de la mise en place de plan d'éradication. Leur sensibilité à la chaleur (pasteurisation) et aux U.V., constitue une piste efficace pour leur élimination dans l'environnement (Benet 2006).

III- Pathogénie

Les conditions de l'infection dépendent du bacille (virulence), de l'hôte (réceptivité) et aux modalités de contamination (dose infectante et répétition des doses). La transmission est essentiellement aérienne, par l'intermédiaire d'aérosols infectés produits par un malade contagieux. Le risque de contamination est d'autant plus élevé que la concentration de bacilles est importante dans l'air inhalé. Les petites particules de 3 à 5 μ comportant 1 à 3 bacilles pénètrent jusqu'aux alvéoles pulmonaires où ils vont se multiplier.

Une fois dans le parenchyme pulmonaire, les bacilles sont phagocytés par les macrophages entraînant une réaction inflammatoire locale. La multiplication intra-vacuolaire des bacilles aboutit à la destruction des macrophages et la libération de nombreux bacilles qui seront phagocytés par d'autres macrophages et d'autres cellules phagocytes (monocytes et polynucléaires...).

L'activation des macrophages entraîne un arrêt de la croissance bactérienne. Les phagocytes sont transformés en cellules épithélioïdes avec formation d'un granulome au sein duquel la lyse cellulaire se présente sous forme d'une nécrose blanchâtre : le caséum.

A partir de cette lésion primaire, les bacilles libres ou phagocytés par les macrophages, peuvent progresser par voie lymphatique jusqu'à un ganglion satellite créant le complexe ganglio-pulmonaire de la primo-infection tuberculeuse (P.I.T).

En fonction du contrôle effectué par les macrophages sur la croissance des bacilles, l'infection va régresser en se calcifiant, s'étendre, ou laisser persister des bacilles quiescents qui pourront se réactiver à l'occasion de conditions défavorables. Les P.I.T sont le plus souvent cliniquement inapparentes et guérissent spontanément dans 95 % des cas.

Dans 5 % des cas l'infection est évolutive et c'est la tuberculose maladie : le granulome actif est dépassé (quantité de bacilles transmis trop abondante, jeune âge, état d'immunodépression et ne parvient plus à contenir la croissance bactérienne qui se développe librement dans les

espaces alvéolaires ou dans les macrophages infectés. Ces derniers peuvent conduire les bacilles au niveau des ganglions régionaux. Si cette barrière est dépassée, les bacilles tuberculeux peuvent disséminer par voie lymphatique ou sanguine vers les tissus les mieux vascularisés : apex pulmonaires, reins, corps vertébraux, séreuses, foie, épiphyses des os longs et méninges.

En l'absence de traitement, la tuberculose maladie évolue soit vers la mort (50 %), vers la guérison (25 %) ou vers la chronicité (25 %) (CNRS 2009).

DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES

I- Répartition géographique

M. tuberculosis et *M. bovis* ont une répartition mondiale. *M. africanum* est prévalent en Afrique mais a également été isolé en Allemagne et en Angleterre. On trouve des souches de *M. africanum* phénotypiquement apparentés à *M. tuberculosis* en Afrique occidentale, elles sont nitrase-positives. Les souches similaires à *M. bovis* sont nitrase-négatives et sont le plus souvent isolées en Afrique orientale.

Maladie cosmopolite, l'incidence est cependant variable d'un pays à l'autre. En France, l'incidence était, en 2002, de 10,5 cas pour 100 000 habitants (5,6/100 000 chez les Français, 64,9/100 000 chez les étrangers). Certains pays africains ont des incidences de 200/100 000. La tuberculose animale est très rare dans la plupart des pays d'Europe occidentale et en Amérique du nord et fréquente dans les pays en voie de développement. La maladie humaine en France a touché 10 000 cas en 1987 et 6 855 en 1997 (Acha 2005 et CNRS 2009).

II- Espèces sensibles

La tuberculose concerne l'homme ainsi que de nombreuses espèces animales domestiques (bovins, ovins, chiens, chats, caprins porcins volailles, équidés) ou sauvages. Parmi les animaux sauvages, les primates non humains jouent un rôle très important dans l'interrelation entre la tuberculose humaine et animale en animalerie d'expérimentation. Le primate est sensible à *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* et *M. avium*.

Les autres animaux sauvages sensibles sont nombreux: le bison, les cervidés, lion, guépard, furet, blaireau, hérisson, lièvre, buffle, oryx, otarie... (CNRS 2009)

A part quelques cas rapportés en milieu naturel (Keet 2000, Sapolsky 1987 et Tarara 1985), la majorité des tuberculoses recensés chez les primates non humains, concernent des individus évoluant à l'état captif. Même si les primates peuvent potentiellement être atteints par tous les bacilles tuberculeux, les agents les plus isolés sont *M. tuberculosis* (75%) et *M. bovis* (24%) (Chomel 2004). Les cas de tuberculose à *M. tuberculosis* se concentrent aux régions où la prévalence de la tuberculose est élevée dans la population humaine (notamment en Asie) et l'origine des contaminations est alors essentiellement attribuée à l'homme. Le bacille

tuberculeux bovin est lui aussi largement isolés dans les collections de PNH de parcs zoologiques et les cibles sont multiples. Le tableau suivant en présente quelques exemples. Un plus grand nombre d'espèces de singes de l'ancien monde est atteint comparativement aux espèces du nouveau monde. Là encore, la propagation de l'infection au sein d'un même groupe et entre espèces est rapportée. Les PNH peuvent d'autre part constituer une source de contamination pour l'homme qui reste d'autant plus inquiétante pour les animaux porteurs de *M. tuberculosis*.

Tableau 11 : quelques exemples de tuberculoses rapportés chez les primates non humains en parcs zoologiques. (TIS : transmission interspécifique) (Riquelme 2009).

Espèces		localisation	Nbre	Agents	TIS	Références
Mandrille	<i>Mandrillus sphinx</i>	Portugal	2	<i>M. tuberculosis</i>		[Amado <i>et al.</i> (2006)]
Singes du nouveau monde		Colombie	11%	<i>M. tuberculosis</i>		[Alfonso <i>et al.</i> (2004)]
Chimpanzés	<i>Pan troglodyte</i>	Afrique du Sud	4	<i>M. tuberculosis</i>		[Michel <i>et al.</i> (2003)]
Langur			1			
Babouins	<i>Papio papio</i>	Etats-Unis		<i>M. bovis</i>		[Thoen <i>et al.</i> (1977)]
			1	<i>M. tuberculosis</i>		Michel <i>et al.</i> (2003)]
Macaques Patas Gibbon	<i>Macaca silenus</i> <i>Erythro. patas</i> <i>Symphalangus syndactylus</i>	Irlande	3	<i>M. bovis</i>		[Wilson (1990)]
Colobes	<i>Colobus guereza caudatus</i>	Etats-Unis	2	<i>M. bovis</i>	Rhinoceros blanc	[Setter <i>et al.</i> (1995)]
Babouins	<i>Papio hamadryas</i>	Pays Bas		<i>M. bovis</i>	Léopard / otarie	[Thorel <i>et al.</i> (1998)]

III- Transmission

a) Sources de contamination

La principale source de contagion est représentée par les individus tuberculeux. En parc zoologique, les animaux peuvent se contaminer lorsqu'un individu malade est introduit

dans le groupe et éventuellement dans certains pays lors de contact avec le public (lorsque la prévalence dans la population humaine est important) ou avec la faune sauvage exogène. L'expansion de l'écotourisme dans les zones de vie de la faune sauvage est un risque d'exposition aux pathogènes humains pour les animaux. On rapporte d'ailleurs des épidémies de *Mycobacterium tuberculosis*, pathogène humain, chez des Mangoustes au Bostwana et des Suricates en Afrique du Sud (Alexander 2002).

L'excrétion bacillaire est précoce (avant l'apparition des premiers symptômes), durable (toute la maladie) et peut être très important dans le cas de lésions ouvertes. La transmission des agents tuberculeux se fait essentiellement par la salive, les sécrétions nasales et les expectorations. Bien que moins fréquente, d'autres matières virulentes sont à considérer notamment lors d'infection à *M. bovis* : lait, urines, fèces, semences et sécrétions utérines lorsque les organes associés sont atteints.

Les organes et les ganglions, sièges du foyer tuberculeux, les muscles proches de ce foyer et le sang (bien que la bacillémie soit rare et transitoire) contiennent également des bacilles vivants et sont donc des potentielles sources d'infection.

Par ailleurs, la résistance du bacille tuberculeux étant élevée dans l'environnement, l'eau, la nourriture et le matériel d'élevage peuvent être considérés comme des sources d'infection s'ils ont été antérieurement contaminés par des particules infectieuses (Benet 2006).

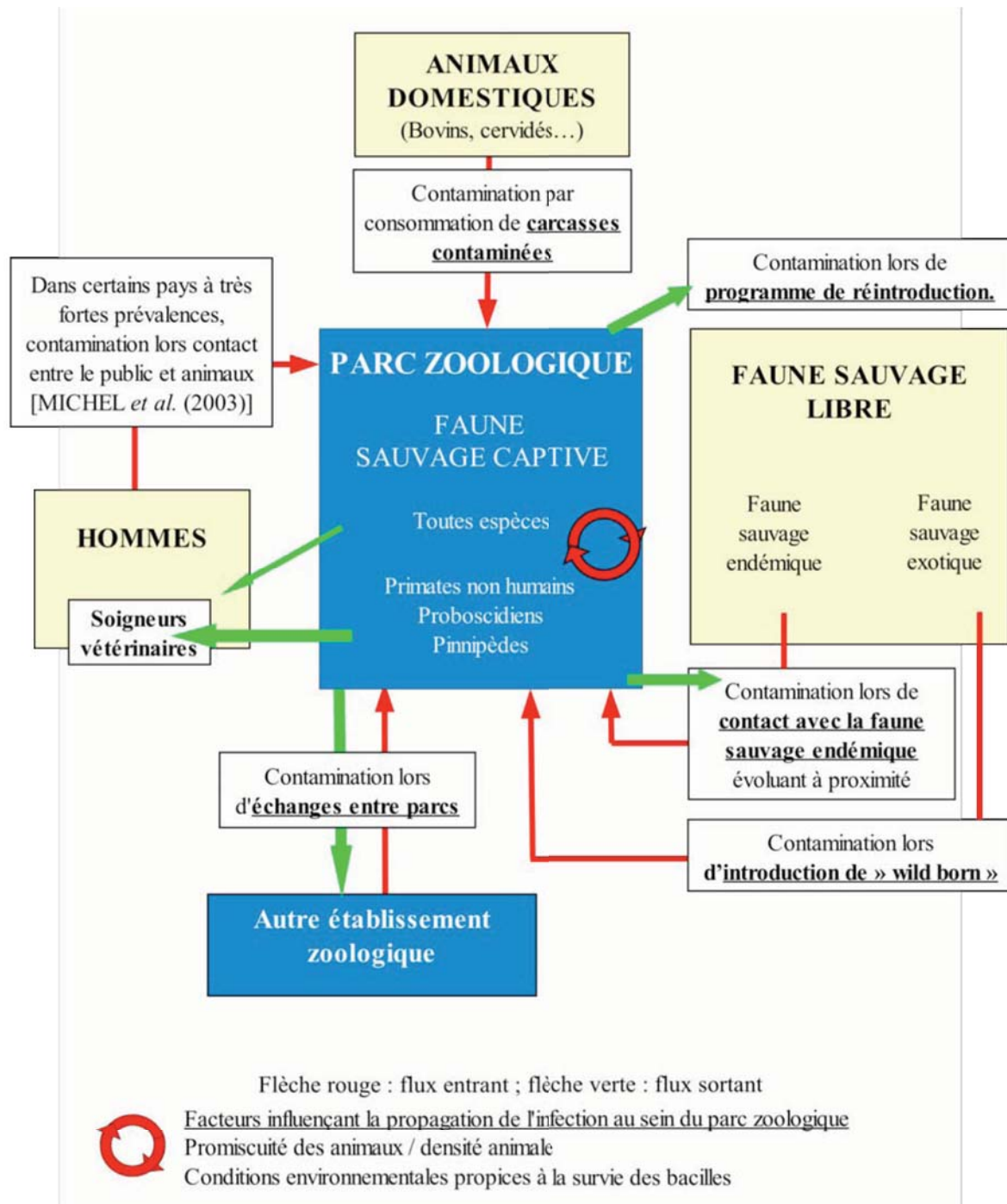
b) Modes de transmission

Il n'y a pas de transmission verticale de la tuberculose. La transmission de la maladie est donc uniquement horizontale : elle peut être directe (contacts étroits entre les individus, lactation) ou indirecte (via les locaux, le matériel d'élevage, l'eau ou les aliments).

Même si l'infection tuberculeuse par voie aérogène semble de loin la plus fréquente en parc zoologique, d'autres voies de contamination sont possibles :

- voie respiratoire
- voie digestive
- voie cutanée. Cette voie de contamination peut être à l'origine de transmission de la tuberculose de l'animal à l'homme (lors de manipulation de carcasses avec des lésions tuberculeuses).
- via les muqueuses (muqueuses oculaire, nasale et génitale).

Figure 4 : schéma récapitulatif des voies possibles de transmission de la tuberculose entre la faune domestique, sauvage et l'homme (Riquelme 2009).



c) Facteurs de réceptivité

Les différents bacilles tuberculeux, malgré des hôtes préférentiels, sont susceptibles de contaminer un très grand nombre d'espèces sauvages. En présence d'une source infectieuse, le risque de contagion est régi par de nombreux facteurs, intrinsèques au sujet-source, au sujet-cible, au bacille et à leur environnement. Les conditions de vie en captivité (promiscuité des

animaux et environnement propice à la survie des bacilles) ainsi que les modes de fonctionnement des parcs zoologiques (nombreux échanges entre parcs) favorisent les contaminations et la propagation de l'infection.

Chez les primates non humain par exemple, il existe une sensibilité variable à *M. tuberculosis* suivant les espèces :

- Les primates asiatiques de l'ancien monde, tel que les macaques Rhésus (*Macaca mulatta*) sont particulièrement sensibles à cette infection. La maladie évolue rapidement avec une mort dans l'année qui suit l'infection (en moyenne dans les 4 à 6 mois) ;
- Les primates africains de l'ancien monde, dont les babouins et grands singes, sont considérés de sensibilité intermédiaire, avec une maladie évoluant plus lentement ;
- Enfin, chez les primates sud américains, une infection par *M. tuberculosis* est beaucoup plus rare (Montali 2001).

EXPRESSION CLINIQUE

La tuberculose évolue de façon discrète et rapide chez les sujets, évoquant la phtysie galopante humaine. Dans les singeries strictement contrôlées, il a été constaté que 75 % des singes mouraient entre le 5ème et le 6ème mois suivant la première réaction tuberculique positive. Expérimentalement, il s'écoule 4 à 6 semaines entre l'inoculation contaminante et la mort. Les signes cliniques généraux et spécifiques sont absents ou très discrets. Lorsque le clinicien est consulté, l'animal se trouve en phase finale d'évolution et la mort survient généralement dans les jours qui suivent.

Les symptômes les plus précoces seraient une certaine indifférence à l'environnement ainsi qu'une vigueur moins affirmée dans les activités physiques habituelles au sujet; ils ne sont appréciables que si l'on connaît très bien l'animal. Les signes spécifiques respiratoires (légère dyspnée) et digestifs (alternance de diarrhée et excréments normaux) sont souvent extrêmement discrets (Benet 2006).

Au sein des primates non humains, le tableau lésionnel de la tuberculose est très variable, dépendamment du degré de sensibilité de l'espèce infectée. Les lésions varient aussi avec la rapidité d'évolution et le stade de la maladie. Les localisations préférentielles des lésions sont les poumons et les nœuds lymphatiques pulmonaires. Secondairement, les lésions peuvent atteindre la rate, les reins, le foie et les nœuds lymphatiques associés (Michel 2003). D'autres lésions ont pu être décrites : omentum, ovaires, système nerveux central, nœuds lymphatiques périphériques, peau et glandes mammaires.

Les lésions peuvent être soit non décelables macroscopiquement soit largement disséminées et se présentent généralement comme des granulomes caséeux blanc jaunâtre à gris. Leur taille varie du nodule de moins d'1mm à de larges lésions coalescentes. Les lésions pulmonaires peuvent prendre différents aspects, nodule localisé, lésion coalescente ou cavitaire et sont souvent accompagnées d'une atteinte des nœuds lymphatiques loco-régionaux qui présentent des nodules caséeux. Bien que l'aspect histologique de lésions peut être très variable, les lésions se composent le plus souvent par un corps central de débris nécrotiques acellulaires entouré par des macrophages épithéloïdes avec des cellules géantes de Langhans. En présence d'une infection récente (localisation : poumons ou intestins) de petits granulomes entourés de cellules épithéloïdes (mais peu de cellules géantes) et avec quelques neutrophiles au centre peuvent être observés. Enfin chez les PNH, le processus de calcification de lésions est plus rare que chez l'homme et les bovidés (Riquelme 2009).

MÉTHODES DIAGNOSTIQUES

Le diagnostic de la tuberculose chez les espèces sauvages et notamment chez les primates trouve ses limites dans les techniques classiques de dépistage, notamment pour des raisons évidentes de contention. Certains examens complémentaires utilisés lors de recherche d'une tuberculose sont peu réalisables soit par manque de référence soit par carences techniques. On distingue les méthodes de diagnostic classiques, directes et immunologiques.

I- Diagnostic clinique et anatomo-pathologique

a) Examen clinique

Les signes cliniques chez les primates sont :

- atteinte de l'état général
- perte de poids
- oscillation de la température corporelle
- symptômes digestifs : diarrhée ou constipation
- symptômes respiratoires : toux et respiration discordantes
- symptômes locaux qui dépendent de la localisation du foyer tuberculeux.

Les signes cliniques étant peu spécifiques, de nombreux diagnostics différentiels peuvent être formulés. Lorsque seul un amaigrissement, une anorexie ou un abattement est noté (ce qui illustre le tableau clinique le plus fréquemment rencontré), différentes affections peuvent y correspondre, notamment une affection dentaire, un phénomène néoplasique, du parasitisme gastro-intestinal ou une maladie dégénérative. Cela reste donc une technique peu fiable.

b) Examens complémentaires

Les examens complémentaires sont limités en raison notamment des difficultés de contention, des risques à l'anesthésie... Bien qu'ils ne permettent pas d'établir un diagnostic définitif, ces examens peuvent fournir des indications intéressantes pour l'orientation du diagnostic.

Détermination des paramètres hématologiques et biochimiques

On peut noter quelques modifications dans les paramètres hématologiques et biochimiques lors d'infection par la tuberculose :

- neutrophilie transitoire lors de la primo infection
- pancytopenie dans les formes pulmonaires actives
- diminution possible des protéines totales et du ratio albumine/globuline.

Ainsi l'apport de la biologie clinique reste limitée dans le diagnostic de la tuberculose chez les primates.

Imagerie :

- Endoscopie et laparoscopie pour voir et prélever les lésions. L'endoscopie est une méthode d'exploration très utile mais la localisation et le volume des granulomes tuberculeux les rendent souvent difficiles d'accès, quelque soit la méthode, en particulier lors d'infection latente.
- Clichés radiographiques : intérêt limité chez les espèces sauvages.
- Scanner : appareil difficile d'accès et rarement utilisé en routine.
- Echographie.

c) Diagnostic post-mortem

Après la mort de l'animal, des lésions évocatrices de la tuberculose peuvent être découvertes directement à l'autopsie et/ou lors de l'analyse histopathologique des organes (lésions microscopiques). Il existe un grand polymorphisme des lésions tuberculeuses tant dans leur forme que dans leur taille ou leur localisation :

- Du tubercule bien délimité, purulent, calcifié ou fibrotique à l'infiltration exsudative, les lésions peuvent revêtir des aspects très divers en fonction de l'individu et du stade de l'infection.
- Les lésions peuvent être discrètes et éparses comme volumineuses et étendues.

Bien que l'autopsie ne soit pas un moyen diagnostique parfaitement sensible ni hautement spécifique, elle permet d'orienter fortement les hypothèses diagnostiques en faveur d'une tuberculose lorsque des tubercules sont décelés. L'envoi de pièces anatomiques au laboratoire d'histopathologie afin d'effectuer une analyse microscopique des lésions permet d'affiner la suspicion.

II- Méthodes de diagnostic direct

a) Examen direct et mise en évidence de l'acido-alcool-résistance

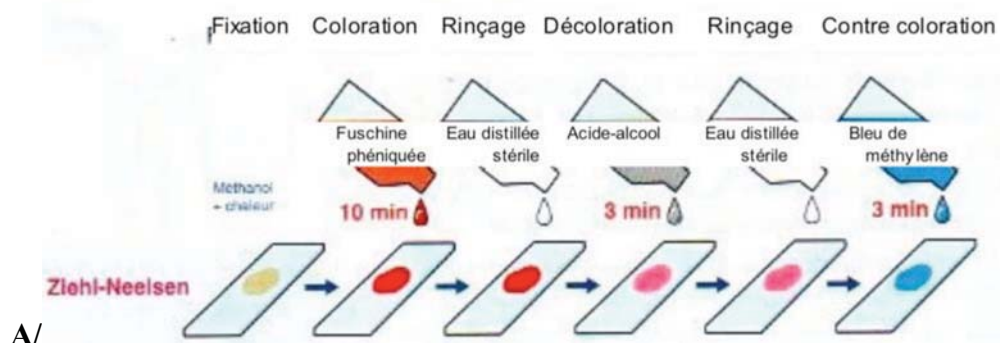
Principe: Toutes les bactéries de l'ordre des *Actinomycétales* possèdent une propriété tinctoriale particulière due à la richesse en lipides de leur paroi: l'acido-alcool-résistance (A.A.R.). La mise en évidence de cette propriété peut être réalisée grâce à plusieurs techniques de coloration, suivies d'un examen microscopique direct :

- La méthode de Ziehl-Neelsen qui utilise la fuschine : les B.A.A.R. apparaissent alors comme des fins bâtonnets rouges.
- La méthode de Degommier qui utilise l'Auramine : les B.A.A.R. apparaissent alors en vert jaune, brillants sur un fond rouge orangé.
- D'autres méthodes existent (Kinyoun notamment) mais les B.A.A.R. apparaissent pâles et les colorations manquent de contraste : elles ne sont pas à conseiller en routine.

Avantage : facile à réaliser et rapide, bon indicateur épidémiologique car la présence de B.A.A.R. à l'examen direct signale la présence d'un grand nombre de bacilles.

Inconvénient : technique peu sensible, la limite de détection est d'environ 1000 à 10000 UFC (Unités Formant Colonies) par millilitre (contre 100 UFC/mL lors de mise en culture).

De plus la technique est peu spécifique, il existe d'autres bactéries A.A.R. notamment les bactéries du genre *Nocardia* et *Corynebacterium*.



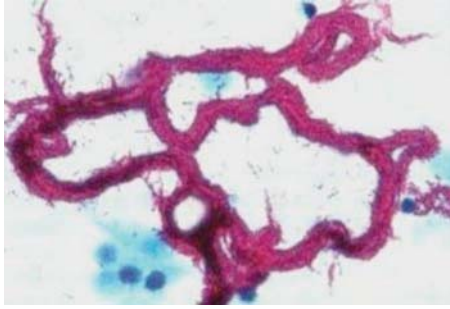


Illustration 9 :
A / étapes de la coloration de Ziehl-Neelsen
B / aspects en cordes de *M. tuberculosis*.
(Riquelme 2009)

B/

b) Culture bactériologique

La culture bactérienne peut se réaliser à partir de prélèvements de diverse nature mais nécessite le plus souvent une phase de décontamination avant l'ensemencement. Les bacilles tuberculeux, aux exigences nutritives particulières, se cultivent sur des milieux spécifiques, solides ou liquides, et l'identification de l'espèce se fait à partir des caractéristiques phénotypiques (morphologiques et biochimiques) des colonies obtenues. Bien que la culture bactérienne reste la technique de référence pour confirmer une suspicion de tuberculose, elle est limitée par des délais d'attente longs qui ne permettent pas de répondre rapidement au diagnostic par la mise en place de mesures d'éradication. Un délai normal de 7 semaines environ est nécessaire pour identifier l'espèce de la mycobactérie (cependant moins il y a de bacilles, plus le délai est long). L'emploi de milieux liquides couplés à une détection automatique de la croissance (MGIT 960®, MB9000®, BacT/Alert3D®) présente l'avantage de réduire les temps de culture (quelques jours pour les prélèvements riches en bacilles) et de permettre une détection plus sensible et automatisée (Denis 2007).

Avantages :

- Bonne spécificité excellente et bonne reproductibilité.
- Seuil de détection $10-10^2/ml$ (> à certaines doses infectieuses)
- La culture permet l'identification de l'espèce mycobactérienne en cause.
- L'obtention d'isolats mycobactériens est l'étape préliminaire indispensable à :
 - la réalisation d'un génotypage de la bactérie par R.F.L.P. ou spoligotyping
 - la culture bactérienne permet aussi la réalisation d'un antibiogramme qui s'avère important en terme de santé public (surveillance des souches résistantes).

Inconvénients :

- Délai de 2 à 8 semaines : test lent.
- Sensibilité médiocre.
- De nombreuses autres bactéries pathogènes ou non, présentes dans l'échantillon peuvent croître et gêner l'identification de la mycobactérie en cause.

c) Méthodes basées sur la détection des acides nucléiques

De l'analyse par amplification des acides nucléiques à l'analyse par R.F.L.P., les techniques basées sur la détection du génome mycobactérien, sont clairement prometteuses. Elles permettent non seulement la détection d'une mycobactérie, mais également la distinction des différentes espèces au sein du « complexe *M. tuberculosis* » et l'identification des souches en cause. Ces méthodes ne sont pas encore très facilement accessibles, elles ont, pour la plupart, été validées chez les espèces domestiques et sont en cours d'investigation pour les espèces sauvages.

i) Méthodes d'amplification génomique

La détermination des espèces au sein du complexe *tuberculosis* peut se faire à partir d'une caractérisation génotypique, par l'utilisation de diverses méthodes d'amplification. La LCR (Ligase Chain Reaction), la PCR (Polymerase Chain Reaction) et la SDA (Strand displacement amplification) permettent l'amplification de l'ADN mycobactérien, la TMA (Transcription-Mediated Amplification) amplifie l'ARN (en réalité ARN16s) de la mycobactérie. Certains laboratoires de médecine humaine commercialisent même ces techniques en kits (AMPLICOR® [Roche] pour la PCR ; AMTD® [Gen-Probe] pour la TMA ; LCxMTB® [Abbot] pour la LCR ; BDProbe Tec® [Becton Dickinson] pour la SDA) (DENIS 2004). Elles peuvent être utilisées sur des échantillons de diverses natures tels que lavements trachéaux et prélèvements de tissus (granulome, organe lésé, selles).

Avantage :

- comparativement à la mise en culture, tests rapides.
- Seuil de détection bas.

Inconvénient :

- La sensibilité décroît fortement en fonction du matériel nucléaire effectivement disponible dans l'échantillon, ainsi que de la longueur de l'amplicon recherché

(présence aléatoire des mycobactéries dans les échantillons provenant d'animaux infectés).

- La contamination de l'échantillon peut compliquer la recherche de l'agent pathogène.

ii) Méthodes de génotypage : R.F.L.P. et spoligotyping

Les méthodes de génotypage sont des techniques permettant d'identifier les différentes souches d'une même espèce mycobactérienne. Ce sont de nouvelles méthodes de typage moléculaire qui complètent les enquêtes épidémiologiques classiques.

* *Méthode de référence, RFLP « Restriction Fragment Length Polymorphism »*

L'ADN mycobactérien est d'abord extrait (à partir d'une culture), purifié, puis amplifié par P.C.R. Cet ADN est ensuite coupé en fragments par une enzyme de restriction, coupant l'ADN au niveau de sites qui lui sont spécifiques (sites de restriction) et qui correspondent à la présence dans le génome d'éléments d'insertion. Les fragments d'ADN obtenus (fragments de restriction) sont ensuite séparés selon leur longueur par électrophorèse sur gel d'agarose. Le gel obtenu est finalement analysé par Southern Blot et révélé avec une ou plusieurs sondes. La distance entre deux éléments d'insertion étant variable selon les individus, le nombre et la longueur des fragments de restriction varient également. Les positions des bandes d'ADN sur le gel d'électrophorèse seront donc différentes d'un individu à l'autre et détermineront le profil génétique des souches analysées (Botstein 2009).

* *Méthode par PCR, le « spoligotyping ».*

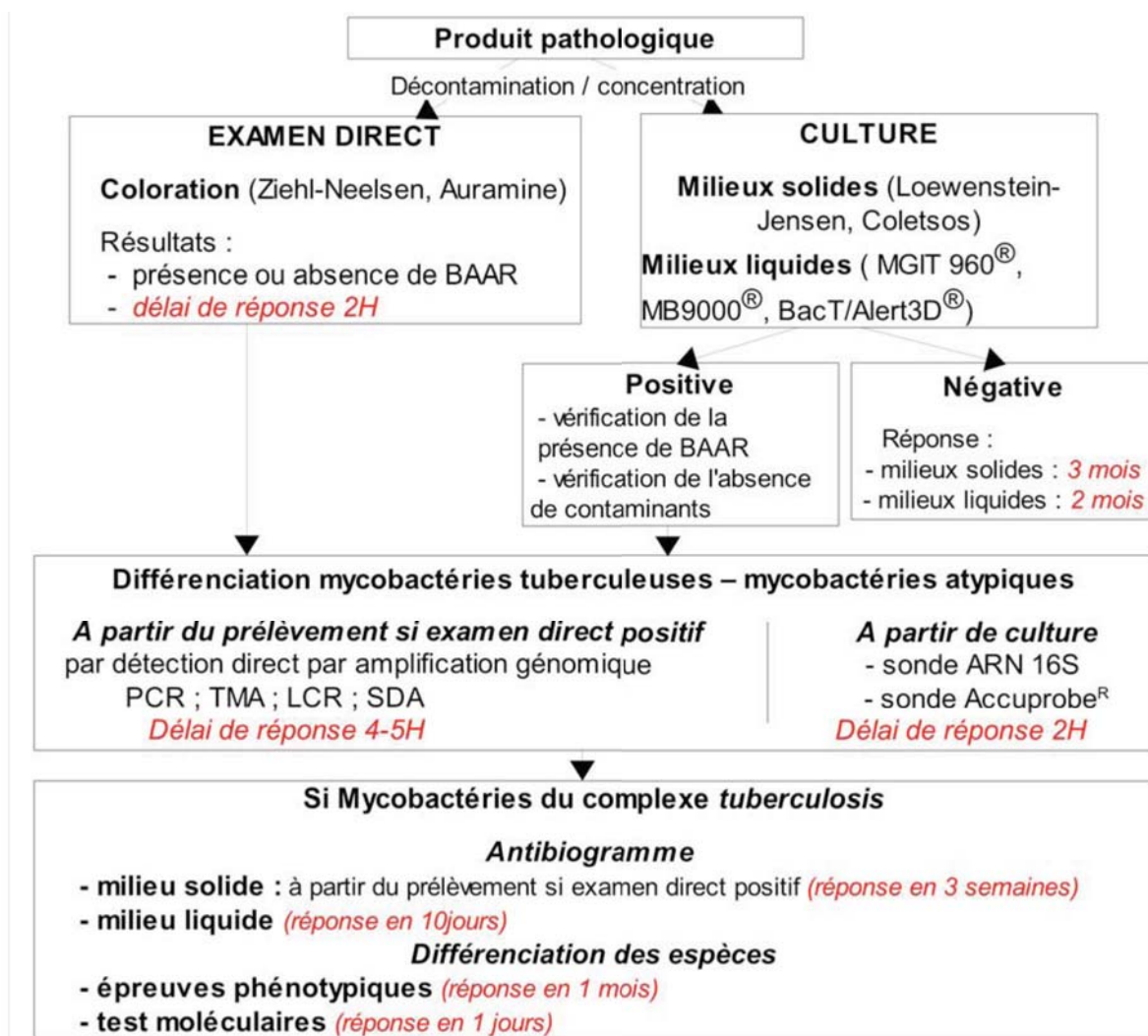
La méthode RFLP est lourde (nécessite notamment plusieurs milligramme de culture mycobactérienne) et lente (la réalisation technique s'effectue en une dizaine de jours). Les méthodes de typage récentes permettent l'obtention de résultats en 48H à partir de quelques colonies ou de culture en milieu liquide. La méthode «spoligotyping» (pour Spacers Oligotypage) repose sur la détection du polymorphisme dans la région DR, spécifique du complexe *tuberculosis*. Cette région est caractérisée par l'alternance de régions identiques, appelées DR et de régions toutes différentes les unes des autres, les « spacers ». Ces séquences varient d'une souches à l'autre par leur longueur, leur séquence et leur nombre. Le « spoligotyping » est plus discriminant que la méthode RFLP IS6110 pour les souches à faible nombre de copies d'IS6110 (*M. bovis*), mais la méthode de référence RFLP IS6110, reste plus performante pour les autres souches (*M. tuberculosis*) (Denis 2004).

Conclusion sur les méthodes de diagnostic directes :

Les méthodes bactériologiques demeurent fondamentales pour la confirmation définitive de l'infection, l'identification des animaux excréteurs et la réalisation d'antibiogrammes.

Mais les méthodes directes ne permettent de détecter que les animaux excréteurs au moment de la collecte de l'échantillon, par conséquent le développement de méthodes indirectes permet d'identifier les animaux ayant été en contact avec la mycobactérie, qu'ils soient excréteurs ou non.

Figure 5 : principales étapes du diagnostic bactériologique des infections tuberculeuses (Riquelme 2009).



III- Méthodes de diagnostic indirect

Le diagnostic indirect de la tuberculose chez les primates repose sur la détection de témoins de l'infection mycobactérienne, autres que l'agent infectieux lui-même. Des témoins de la mise en place d'une réaction immunitaire à médiation cellulaire ou humorale sont ainsi recherchés.

Ces méthodes indirectes ont souvent l'avantage d'être plus rapides, moins coûteuses et plus faciles à réaliser que les tests bactériologiques directs. Par ailleurs, elles permettent, en théorie, de s'affranchir du fait que l'animal soit excréteur ou non de mycobactéries et de la localisation des lésions puisqu'elles reposent sur les témoins systémiques indirects de cette infection.

a) Recherche de témoin de l'immunité cellulaire

i) Test tuberculinique intra-dermique

Le test tuberculinique ou test d'intradermoréaction IDR, est le test de référence en matière de dépistage *ante-mortem* de la tuberculose chez les mammifères. Il consiste à mettre en évidence une réaction d'hypersensibilité de type IV (mettant en jeu les lymphocytes T Mémoires) par injection intra-dermique d'une substance extraite de culture de bacilles tuberculeux appelée tuberculine. Les tuberculines les plus utilisées aujourd'hui chez les animaux de zoo sont la « *Mammalian Old Tuberculin* » MOT et les tuberculines préparées à partir de « *Purified Protéin Derivative* » de *M. tuberculosis* PPDh, *M. bovis* PPDb et *M. avium* PPDa. La fraction protéinique de la tuberculine est reconnue par les lymphocytes T sensibilisés et entraîne la libération de lymphokines à l'origine d'une réaction inflammatoire locale qui est généralement évaluée à 72H chez les Primates non humains. La réaction spécifique est d'apparition progressive (ce qui peut justifier plusieurs temps de lecture) et durable (s'estompe en une huitaine de jours).

Chez les primates non humains la tuberculine est injecté au niveau de la paupière supérieure (illustration). Plus on se rapproche de la commissure, plus le résultat et sa lecture peuvent être faussés (le gras péri- orbitaire peut empêcher la visualisation d'un œdème). Seules pour les ouistitis et les pinshés, les injections sont faites à l'abdomen; la lecture est plus facile car en s'accrochant à la cage, ils présentent leur ventre.

Les primates non humains réagissent faiblement à la tuberculine et nécessite une plus grande concentration en antigènes. Face à cette constatation, l'utilisation de la MOT est recommandée aux Etats-Unis chez les primates non humains (volume injecté de 0,1mL soit 15000 TU₁ et 0,05mL chez les petits espèces, exemple marmosets) car elle semble améliorer la sensibilité du test chez ces animaux (plus allergène, contient un plus grand nombre d'unités tuberculinique que les PPD) (Riquelme 2009).

Illustration 10 : réalisation d'une tuberculation intra-palpébrale chez un macaque (Riquelme 2009).



Tableau 12 : système de notation de la réaction tuberculinique chez les primates non humains, pour une injection au niveau de la paupière supérieure (Bushnitz 2008).

grade	description	conclusion
0	Absence de réaction	Négatif
1	Ecchymose, extravasation de sang sur la paupière liée à l'injection	Négatif
2	Degré variable d'érythème, aucune enflure	Négatif
3	Degré variable d'érythème avec une enflure minimal, légère enflure sans érythème	Suspect
4	Enflure modéré avec la paupière tombante, degré variable d'érythème	Positif
5	Enflure sévère et/ou nécrose de la paupière	Positif

Tableau 13 : système de notation de la réaction tuberculinique chez les primates non humains, pour une injection au niveau de l'abdomen (Bushnitz 2008).

grade	description	conclusion
0	Absence de réaction	Négatif
1	Enflure modérée, induration 3-5 mm	Négatif
2	Enflure modérée, induration 5-10 mm	Suspect
3	Enflure marquée induration < ou = à 10 mm	Positif

Une réaction transitoire est parfois constatée dans l'heure suivant l'injection. Elle n'a aucune valeur diagnostique. Pour les primates non humains, il est conseillé de commencer à contrôler le site d'injection au bout de 24H puis à 48H et 72H. On recherche l'apparition d'une induration ou gonflement (l'érythème ne semble pas spécifique). Si le test est douteux, il est recommandé de réaliser une IDR comparative en réalisant une injection de PPD *avium* en plus de la PPD *bovis* à deux sites distincts (mais localisation identique pour une structure cutanée identique). Si l'injection n'est pas réalisée en même temps pour les deux tuberculines, elle devra l'être dans les 10 jours suivants l'IDR initial et il est important que ce soit à un site opposé au site de l'injection de la première tuberculine. Pour un nouveau test intradermique il doit être pratiqué au moins 30 jours après la dernière IDR.

Inconvénients :

- grande variabilité réactionnelle (faux positifs, faux négatifs) : interactions médicamenteuses, anergies possibles lors de maladies intercurrente, tégument trop épais (Lécu 2008)
- le test doit être réalisé et lu par la même personne
- subjectivité de lecture
- nécessité de capturer plusieurs fois l'animal, voire de l'anesthésier
- la sensibilité de l'IDR dépend de l'espèce de primates considérée (Cousins 2005) et du site d'injection. On note par exemple de nombreux faux-positifs chez les orangs-outans.

ii) Le test interféron gamma

La réponse à médiation cellulaire est la composante majeure de la réponse immunitaire à l'égard de M. tuberculosis; l'induction d'une réponse protectrice se traduit par la synthèse de cytokines de type TH1, notamment d'interférons gamma (IFN γ).

Le test de l'interféron gamma est un test sanguin permettant d'évaluer in vitro, la réactivité des lymphocytes thymodépendants circulants, mis en culture avec des antigènes mycobactériens (ou protéiques purifiés de bacilles tuberculeux), à travers le dosage de l'INF γ . Il est basé sur le principe que des lymphocytes préalablement sensibilisés à ces antigènes, produisent des quantités mesurables d'interféron gamma (la détection d'interféron est corrélée à l'infection). Dans un premier temps, on incube les prélèvements sanguins avec les antigènes tuberculeux, c'est la stimulation lymphocytaire. Puis l'interféron gamma, produit de cette stimulation, est mesuré par méthode ELISA. Le résultat est qualitatif (Lécu 2008). Plusieurs trousse de dosage ELISA ont été développées, puis commercialisées. On compte à ce jour une trousse pour les primates non humains (PRIMAGAM®).

Avantages :

- Test rapide, le résultat peut être obtenu en 24H (durée maximale du protocole expérimental).
- Il se réalise à partir d'une simple prise de sang d'où la nécessité d'une seule capture contrairement à l'IDR et la possibilité de les relâcher juste après.
- Test peu invasif.
- Elimine les aléas liés au manipulateur et au lecteur par rapport au test IDR.
- Test réalisable précocement après l'infection.
- L'évaluation comparée de la réaction aux tuberculines PPD avium et PPD bovis, permet de faire la différence avec une simple exposition à une mycobactérie environnementale et améliore considérablement la spécificité par rapport à une IDR simple (Lécu 2008).
- De nombreuses études sur des populations d'espèces sauvages soulignent une sensibilité supérieure à celle du test tuberculique (Vervenne 2004, Cousins 2005).
- L'utilisation du test de l'INF γ a aussi montré son intérêt chez les individus en anergie terminale ou présentant tuberculose fulminante qui restent négatifs à l'IDR (Vervenne 2004).

Inconvénients :

- Peu de laboratoires le propose aujourd'hui en France et seul le Laboratoire National de Contrôle des Reproducteurs de Maisons-Alfort le réalise pour les primates non humains.
- Ce test a des impératifs biologiques, notamment le délai d'acheminement des prélèvements au laboratoire ne doit pas excéder 10 heures, afin de garder les lymphocytes viables.

- L'existence de réponses positives intermittentes ou transitoires, au cours de l'infection, a été montrée chez des PNHs (Capuano 2003). L'association du test INF γ avec les tests sérologiques (réponse humorale plus tardive) semble intéressante pour améliorer le diagnostic.

- Une étude faite sur des macaques (Vervenne 2004) a montré qu'une immunoconversion était possible dans les premiers stades de l'infection. Un individu avec une réponse en INF γ supérieure pour PPDa par rapport à PPDb, a montré deux semaines plus tard une modification de la réactivité avec réponse à la PPDb supérieure à celle de PPDa (cependant l'intensité de la réponse était alors beaucoup plus importante). Par conséquent, un animal présentant une forte réaction à PPDa doit être retesté, deux semaines ou plus, plus tard.

- Une infection par *M.avium* peut aussi masquer une infection par *M.bovis* (phénomène de mémorisation des lymphocytes T) ce qui diminue la sensibilité du test.

- Son utilisation doit prendre en compte le statut immunitaire du patient. Elle n'est pas conseillée chez les jeunes individus chez lesquels de nombreux faux positifs sont rapportés, ni chez les individus immunodéficients ou présentant un état général altéré (Lécu 2008).

Conclusion :

Le test de l'interféron gamma est un test rapide, facile à utiliser sur le terrain et ne nécessitant qu'une seule capture, ce qui est important pour son application à la faune sauvage. Bien que l'utilisation du test de l'interféron gamma semble offrir de nombreux avantages pour le diagnostic de la tuberculose, des freins à son utilisation persistent à ce jour (peu de laboratoires d'analyses vétérinaires le réalisent, délai d'acheminement des prélèvements...). De plus, le test de l'interféron gamma souffre de lacunes communes avec l>IDR, soit des réponses positives intermittentes pour certains individus infectés et une incapacité à détecter les infectés latents chez certaines espèces. Cependant, plusieurs études ont montré que l'utilisation en parallèle de ces deux tests, IDR et test de l'INF γ , améliore considérablement la valeur du diagnostic.

b) Recherche de témoins de l'immunité humorale

i) ELISA

Ce test est une épreuve immuno-enzymatique, basée sur la détection des anticorps anti-mycobactériens sériques : il mesure donc la réponse immunitaire à médiation humorale de

l'animal. Si ce dernier est infecté (et qu'il a réalisé une séroconversion), l'ajout d'un (ou de plusieurs) antigène(s) spécifique(s) de la mycobactérie dans son sérum entraîne la formation de complexes immuns (complexe « anticorps de l'animal / antigènes ajoutés »). Ces complexes sont alors détectés par l'ajout d'une solution contenant des anticorps spécifiquement dirigés contre ces complexes et liés à une enzyme, permettant la mise en évidence indirecte de la présence d'anticorps antituberculeux dans le sérum de l'animal.

Au vu des résultats préliminaires concernant les performances du test, l'ELISA est très prometteur pour le diagnostic rapide de la tuberculose. C'est un test rapide, facile, nécessitant peu de sang. Cependant, des données supplémentaires sont encore nécessaires à la validation finale de cette technique. L'ELISA reste donc en cours d'investigation et il est pour l'instant recommandé de l'effectuer en complément d'autres tests.

ii) MAPIA (Multi-Antigen Print Immunoassay)

Le test MAPIA et le test PrimaTB StatPak® (encore appelé *Rapid Test* ou RT) sont deux tests sérologiques : l'un (MAPIA) est une procédure de laboratoire et l'autre (PrimaTB StatPak®) est un test de terrain.

La technique MAPIA (Multi-Antigen Print ImmunoAssay) est une technique développée ces dernières années, permettant d'imprimer sur un support (membrane de nitrocellulose) une série d'antigènes et de tester la présence de différents anticorps (utilise la méthode «western blot») en une seule fois. On obtient alors une «carte sérologique» distinguant les antigènes les plus immunostimulants (différents en fonction du bacille et de son hôte). Les résultats sont évalués visuellement et par densitométrie semi quantitative. A ce jour, le test MAPIA est utilisé avec succès sur les plusieurs espèces animales sauvages (éléphants, les primates non humains, cervidés, bovins, tapirs, pinnipèdes). Plusieurs études ont montré que le test MAPIA pouvait être un test précoce pour la dépistage de la tuberculose (anticorps détectés dès 4 semaines suivant l'inoculation) chez les PNH (Lyashchenko 2000). Le principal inconvénient à son utilisation pour le dépistage de routine est, qu'à ce jour, aucun laboratoire français ne propose sa réalisation.

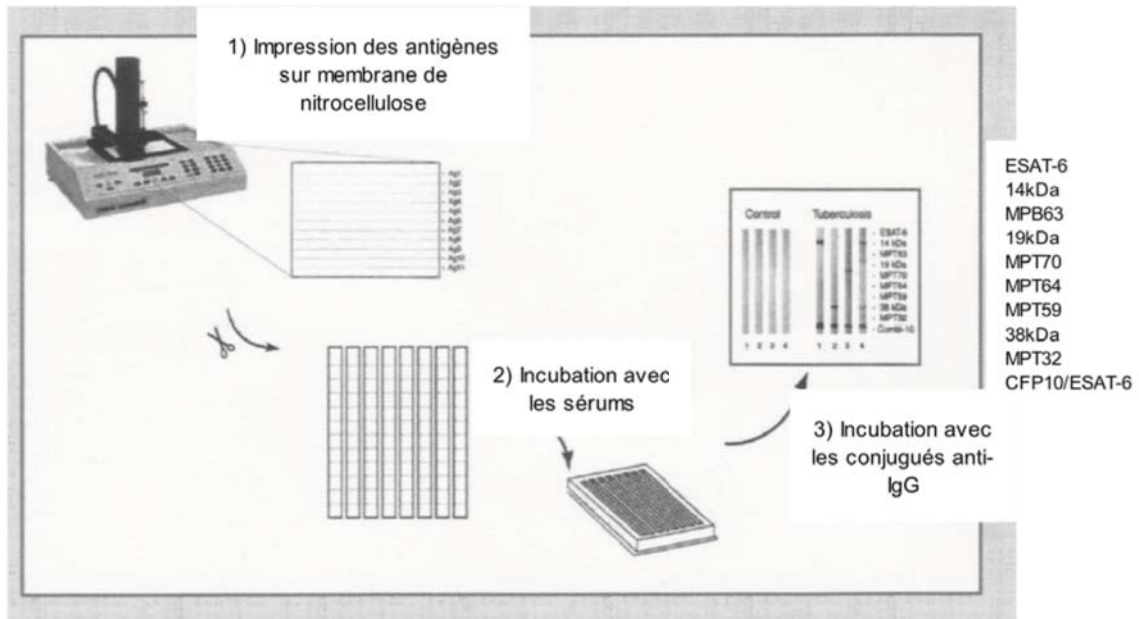


Figure 6 : protocole de réalisation de la technique MAPIA (*Multi-antigen print immunoassay*) (Lyashchenko 2000).

iii) PrimaTB StatPak®

PrimaTB StatPak® est un test sérologique rapide, reposant sur la détection d'anticorps et basé sur l'immuno-chromatographie (*lateral flow technology*). Ce test incorpore un cocktail unique de protéines recombinantes issues de *M. tuberculosis* et/ou de *M. bovis*, également sélectionnées pour leurs capacités à discriminer les individus sains des individus infectés par la tuberculose. Ces antigènes sont imprégnés sur une phase solide (membrane de nitrocellulose), représentée par une bandelette test unique, placée dans une petite cassette en plastique. Le système de révélation des anticorps est simple : des particules de latex bleu sont conjuguées aux protéines détectant les complexes anticorps-antigènes formés. Cette technique de révélation ressemble globalement au principe d'un test de grossesse.

Illustration 11: Test PrimaTB Stat-Pak®



Ce test nécessite 0,03 ml de sang total ou de sérum et la lecture se réalise en 20 min (Chembio diagnostic systems 2010).

Avantages :

- Outil de terrain
- Bonne sensibilité et bonne spécificité
- Bonne reproductibilité
- Précocité du test par rapport à l'infection

Inconvénients :

- Difficultés liées à une production d'anticorps inconstante
- Informations moins complètes que le test MAPIA
- Coût (Lécu 2008)

Tableau 14 : spécificités et sensibilités des tests MAPIA et des Tests rapides.

	Tests	Sensibilité	Spécificité	Références
HOMME	MAPIA	56-72% (sur 75)	98,5-100% (sur 67)	[Lyashchenko <i>et al.</i> (2000)]
Primates non humains	test rapide	81,8-100%	98,7-100%	Données fournisseur
		90,2% (46/51)	98,1% (154/157)	[Cousins et Florisson (2005)]
		90%	99%	[Lyashchenko <i>et al.</i> (2007)]

Le PrimaTB StatPak® et le MAPIA sont deux tests pouvant être utilisés en combinaison, à l'image de ce qui est fait pour le dépistage du HIV:

- un test très sensible pour un dépistage rapide sur le terrain
- puis un test de laboratoire très spécifique pour la confirmation du diagnostic et afin d'obtenir les caractéristiques du profil de séro-réactivité de l'animal.

Au vu des performances de ces deux tests, la précision de cette combinaison est de 100 % (en prenant la culture mycobactériologique comme méthode de référence).

Conclusion sur les méthodes diagnostiques :

Bien que nous disposions à l'heure actuelle d'un large panel d'outils diagnostic pour la tuberculose chez l'homme et la faune domestique, l'application des mêmes méthodes aux animaux sauvages s'avère plus délicate (outils spécifiques d'espèces ou techniquement difficilement transposables). Le dépistage *ante-mortem* de la tuberculose en parc zoologique reste donc encore aujourd'hui difficile à atteindre et seule l'utilisation de plusieurs tests en parallèle semble permettre l'obtention d'un diagnostic satisfaisant. Il est nécessaire de contrôler régulièrement les animaux, voire 2 fois par an en animalerie pour les animaux résidants.

On retiendra que l'intradermotuberculation est actuellement la technique de référence pour le dépistage de nouveaux cas de tuberculose et que son utilisation s'est montré efficace pour réduire l'incidence de la tuberculose chez les primates non humains. Le développement ces dernières années d'outils immunologiques, dont le test de l'interféron gamma et les tests sérologiques, semble offrir de nombreux avantages par rapport aux méthodes conventionnelles, et laisse espérer par leur utilisation une amélioration des programmes de surveillance de la tuberculose jusqu'ici mis en place chez les espèces sauvages.

I- Bases de la réglementation

Les seules tuberculoses animales reconnues comme maladies réputées contagieuses MRC, et notifiables à l'OIE (liste B), sont les tuberculoses à *Mycobacterium bovis* et *Mycobacterium tuberculosis*. Bien que la France soit reconnue État officiellement indemne de tuberculose bovine par l'Union européenne en décembre 2000, elle est encore aujourd'hui, comme la majorité des pays de l'Union Européenne, soumise à déclaration obligatoire, chez toutes les espèces de mammifères domestiques et sauvages depuis 2002, et donne lieu à l'application de mesures sanitaires (Benet 2006).

La seule obligation réglementaire en matière de tuberculose pour espèces sauvages, est la déclaration à la Direction Départementale de Protection des Populations, de toutes IDR positives, lésions suspectes ou tous tableaux cliniques évocateurs de tuberculose (aucune obligation n'est portée sur la fréquence et les méthodes de diagnostic de l'infection). L'envoi de ces lésions dans un laboratoire agréé à des fins d'analyses, est toujours applicable. Bien qu'aucun texte ne définissent, pour les détenteurs d'animaux sauvages, l'obligation d'effectuer des contrôles, les DDSV recommandent néanmoins l'isolement et le contrôle des animaux nouvellement introduits ainsi qu'un contrôle tuberculinique régulier. En matière de prophylaxie, l'application de contrôles réguliers à des espèces sauvages est évidemment plus difficile (contention difficile et dangereuse, stress, blessure...).

Le transport de tout animal au-delà des frontières nationales nécessite la délivrance d'un certificat sanitaire aux mentions spécifiques.

De plus la réglementation française et européenne s'accorde à dire que la manipulation de *Mycobacterium bovis* et *tuberculosis* nécessite un niveau de confinement numéro 3.

Aux USA, la réglementation actuelle recommande d'utiliser des pratiques et des équipements de biosécurité de niveau 2 pour toutes les activités sans production d'aérosols. Le niveau 3 de biosécurité est recommandé pour la production et la manipulation de grande quantité de mycobactéries ou de primates infectés naturellement (U.S. Department of Health and Human Services, 2007).

II- La réglementation actuelle sur l'importation des primates concernant la tuberculose

L'arrêté du 19 avril 2002 (annexe 2) fixant les conditions sanitaires pour l'importation et le transit, sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outre-mer, des animaux vivants et de certains de leurs produits visés à l'article L. 236-1 du code rural, exige qu'un vétérinaire officiel certifie que tous les animaux importés ou transitant sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outre-mer en provenance des pays tiers destinés à des établissements de présentation au public à caractère mobile, visés par ce texte « sont originaires et proviennent d'un établissement dans lequel aucun cas de tuberculose et de rage ou d'autres zoonoses n'a été constaté au cours des deux dernières années » et « ont été soumis, avec résultat négatif, à deux épreuves de dépistage de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis, bovis, africanum*), effectuées au début et à la fin de la quarantaine ou ont été soumis, avec résultat négatif, à deux épreuves annuelles de dépistage de la tuberculose, la dernière épreuve ayant été effectuée dans les quarante jours précédant le chargement. »

Ce même arrêté, exige qu'un vétérinaire officiel certifie que tous les animaux importés ou transitant sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outremer, destinés à des établissements d'expérimentation animale, des établissements d'élevage spécialisés, des établissements fournisseurs (au sens du décret 87-848 modifié du 19 octobre 1987) et des établissements de présentation au public à caractère fixe, en provenance des pays tiers : « ont été soumis, avec résultat négatif, à deux épreuves de dépistage de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis, bovis, africanum*), effectuées au début et à la fin de la quarantaine. Cette disposition ne s'applique pas aux microcèbes (*Microcebus sp.*), chirogales (*Cheirogalus sp.*), allocèbes (*Allocebus sp.*), tarsier spectral (*Tarsius spectrum*) et ouistiti pygmée (*Cebuella pygmea*) destinés à des établissements de présentation au public à caractère fixe. »

III- Laboratoires de référence (Delnatte 2008)

Histopathologie (Spécialistes américains)

Dr. Richard Montali

National Zoo - Department of Pathology (Washington, DC 20008, USA)

Tel : (202) 673-4869 Fax : (202) 673-4660 E-mail : rmontali@nzp.si.edu

Dr. Arthur.J.Davis (Chief of Pathology)

Dr. Mark Hall (Head Pathological Investigations)

USDA APHIS NVSL - Pathobiology Laboratory (Ames, IA 50010, USA)

Tel : (515) 663-7521 Fax : 515-663-7527

E-mail : Arthur.J.Davis@aphis.usda.gov ou Mark.Hall@aphis.usda.gov

Bactériologie

En Europe (culture, spoligotyping, antibiogramme)

Mme María Laura Boschioli-Cara

AFSSA Alfort, Unité Zoonoses Bactériennes,

Laboratoire d'études et de recherches en pathologie animale et zoonoses

23 avenue du Général de Gaulle,

94706 Maisons-Alfort Cedex, France

Tel : 00 33 149 771 300 Fax : 00 33 149 771 344

E-mail: ml.boschioli@afssa.fr

Test interféron gamma

Diana Whipple, Research Leader

Bacterial Diseases of Livestock Research Unit, USDA, ARS

National Animal Disease Center 2300 Dayton Avenue, PO Box 70

Ames, IA 50010, USA

Tel : (515) 663-7325 Fax : (515) 663-7458

E-mail : dwhipple@nadc.ars.usda.gov

Test ELISA

En Europe : ELISA Lelystadt

Department of Bacteriology and TSEs

Central Institute for Animal Disease Control

P.O. box 2004 8203 AA Lelystad, The Netherlands

Tel : 00 31 320 238 800 Fax : 00 31 320 238 668

E-mail : info@cidc-lelystad.nl

Test MAPIA et PrimaTB StatPak®

Chembio Diagnostic Systems, Inc.

3661 Horseblock Road

Medford, NY 11763, USA

Tel : (631) 924-1135 Fax : (631) 924-6033

E-mail : info@chembio.com Web Site : www.chembio.com

Dosages sériques des antituberculeux

Dr. Charles Peloquin

National Jewish Medical and Research Center

1400 Jackson Street

Denver, CO 80206, USA

Tel : (303) 398-1925, 398-1448, 398-1427 Fax : (303) 270-2229

E-mail : Peloquin@NJC.org Web site : www.njc.org

PROPHYLAXIE ET TRAITEMENT

I- Prophylaxie

La réglementation n'impose aucune mesure sanitaire mais on peut recommander certaines règles pour limiter le risque :

- contrôle des animaux nouvellement introduits et mise en place de mesures de quarantaine
- contrôle sanitaire régulier et dépistage par IDR deux fois à 3-6 mois d'intervalle surtout chez les primates non humains en animalerie d'expérimentation puis tous les ans.
- dépistage chez les personnels à risque (personnel hospitalier, personnel animalier, personnel d'abattoir, vétérinaires).
- élimination de tout animal révélé positif par l'IDR et désinfection des locaux.
- respect des mesures d'hygiène en animalerie (protéger les plaies et port de masque et de gants).
- protection du public.

II- Traitement

Le traitement de la tuberculose animale est une opération hasardeuse et dangereuse qui doit être proscrite. Tout animal tuberculeux doit être éliminé dans les plus brefs délais.

DEUXIÈME PARTIE :
MALADIES A DÉCLARATION OBLIGATOIRE

LES ESST

Les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESST) représentent un ensemble de maladies aux mécanismes nouveaux, caractérisées cliniquement par un temps d'incubation très long (de quelques mois à plusieurs années), une atteinte exclusive du système nerveux et une issue toujours fatale.

Ces maladies rencontrées chez l'homme comme chez l'animal sont connues depuis le XVIII^{ème} siècle avec la tremblante du mouton découverte en 1732. Cependant d'autres espèces sont concernées par les encéphalopathies spongiformes.

L'agent infectieux responsable de ces maladies dégénératives du système nerveux central est d'un type nouveau, ainsi nommé Agent Transmissible Non Conventionnel (ATNC) ou prions.

PRÉSENTATION DE L'AGENT

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles (ESST) ou maladies à prion sont définies par une accumulation pathologique, principalement dans le système nerveux central (SNC), mais aussi dans les tissus lymphoréticulés et nerveux périphériques, d'une isoforme hautement conservée anormale (incorrectement repliée), partiellement résistante aux protéases, d'une protéine codée par l'hôte (PrP^C), désignée au début sous le nom de PrP^{Sc} (OIE 2010). Cette accumulation est proportionnelle au titre infectieux dans les modèles animaux d'ESST. De plus, dans les conditions habituelles, la PrP^{Sc} copurifie avec l'agent infectieux et est indissociable de l'agent transmissible. Il n'existe pas de système simple et efficace de croissance in vitro de ces agents : seules les cellules d'origine nerveuse ou des cellules génétiquement manipulées pour exprimer de fortes quantités de PrP^C sont infectables par les ATNC. Dans ces systèmes expérimentaux, la PrP^{Sc} est détectable par les méthodes habituelles (western blot) ; toutefois, ces modèles sont restreints à certaines souches murines ou ovines de prions, et ils ne permettent pas la détection in vitro de la présence d'ATNC dans un produit biologique « tout-venant » (Dormont 2004).

I- Classification

Le prion est un agent transmissible non conventionnel ou ATNC. Il est nommé ainsi parce qu'il ne s'agit ni d'un virus, ni d'une bactérie qui sont des agents pathogènes bien connus. Le prion est un agent pathogène, transmissible, résistant à tous les traitements par lesquels sont détruits les agents infectieux classiques.

Les prions sont constitués uniquement de petites particules infectieuses de nature protéique d'après l'hypothèse de Prusiner. Les données en faveur d'autres hypothèses comme celles d'une origine virale ou bactérienne ou l'implication de facteurs associés tels qu'un déséquilibre minéral restent incertaines.

Il faut noter que le terme « prion » est utilisé, dans le langage courant et dans certains articles, à la fois pour l'agent pathogène et pour la protéine cellulaire normale (on parle de prion cellulaire). Il s'agit d'un abus de langage car rigoureusement le prion est uniquement la protéine infectieuse.

II- Nature, rôle biologique et caractéristiques

Le prion pathogène est une sialoglycoprotéine isoforme d'une protéine cellulaire de l'hôte PrP^c que l'on retrouve chez tous les Mammifères, mais aussi les Nématodes, les Oiseaux, les Poissons et les Levures.

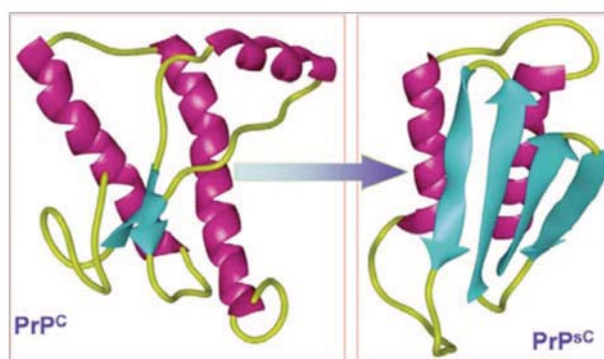


Figure 7 : Modèle de transconformation de la PrPc en PrPsc (Dormont 2004).

Grâce à des expériences d'ultrafiltration, la taille des ATNC a pu être estimée à 15 à 40 nm; toutefois, des données récentes indiquent qu'en présence de détergents, la taille apparente des prions est inférieure à 15 nm. La résistance à la chaleur sèche des ATNC est exceptionnelle : par exemple, 24 heures à une température de 160 °C n'inactivent pas totalement une dose de

107 DL 50 de l'agent de la tremblante expérimentale. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) recommande l'autoclavage à 136 °C pendant 18 minutes pour obtenir une inactivation compatible avec la sécurité microbiologique en thérapeutique humaine et animale. Cette résistance peut cependant varier considérablement avec les souches de prions et les espèces hôtes. Les rayonnements ont peu d'effets sur les ATNC aux doses habituellement efficaces sur les autres micro-organismes: la dose inactivatrice à 37 % est de plus de 100 kGy. Les doses d'irradiation gamma ou bêta de 25 kGy couramment utilisées en stérilisation sont sans effet sur les ATNC. Ce sont d'ailleurs les données de la radiobiologie qui ont permis, dès les années 1970, de suspecter le rôle central des protéines dans les ATNC.

La sensibilité aux agents chimiques est elle aussi très atypique : les traitements d'une heure à température ambiante par l'hypochlorite de sodium à 2 % de degré chlorométrique (le degré chlorométrique de Gay-Lussac correspond au nombre de litres de Cl₂ qu'un litre de solution est capable de dégager en présence d'un acide dans des conditions normales de température et de pression) ou par la soude 1 N sont les seuls, selon l'OMS, permettant une réduction de titre infectieux compatible avec un risque acceptable en santé publique.

III- Pathogénie (Dormont 2004)

La voie d'inoculation est un paramètre majeur de la physiopathologie des ESST : la voie intracérébrale est la plus efficace, et la voie orale la moins efficace. La pathogenèse des maladies à prions dépend de la voie d'introduction du prion dans l'organisme, de la souche de prions et de la génétique de l'hôte. Il convient donc de distinguer les phénomènes physiopathologiques qui permettent à l'infection de s'installer en dehors du système nerveux central lors d'une infection par voie périphérique et qui concourront ultérieurement à la neuro-invasion, et les phénomènes pathogéniques qui sont la conséquence directe de la réplication de l'agent dans le système nerveux central et qui sont induits d'emblée lors d'une infection intracérébrale.

a) Réplication périphérique et entrée dans le système nerveux

Les ESST naturelles ou expérimentales ont une longue période cliniquement asymptomatique. Pendant cette phase muette, la réplication de l'agent peut être détectable dans de nombreux tissus, en fonction de l'espèce, de la voie d'inoculation et de la souche de

prions. En conséquence, lors d'une infection par voie périphérique, le prion est en dehors du système nerveux central pendant la première moitié de la période d'incubation. En résumé, deux voies d'entrée dans le système nerveux central peuvent être proposées lors d'une infection par voie périphérique :

- la première implique une réplication initiale dans les organes lymphoïdes (plaques de Peyer après exposition par voie orale, ganglions lymphatiques, rate) et donc la présence d'une interface neuro-immune pour permettre l'entrée dans le système nerveux périphérique ;

- la seconde consiste en une invasion directe du système nerveux périphérique ; dans ce cas, l'infection du système immunitaire est un cul-de-sac physiologique sans participation aux mécanismes pathogéniques.

Il faut souligner que l'entrée de l'agent par voie hématogène via une perméabilisation de la barrière hématoencéphalique (BHE) a été proposée ; toutefois, même si des altérations de la BHE ont été rapportées dans certains modèles expérimentaux, les essais de perméabilisation effectués chez les animaux inoculés n'ont pas conduit à une réduction de la période d'incubation.

b) Neuropathogénèse des ESST

La physiopathologie des lésions du système nerveux central peut donc répondre au schéma suivant: lors de l'infection, l'agent prion, agent pathogène responsable de l'infection, pénètre le neurone, où pour des raisons et par un mécanisme encore mal compris il se multiplie, en dépliant/repliant les protéines Prp^c en protéines PrP^{sc}. La PrP^{sc} échappe au catabolisme cellulaire par les protéases, et son accumulation est toxique pour la cellule dans laquelle elle a lieu : le neurone meurt en libérant de la PrP^{sc} dans le microenvironnement cellulaire. Une fois libérée dans le microenvironnement cellulaire, la PrP^{sc} peut induire l'apoptose de neurones sains environnants, participant ainsi à la dépopulation neuronale en dehors de toute infection directe. Par ailleurs, la PrP^{sc} libérée dans les espaces extracellulaires peut activer les astrocytes et les cellules microgliales, induisant ainsi la gliose, dont on sait qu'elle peut, indirectement par le biais du relargage de médiateurs chimiques comme les cytokines proinflammatoires ou les espèces radicalaires oxygénées, participer à la majoration des dommages neuronaux : une expression des cytokines de l'inflammation et des marqueurs d'activation microgliale a été démontrée dans le système nerveux central des animaux infectés par l'agent de la tremblante expérimentale.

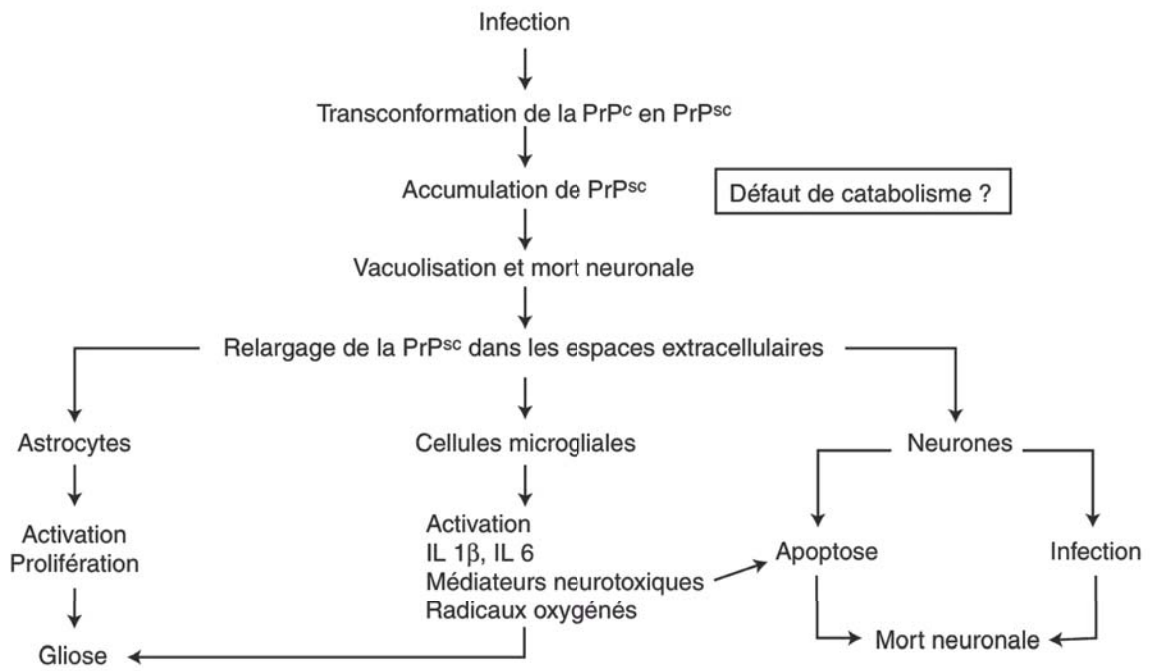


Figure 8 : Neuropathogénèse au cours des maladies à prions (Dormont 2004).

DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES

I- Répartition géographique

Les études épidémiologiques concernât les ESST ne sont pas faciles. Les individus concernés ne sont pas nombreux et leur recensement n'est pas facile. De plus les ESST sont certainement sous-estimées n'entrant pas toujours dans le diagnostic différentiel.

En Europe, plusieurs pays ont été touchés : en priorité la Grande Bretagne et la République d'Irlande mais aussi la France et l'Italie. On trouve également des cas aux Etats-Unis et au Canada.

II- Espèces sensibles

Les espèces susceptibles, expérimentalement ou naturellement sont : les bovins, les ovins, les primates non humains, les souris, les chats, les guépards, certains ruminants sauvages en captivité (koudou par ex), l'Homme. On va s'intéresser plus particulièrement aux primates.

a) Cas en milieu naturel

Il s'agit d'un cas d'encéphalopathie sur un primate non humain : un singe rhésus (*Macaca mulatta*). Le singe âgé de neuf ans se trouvait en France depuis cinq ans et était originaire d'Angleterre. Les symptômes ont débuté l'été 1991 et l'animal est euthanasié en juin 1992. L'examen microscopique de l'encéphale montre les lésions typiques des EST. C'est le premier cas d'EST spontanée chez un primate. Cependant chez les primates non humains la maladie semble rare. Ce cas reste une exception (Bons 1996).

b) Cas en milieu expérimental

L'étude de la transmission et de la pathogénie des encéphalopathies spongiformes humaines nécessite l'utilisation des singes, modèles proches de l'homme, comme cobayes.

Le tableau suivant montre un éventail de transmissions expérimentales réussies sur des Primates.

Tableau 15 : Résultats des essais de transmissions expérimentales d'EST à des primates (Jarlaud 2002).

Espèces	MCJ		KURU		ETV		ESB	
	DI	Signes cliniques et/ou constats histologiques	DI	Signes cliniques et/ou constats histologiques	DI	Signes cliniques et/ou constats histologiques	DI	Signes cliniques et/ou constats histologiques
Chimpanzés	10 à 14	Signes cliniques confirmés par histologie	18 à 21	Apathie, lassitude, hyperesthésie, problèmes locomoteurs.				
Singe-écureuil					11	Signes cliniques confirmés par histologie : somnolence, apathie, tremblements musculaires, problèmes locomoteurs.		
Ouistiti	43	Signes cliniques confirmés par histologie.	31 à 38	Signes cliniques confirmés par histologie.			48	Timidité excessive, somnolence, ataxie, salivation.
Macaque rhésus	65 à 66	Signes cliniques confirmés par histologie (spongieuse et mort neuronale mais absence de plaques amyloïdes).	10	Signes cliniques confirmés par histologie	33	Lésions histologiques caractéristiques des EST. Absence de signe clinique.	38	Comportement anormal, énervement. Lésions histologiques identiques à celles retrouvées sur encéphales de patients décédés de nvMCJ.
Gibbon			9	Lésions histologiques des EST : vacuolisation, mort neuronale. Absence de signe clinique.				
Mangabey	2	Lésions histologiques en l'absence de signes cliniques .	2	Lésions histologiques des EST : vacuolisation, mort neuronale. Absence de signe clinique.				

DI = Durée d'incubation

La transmission de la maladie de Kuru est réalisée sur trois chimpanzés pour la première fois en 1966 (Gadjusek 1966). Elle est également possible chez le singe-araignée (Gadjusek 1968). Des études menées en 1973 montrent que des lésions histologiques d'encéphalopathie spongiforme sont observées en l'absence de signe clinique de la maladie de Kuru sur un gibbon et un mangabey mort de maladie intercurrente respectivement 9 et 2 mois après inoculation.

Les chimpanzés sont également sensibles à la maladie de Creutzfeld-Jacob (MCJ). Des essais de transmission sont réussis dès 1968 (Gibbs 1968). D'autres singes du Nouveau et de l'Ancien monde sont sensibles à la MCJ après des temps d'incubation très longs.

La transmission de l'Encéphalopathie transmissible du vison (ETV) a été tentée avec réussite sur des macaques, des singes-rhésus et des singes-écureuils. Le passage en retour au vison s'effectue sans difficulté (Eckroade 1970).

Ainsi, trois femelles singe-écureuil âgées de trois à quatre ans sont inoculées avec une souche de prion de l'ETV passée au préalable sur des singes rhésus. Les trois singes ont développé une EST après 11 mois d'incubation.

Chez le singe rhésus, des lésions histologiques sont retrouvées 33 mois après inoculation mais sans signe clinique. Des suspensions du cerveau de ce singe rhésus se sont révélées infectieuses en retour chez le vison. Le macaque cynomolgus, inoculé intracérébralement avec cette même suspension développe une EST au bout de 16 mois. Un second passage sur les singes rhésus montre une EST après 19 mois d'incubation.

L'encéphalopathie spongiforme bovine est également transmise aux primates. Après l'apparition des premiers cas de la nouvelle forme de la Maladie de Kreutzfeld-Jacob (MCJ) et la suspicion de la contamination humaine à partir de bovins atteints d'ESB, des expériences ont été effectuées sur des macaques. Deux adultes et un jeune ont reçu par voie intracérébrale du prion bovin. 150 semaines après l'inoculation, les deux adultes montrent un comportement anormal et de l'énervement. Le jeune macaque présente lui aussi les mêmes signes mais seulement 128 semaines.

L'observation microscopique de coupes de cerveau montre les mêmes lésions que sur les patients décédés de la nouvelle variante de la MJC. (Gibbs 1973) La recherche de protéine prion par immunoblotting est positive.

L'ESB est aussi transmise au ouistiti par voie cérébrale et intrapéritonéale conjointement avec une période d'incubation de 48 mois, ce qui est plus long que le temps d'incubation lors de l'inoculation de la tremblante (Baker 1993).

11 microcèbes (*Microcebus murinus*) ont également été inoculés par l'ESB par voie cérébrale ou orale. 3 mois plus tard, on peut noter un changement de comportement et des signes neurologiques 1 mois plus tard. L'examen immunohistochimique des animaux sacrifiés durant la période d'incubation révèle une accumulation anormale de PrP et confirme le diagnostic. Les microcèbes sont donc sensibles, avec des périodes d'incubations relativement courtes et pourrait être un modèle intéressant pour l'étude de la transmission chez les primates (Bons 2002).

Il faut également noter que la tremblante du mouton est transmise aux primates (mais pas au chimpanzé) depuis longtemps. La période d'incubation est de 38 mois minimum chez les ouistitis.

Depuis 1985, le spectre des espèces reconnues sensibles est étendu. Il s'étend des espèces du Nouveau Monde comme le ouistiti, aux espèces de l'Ancien Monde dont font partie les macaques (famille des cercopithécidés) et les grands singes : orang-outan, chimpanzé, gorille. Les espèces du Nouveau Monde semblent être plus sensibles dès le premier passage à la transmission des EST humaines que les espèces de l'Ancien Monde. Il est probable que si l'on étend le champ des inoculations expérimentales, on augmentera d'autant le nombre d'espèces de primates sensibles.

III- Transmission

a) Sources de contamination

Pour les cas observés « dans la nature », la source de contamination est soit inconnue, soit de la nourriture contaminée. Cependant l'infection naturelle chez les primates reste exceptionnelle.

b) Modes de transmission

Dans les conditions naturelles la voie de pénétration du prion est orale. Expérimentalement, beaucoup d'autres voies sont testées : intracérébrale, intrapéritonéale, intraveineuse, sous-cutanée. En ce qui concerne l'efficacité de la transmission on peut classer les voies de pénétration ainsi :

Intracérébrale > Intraveineuse > Intrapéritonéale > Sous-cutanée > Per os

Par exemple la voie orale est 125000 fois moins efficace que la voie intracérébrale mais les lésions observées sont identiques quelle que soit la voie d'inoculation. Seuls les temps d'incubation et le pourcentage de contamination peuvent changer (Dormont 2004).

L'efficacité de la transmission dépend de la voie d'inoculation, du titre infectieux de l'inoculum et de la fréquence de l'exposition. La voie aérienne n'est pas décrite comme contaminante.

EXPRESSION CLINIQUE

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles sont des maladies avec une longue période d'incubation, en moyenne de quelques mois mais pouvant s'étendre sur plusieurs années, d'évolution apyrétique avec des symptômes évoluant sur une période de quelques semaines à plusieurs mois, d'issue toujours fatale. Les symptômes se classent en trois catégories :

- troubles de la locomotion
- troubles de la sensibilité
- troubles du comportement.

Les symptômes sont très semblables suivant les espèces. On retrouve souvent un changement comportemental au début avec une augmentation de l'agressivité sans raison évidente. Les troubles de la sensibilité sont dominés par l'hyperesthésie. Puis il y a apparition d'une ataxie symétrique débutant plutôt par les membres postérieurs. Les symptômes évoluent sur un mode subaigu vers une aggravation progressive. On observe très souvent des convulsions ou des tremblements, un abattement de plus en plus grand, de l'anorexie puis la mort survient au bout de quelques semaines. L'animal finit dans un état de faiblesse généralisée, ne se nourrissant plus.

Il n'y a pas d'autres signes observés. Notamment les analyses hématologiques et biochimiques sont toujours normales. Ainsi le diagnostic est réalisé à partir de l'observation des lésions caractéristiques de l'encéphale (Jarlaud 2002).

Chez les primates plus particulièrement, on observe un changement de comportement : l'animal est léthargique et dépressif et s'isole de ses compagnons. L'animal devient somnolent mais montre aussi des moments intermittents d'alerte. Le primate montre aussi de l'agressivité et de l'énervement. Puis il y a apparition d'ataxie, de tremblements musculaires et d'hypermétrie. On retrouve deux types de tremblements : des tremblements intermittents et brefs, touchant un seul ou les deux membres postérieurs ou des tremblements occasionnels lents et rythmés d'un côté à l'autre. Il est rapporté aussi des cas de pertes de conscience provisoires. On note aussi des signes inconstants tels qu'un priapisme intermittent et un appétit vorace. Les signes cliniques s'aggravent en quelques semaines.

Lésions anatomiques :

Seul le système nerveux est touché. Il n'y a pas de lésions sur les autres organes. Ceci explique la prédominance des troubles nerveux en ce qui concerne la clinique.

Il n'y a pas de lésions macroscopiques. Les lésions d'ESST sont donc observées au microscope. Il faut donc réaliser un examen histologique après fixation au formol du prélèvement au niveau de l'encéphale.

Ces lésions sont caractéristiques des encéphalopathies spongiformes. Toujours présentes, elles permettent un diagnostic de certitude. De plus elles sont identiques chez toutes les espèces concernées ici. Il y a aussi une grande ressemblance quant à la localisation de ces lésions au sein du système nerveux central.

Les lésions sont symétriques et bilatérales. On observe :

- * une vacuolisation du cytoplasme des neurones

- * une perte neuronale

- * une réaction astrocytaire marquée : lors d'une lésion physique ou métabolique, et lors de mort neuronale, les astrocytes deviennent réactifs et se multiplient. On observe aussi une accumulation de filaments intermédiaires dans les prolongements astrocytaires. Les astrocytes sont donc un constituant essentiel des lésions cicatricielles du système nerveux central. On parle alors d'astrocytose ou d'astrogliose, caractéristique des maladies dégénératives neuronales.

- * des dépôts de substances amyloïdes fixant le Rouge Congo.

Cet ensemble est caractéristique des ESST.

Chez les primates, l'astrocytose ou astrogliose est intense dans :

- le thalamus
- le corps strié
- les couches moléculaire et granulaire du cortex cérébral et du cervelet
- le gyrus parahippocampal
- le gyrus du cingulum.

MÉTHODES DIAGNOSTIQUES

Tout diagnostic repose d'abord sur la clinique et les symptômes observés. Cependant le diagnostic de certitudes des ESST nécessite un examen histologique post-mortem. C'est une méthode qui s'est révélée très fiable mais assez lourde. C'est pourquoi d'autres techniques de diagnostic ont été recherchées en complément. Il s'agit, entre autres, de la mise en évidence des protéines fibrillaires spécifiques des ESST, de l'inoculation aux rongeurs de laboratoire, de la recherche de la protéine prion par immunoblotting ou immunohistochimie (IHC).

I- Identification de l'agent pathogène (OIE 2010 et Jarlaud 2002)

a) Diagnostic histologique

L'histopathologie n'est plus la méthode de diagnostic de choix pour la détection des animaux suspects ou pour le dépistage au sein de populations saines. Cependant, la connaissance des changements histopathologiques est importante pour faciliter la détection des cas quand on conduit des diagnostics de routine à base d'examen histologiques de cerveaux de bovins sains. Pour le diagnostic différentiel, des coupes au niveau médulla-obex d'une épaisseur de 5 μm sont colorées à l'hématoxyline-éosine. Si les tissus sont de bonne qualité, l'examen histopathologique de coupes colorées à l'hématoxyline-éosine permet également une confirmation des lésions neuropathologiques caractéristiques. Les changements histopathologiques comprennent essentiellement de nombreux changements spongiformes et une vacuolisation neuronale. On recherche alors les lésions caractéristiques des ESST : lésions symétriques bilatérales, spongiformes dans la substance grise.

Le diagnostic peut être confirmé si des changements morphologiques typiques sont présents dans la moelle au niveau de l'obex, mais sans tenir compte du diagnostic histopathologique, l'immunohistochimie est maintenant aussi employée en routine ; une observation non publiée suggère qu'au moins 5 % des cas cliniques suspects (négatifs sur des coupes colorées à l'hématoxyline-éosine pour recherche de changements vacuolaires dans l'obex) peuvent être détectés par examen en IHC. Il est évident que cette méthode limitée à l'examen de la moelle-obex ne permet ni un diagnostic différentiel ni une caractérisation

phénotypique d'une quelconque ESST. C'est pourquoi il est recommandé de retirer le cerveau en entier de tous les cas cliniques suspects.

Cette méthode est fiable à condition que les prélèvements soient correctement réalisés, mais la lourdeur du dispositif et l'incertitude qui demeure pour certains prélèvements, ont conduit à la recherche d'autres techniques de laboratoire.

b) Méthodes immunohistochimiques

La technique d'immunohistochimie (IHC) pour rechercher la PrP^{Sc} est appliquée sur des coupes obtenues à partir du même matériel (moelle au niveau de l'obex) fixé au formol et inclus dans de la paraffine que celui utilisé pour le diagnostic histopathologique.

La technique ne requiert pas nécessairement une longue fixation du tissu, bien que pour précision, les directives établies pour l'histopathologie sont toujours valables et le tissu fourni peut être adéquatement traité histologiquement, cela fonctionne bien sur des tissus autolysés dans lesquels l'évaluation morphologique n'est plus possible. Cependant, il reste nécessaire de pouvoir reconnaître l'anatomie de l'échantillon afin de savoir si oui ou non les zones cibles sont représentées. Cela est indispensable lors d'un diagnostic négatif et peut aussi se révéler important lors d'une interprétation d'un marquage immunologique douteux. La détection IHC des accumulations de PrP^{Sc} est d'une sensibilité proche de celle de la méthode de Western blot pour la détection de la PrP^{Sc}. Associée à de bonnes préparations histologiques, l'IHC permet la détection des accumulations de PrP^{Sc} et, comme les lésions vacuolaires, déploie une apparence et un motif de distribution typique, elle fournit une évaluation simultanée ou une confirmation du phénotype de la maladie. Les méthodes actuelles sont disponibles auprès des Laboratoires de référence de l'OIE.

Contrairement à ce qui se passe dans le diagnostic de la tremblante du mouton, la détection limitée de la PrP^{Sc} dans les tissus lymphoïdes lors d'ESB ne présente pas d'avenir quant à l'utilisation de ces tissus pour le diagnostic préclinique après biopsies.

Cet examen présente une bonne sensibilité et une bonne spécificité.

c) Méthodes de Western blot

Les techniques d'immuno-empreintes sont réalisées sur des tissus frais non fixés et peuvent être utilisées avec succès quand les tissus sont autolysés. Elle a une sensibilité diagnostique semblable à celle des techniques de l'IHC ; elle reste la méthode de choix avec

l'immunohistochimie pour la confirmation ou l'infirmité d'une suspicion d'ESST. Au cours de la dernière décennie, d'autres méthodes ont été développées qui prennent moins de temps et sont moins coûteuses. La plupart de ces techniques sont basées sur une précipitation de la PrP^{Sc} à l'aide de l'acide phosphotungstique ou d'autres produits chimiques, et certaines sont disponibles dans le commerce.

Bien que la méthodologie Western blot soit actuellement très largement employée, sa sensibilité analytique quand elle est utilisée pour détecter la PrP^{Sc} varie de façon non négligeable selon les techniques et les laboratoires. Quand des techniques développées au laboratoire sont préférées aux techniques publiées, il importe qu'elles soient évaluées quant à leur adaptation pour l'objectif et validées en relation avec un Laboratoire de référence de l'OIE.

d) Méthodes rapides

Des techniques de Western blot automatisé et immuno-enzymatiques (ELISA) ont été développées qui permettent le criblage d'un très grand nombre d'échantillons de cerveaux et sont maintenant disponibles commercialement. De telles techniques peuvent être réalisées en quelques heures.

Les sensibilités relatives des tests rapides, de l'immunohistochimie et des autres méthodes de confirmation doivent encore être déterminées. Ces données sont particulièrement importantes pour l'évaluation des tests rapides quand ils sont utilisés sur des animaux ne présentant pas de signes cliniques d'ESST. En 2006, l'OIE a constaté qu'au cours de leur utilisation dans les programmes de dépistage rapide, ces tests rapides commercialisés se sont révélés très efficaces et fiables à la condition qu'ils soient réalisés par des personnels correctement entraînés. En effet, ils peuvent à l'occasion être moins performants que les épreuves de référence pour la comparaison si ceux-ci sont réalisés par du personnel dont la formation et l'expérience sont insuffisantes. Dans de telles circonstances et même si ce n'est pas l'idéal, il est maintenant accepté que les tests rapides soient utilisées en association avec d'autres méthodes aussi bien pour le dépistage actif que pour le dépistage passif et, par conséquent, pour la confirmation. Il est néanmoins indispensable de s'assurer que le choix des tests primaires et secondaires sont bien compatibles, et ne présentent pas de risque de donner des résultats faussement positifs.

e) Autres épreuves de diagnostic

i) Recherche des protéines fibrillaires en microscopie électronique

Elles sont aussi nommées SAF pour « Scrapie-associated fibrils » parce que c'est sur le mouton atteint de Tremblante qu'elles ont été observées pour la première fois en 1981. Ce sont des protéines filaments de 100 à 200 nanomètres de long sur 10 à 15 de large. Elles correspondent à l'accumulation de la protéine prion pathogène dans l'espace intercellulaire. La recherche se fait sur du matériel frais non fixé ou bien congelé. Cette méthode est donc plus difficile à mettre en place, mais peut être très utile par exemple si le cerveau est lésé. Par contre elle est assez rapide et ne demande que 48 heures pour être réalisée.

ii) Diagnostic par inoculation à des animaux de laboratoire

L'infection peut être mise en évidence en inoculant (par voie intracérébrale ou intrapéritonéale) ou en nourrissant des souris avec des tissus cérébraux mais le bio-essai est peu réaliste en diagnostic de routine à cause de la longue période d'incubation.

Ainsi donc le besoin demeure d'une épreuve pour les ESST qui puisse être appliquée sur l'animal vivant et qui ait une sensibilité capable de détecter la PrP^{Sc} à de faibles taux, tel que cela peut apparaître au cours de la période d'incubation de la maladie.

II- Épreuves sérologiques

Les prions ne peuvent pas être cultivés *in vitro* et n'induisent pas une réponse immunitaire significative chez l'hôte.

RÉGLEMENTATION SANITAIRE

Depuis 1996, les ESST sont des **maladies à déclaration obligatoire (MDO)** pour tous les mammifères autres que bovins, ovins et caprins. Les primates sont donc concernés par cette réglementation. Aucune mesure sanitaire n'est décrite pour la faune sauvage.

En France, il s'agit d'un agent de niveau de danger 3 : le groupe 3 comprend les agents biologiques pouvant provoquer une maladie grave chez l'homme et constituer un danger sérieux pour les travailleurs ; leur propagation dans la collectivité est possible, mais il existe généralement une prophylaxie ou un traitement efficaces. Art R231-61-1 du Code du Travail. La réglementation européenne le classe également en niveau 3.

Laboratoire : Le laboratoire de Lyon est le laboratoire national de référence pour les ESST animales

Lyon

Laboratoire d'études et de recherches en pathologie bovine et hygiène des viandes

31, avenue Tony Garnier
69394 LYON Cedex 07
Tél. : 04 78 72 65 43

Types d'analyses :

- EST: mise en œuvre des techniques de référence pour les confirmations des diagnostics de première intention réalisés de manière décentralisée pour les différents canaux de surveillance de l'ESB et de la tremblante (réseau clinique, tests en équarrissage et en abattoir) et pour le typage moléculaire des prions impliqués dans ces maladies (discrimination entre ESB, tremblante classique et atypique).

Cependant, un bon nombre des ces tests n'ont pas été évalués sur les primates, les essais très largement portés sur les bovins et ovins.

Aux USA, la réglementation actuelle recommande d'utiliser des pratiques et des équipements de biosécurité de niveau 2.

PROPHYLAXIE ET TRAITEMENT

I- Prophylaxie

Chez l'animal :

- Repose sur l'arrêt d'incorporation de produits dérivés de ruminants (farines par ex) dans l'alimentation destinée aux animaux.
- Aucun vaccin n'est disponible.

Chez l'homme :

- Interdire la consommation de produits alimentaires à risques d'origine bovine et caprine (matériels à risque spécifié : système nerveux central, organes lymphoïdes, intestins).
- Dépister à l'abattoir les animaux infectés grâce aux tests de dépistage systématiques.
- Eviction des produits à risque dans la fabrication des cosmétiques et des médicaments.
- Respecter les bonnes pratiques de laboratoire niveau de protection 2 ou de niveau 3 dans le cas de manipulations faites sur des tissus biologiques potentiellement contaminés par des souches humaines ou animales.
- Suivre scrupuleusement les procédures nouvelles de désinfection exposées dans les deux circulaires de la DGS : DGS/DH N 100 du 11 Décembre 1995 et N 138 du 14 Mars 2001 qui rappellent la classification OMS de l'infectiosité des tissus et présentent de façon détaillée les mesures de protection à suivre en milieu hospitalier et dans les laboratoires.

II- Traitement

Il n'y a aucun traitement palliatif ou curatif des ESST.

LA VARIOLE DU SINGE

La **variole du singe** (monkeypox ou orthopoxvirose simienne) est une affection accidentellement transmissible à l'homme due à un virus proche de celui qui est responsable de la variole. Il s'agit d'une maladie à déclaration obligatoire chez les primates non humains.

PRÉSENTATION DE L'AGENT

I- Classification

Le virus de la variole du singe appartient à la famille des *Poxvirus*, genre *Orthopoxvirus* tout comme les beaucoup plus redoutables *Variola major* et *Variola minor*, virus varioliques pathogènes pour l'homme. Font également partie de cette famille les virus de la variole du chameau, de la vache et de la souris ainsi que le virus de la vaccine qui sont peu pathogènes pour l'homme (Acha 2005).

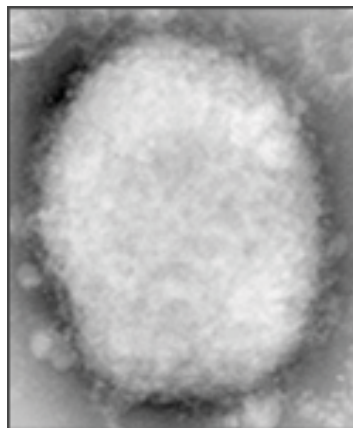


Illustration 12 : Virus de la variole du singe vu au microscope électronique (D'après CDC 2010, en ligne)

II- Principales caractéristiques

Les *poxvirus* sont les plus grands virus connus. Mesurant 230 x 350 nm, ils sont à la limite du pouvoir de résolution d'un microscope optique. Ils sont constitués d'une enveloppe membraneuse protéinique et d'une capsule. L'information génétique est stockée dans un double brin d'ADN. Les poxvirus sont les seuls virus ADN à se reproduire dans le cytoplasme de la cellule-hôte. Lorsqu'ils la quittent, ils provoquent la lyse (éclatement par rupture de la membrane) de la cellule infectée qui finit par dépérir complètement. Les *poxvirus* sont tous génétiquement très proches. Il n'est pas possible de les différencier morphologiquement au microscope électronique. Il existe une étroite relation antigénique entre le virus de la variole du singe et ceux de la variole et de la vaccine ; ces virus produisent des réactions croisées dans les épreuves de séroneutralisation et d'inhibition de l'hémagglutination. Chacun d'eux à des antigènes spécifiques du type, qui peuvent être détectés par plusieurs techniques (Acha 2005).

La culture du virus de la variole du singe est possible *in vitro* et *in vivo*. Les Poxvirus échappent aux conditions habituelles d'inactivation des virus enveloppés : ils sont en particulier résistants aux solvants de lipides.

Le virus de la variole reste virulent dans la croûte (Lodde 1998).

III- Pathogénie

On note une multiplication du virus au site initial d'infection, puis une dissémination par voie sanguine, provoquant une première phase de virémie, mais également par voie lymphatique conduisant ainsi à une deuxième phase de virémie par la suite. On a ainsi une atteinte de la peau et des autres organes. La période d'incubation est de 7 à 10 jours (Brack 1987).

DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES

I- Répartition géographique

Le virus n'est présent dans la nature qu'en Afrique occidentale et centrale, à proximité des forêts tropicales.

L'orthopoxvirus simien a été reconnu pour la première fois en 1958 comme agent pathogène du singe cynomolgus. En 1970, le virus a été isolé en République Démocratique du Congo (RDC) à partir d'un cas humain pédiatrique. Depuis lors, le monkeypox a été rapporté dans cinq pays d'Afrique centrale : Nigeria, Cameroun, Gabon, République Centrafricaine et la RDC qui, à elle seule, compte 95 % des cas. Il a été aussi rapporté dans trois pays d'Afrique de l'Ouest : Côte-d'Ivoire, Sierra Leone et Liberia. En Afrique, le monkeypox touche surtout des enfants ou adolescents âgés de moins de 16 ans.

Une épidémie de monkeypox a été rapportée aux États-Unis en 2003. La maladie était transmise par des chiens de prairie contaminés par des rats de Gambie porteurs du monkeypox virus et importés du Ghana. Au Congo Brazzaville, une enquête de séroprévalence du monkeypox avait été réalisée en 1981 dans le Pool et la Sangha, deux départements limitrophes de la RDC et du Cameroun. Les résultats de cette enquête suggéraient une probable circulation de ce virus dans ces forêts humides. Les enfants de 5 à 9 ans étaient les plus exposés (Acha 2005 et Boumandouki 2007).

II- Espèces sensibles

Depuis l'identification du virus en 1958, une dizaine de foyers seulement ont été signalés chez des singes vivant en captivité dans des centres de recherche ou des zoos en Europe et aux États-Unis d'Amérique. Il est à noter qu'il n'y a pas eu de cas parmi le personnel en contact avec ces animaux. Lors d'une étude sérologique portant sur 2242 sérums de singes d'Afrique et d'Asie, on n'a trouvé aucun réagissant ayant des titres significatifs. On déduit de cette étude que l'infection n'est pas très répandue dans le milieu naturel et qu'elle est probablement limitée à des zones peu étendues. Des analyses de sang effectuées en Afrique chez des animaux ont montré qu'outre les singes, d'autres animaux encore, tels les rats, les souris et les lièvres, des fourmiliers géants, des oiseaux pouvaient être infectés par le

virus de la variole du singe. Il semblerait que certaines espèces africaines d'écureuils (*Funisciurus et Heliosciurus*) et de rats constituent les principaux réservoirs du virus. On suppose qu'un pourcentage élevé d'espèces d'écureuils sont infectées. Ces résultats semblent bien montrer que ces animaux transmettent le virus dans les zones situées autour des villages (Acha 2005).

Chez les primates non humains, différentes espèces sont concernées :

- Sajous (*Cebus sp.*)
- Singes hurleurs (*Alouatta paliatta*)
- Macaques (*Macaca sp.*)
- Gibbons (*Hylobates sp.*)
- Orang-outan (*Pongo pygmaeus*)
- Chimpanzés (*Pan troglodytes*)
- Cercopithèque dont le singe vert (*Cercopithecus aethiops*)

III- Transmission

a) Sources de contamination

Les hommes ou les animaux contaminés représentent la source principale de contamination.

b) Modes de transmission

Les voies d'infection sont généralement le sang, les sécrétions corporelles ou les lésions cutanées (blessures). On peut également être infecté suite à une morsure ou à la consommation de viande d'un animal contaminé. Enfin, la maladie peut être transmise d'homme à homme, par aérosols, par contact facial étroit ou par le biais d'objets contaminés, tels que du linge de lit ou des vêtements. Le risque d'infection persiste pendant toute la durée de la maladie, jusqu'à ce que les croûtes tombent et jusqu'à la guérison complète des lésions. En raison de la multiplication des virus dans l'espace bucco-pharyngé, la première phase fébrile peut être accompagnée d'une excrétion accrue de virus par aérosols (en toussant ou en parlant) et dans une phase ultérieure, via le liquide vésiculaire et les croûtes. La transmissibilité d'homme à homme a apparemment augmenté au cours des dernières décennies, ce qui pourrait être en relation avec un affaiblissement de la protection vaccinale.

EXPRESSION CLINIQUE

L'infection peut rester latente. L'incubation est de 7 à 10 jours puis la maladie provoque une hyperthermie et des troubles du comportement.

On observe des papules nombreuses de 1 à 4 mm de diamètre.

Les lésions sont surtout situées au niveau de la paume des mains et à la plante des pieds mais on en trouve aussi sur tout le torse et la queue.

On décrit également un œdème facial puis des papules, pustules et croûtes sur la face et les fesses.

Les papules contiennent un liquide très épais ressemblant à du pus.

Les lésions sont souvent ombiliquées et se couvrent de croûtes qui tombent au bout de 7 à 10 jours en laissant une petite cicatrice. On note des adénites.

Dans la bouche on trouve parfois des ulcérations circulaires (Acha 2005).

D'autres symptômes sont parfois associés :

- de la fièvre
- du jetage (rhinite)
- de la toux
- une dépression
- une dyspnée
- une lymphadénopathie
- une mortalité variable (surtout lors de surinfection secondaire)

Sur 11 orangs-outans atteints au zoo de Londres, 4 ont survécu (Lodde 1998).

MÉTHODES DIAGNOSTIQUES

Le virus peut être isolé à partir des lésions et des croûtes cutanées. La souche isolée doit être adressée à un laboratoire de référence pour une identification correcte. La confirmation d'une élévation du titre d'anticorps dans les sérums prélevés en phase aiguë et en phase de convalescence peut aider au diagnostic, mais l'existence d'anticorps spécifiques contre le virus de la variole du singe doit être confirmée par des épreuves spéciales.

I- Identification de l'agent pathogène (OIE 2010 et Brack 1987)

a) Microscopie électronique en transmission

La MET est une méthode rapide de détection du virus de la variole singes partir des croûtes ou des prélèvements de tissus. Toutefois, elle requiert une assez forte concentration de virus pour permettre un diagnostic et le virus de la variole des singe ne peut pas être distingué des autres virus orthopox par cette technique.

b) Isolement du virus en cultures cellulaires

Le virus de la variole des singes peut se multiplier dans de nombreux systèmes cellulaires, y compris les cellules de lignée suivantes : Vero, MA-104, rein de singe et rein de hamster nouveau-né (BHK), ainsi que dans les cellules de première explantation de testicules ou de reins d'agneau, de rein fœtal de chameau, de rein de veau et de fibroblastes de poulet. En cas de présence du virus, les plages caractéristiques d'un effet cytopathogène (ECP) peuvent apparaître dès 24 heures après l'inoculation, accompagnées de la formation d'amas de cellules rondes, de cellules géantes et de syncytia et de corps d'inclusion cytoplasmique (Brack 1987). La présence du virus de la variole des singes dans la culture cellulaire peut être confirmée par MET, PCR ou ELISA de capture.

c) Isolement du virus sur membrane chorio-allantoïdienne (MCA) d'œuf de poule embryonné et sur peau de lapin

Les lésions sur la membrane chorio-allantoïdienne (MCA) d'œuf de poule embryonné sont caractéristiques du virus. On observe de petites lésions primaires (0,5 mm de diamètre), non hémorragiques au bout de 48 h puis, dans un second temps, après 96 h de culture, des lésions typiques avec un centre hémorragique se développent.

Les lésions les plus typiques sont les lésions hémorragiques que provoquent le virus de la variole du singe sur de la peau de lapin.

Caractéristiques	Variole	Vaccine	Monkeypox
Lésions sur la MCA (48h)	petite	Grande	petite
Passage sur la peau de lapin	-	+	+
Lésions sur la peau de lapin	non hémorragique	non hémorragique	hémorragique
Kératite chez le lapin	+	-	+
Pathogénicité sur des souris juvéniles	-	fatal	fatal
Formation de plaque avec cultures sur œuf de poule embryonné	-	+	+

Tableau 16 : Comparaison des propriétés des virus de la variole, de la vaccine et de la variole du singe (Brack 1987).

d) Immunohistochimie

La détection de l'agent de la variole du singe par immunohistochimie est relativement rapide et peut remplacer la microscopie électronique pour établir un premier diagnostic. Presque tous les anticorps polyclonaux dirigés contre le virus de la variole du singe devraient donner des résultats acceptables dans cette épreuve.

e) Amplification en chaîne par polymérase

La PCR est une méthode rapide et sensible de détection de l'ADN des virus orthopox. Un test PCR générique, décrit par Meyer *et al.* (1994), permet de reconnaître et de distinguer les espèces du genre *Orthopoxvirus* en se fondant sur la différence de taille de leurs amplicons.

II- Épreuves de sérologie

Tous les virus du genre *Orthopoxvirus* présentent des réactions sérologiques croisées. La plupart des épreuves sérologiques habituelles demandent beaucoup de temps et de travail, ce qui n'en fait pas de bonnes méthodes pour un premier diagnostic. Ces épreuves constituent quand même un outil précieux pour confirmer un diagnostic et pour des études épidémiologiques rétrospectives dans les régions où les singes ne sont pas vaccinés.

On peut détecter des anticorps à l'aide de plusieurs techniques :

- épreuve de séroneutralisation virale
- méthode immuno-enzymatique ELISA
- immunodiffusion
- immunofluorescence

RÉGLEMENTATION SANITAIRE

La variole du singe est une maladie à déclaration obligatoire pour les primates non humains. Il n'existe aucun laboratoire de référence en France, et aucune conduite à tenir n'est édictée. Il n'existe pas de technique officielle de diagnostic et par conséquent d'après l'article 223-1 du C.R., alinéa II, « l'existence de la maladie est établie par l'isolement de l'agent pathogène à la suite d'un examen réalisé par un laboratoire d'analyses agréé. »

Le virus de la variole du singe appartient au groupe de risque 3 (réglementation française et européenne). La manipulation de ce virus doté d'un fort potentiel de reproduction nécessite de disposer de laboratoires du niveau 3 de sécurité biologique.

Laboratoires de référence :

Virus Reference Laboratories, Inc.
7540 Louis Pasteur Road
SAN ANTONIO, Tx. 78229
Tél : (210) 614 – 7350 - Fax: (210) 614- -7355

Konsiliarlaboratorium für Poxviren
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin
Ludwigs-Maximilian-Universität
MÜNCHEN
Tél.: 089 2180 2528/ 089 2180 2028 - Fax: “ “ 5905
e-mail: sandra.essbauer@micro.vetmed.uni-muenchen.de

Konsiliarlaboratorium für Poxviren,
Robert Koch-Institut
Nordufer 20
13353 BERLIN
Tel.: 01888.754-2310 - Fax: 01888.754-2605
E-mail: PauliG@rki.de

CDC, Atlanta, Georgia /USA.

PROPHYLAXIE ET TRAITEMENT

I- Prophylaxie

La prévention de la variole du singe dans les centres de recherche sur les primates repose sur le respect de pratiques adéquates lors de la manipulation des animaux. Les singes des espèces asiatiques et africaines ne doivent pas être placés dans un même local. De même, il faut prendre des précautions particulières pour manipuler les gants ou le matériel potentiellement contaminés. Des soins médicaux doivent être prodigués aux personnes qui manipulent les animaux en cas de blessure ou d'excoriation cutanée (Acha 2005).

II- Traitement

Il n'existe pas actuellement de traitement spécifique de la variole du singe. Les mesures thérapeutiques visent donc à atténuer les symptômes et à prévenir des infections bactériennes secondaires (antiseptiques locaux, antibiothérapie si besoin).

TROISIÈME PARTIE :
LES MALADIES RÉGLEMENTÉES À
L'IMPORTATION

D'après l'arrêté du 19 avril 2002 (annexe 2) de nombreuses maladies sont réglementées à l'importation. Il s'agit des fièvres hémorragiques simiennes, de la tuberculose, de la rage, des entérobactéries pathogènes et de l'herpès B. La plupart de ces infections ont déjà été traitées dans les précédentes parties, on s'intéressera donc particulièrement aux entérobactéries pathogènes.

LES ENTÉROBACTÉRIES PATHOGÈNES

Le terme d' « entérobactéries pathogènes » est un terme large qui regroupe un certain nombre de bactéries. Dans ce chapitre on s'intéressera plus particulièrement aux agents de la Salmonellose, de la Shigellose et de la Yersiniose qui sont les maladies habituellement contrôlées à l'importation.

PRÉSENTATION DES AGENTS

I- Classification (Euzéby 2009)

	Salmonellose	Shigellose	Yersiniose
Règne	<i>Procaryotes</i>	<i>Procaryotes</i>	<i>Procaryotes</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genre	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Yersinia</i>
Espèces	<i>enterica</i>	- <i>S. dysenteriae</i> - <i>S. flexneri</i> - <i>S. boydii</i> - <i>S. sonnei</i>	- <i>enterolitica</i> - <i>pseudotuberculosis</i>
Quelques sérovars importants	- <i>S. tphi</i> - <i>S. cholerae suis</i> - <i>S. enteritidis</i> - <i>S. typhimurium</i> - <i>S. arizonae</i> - <i>S. dublin</i>		

Tableau 17 : Classification des agents de la Salmonellose, de la Shigellose et de la Yersiniose.

II- Principales caractéristiques bactériennes (CNRS 2009 et Acha 2005)

	Salmonellose	Shigellose	Yersiniose
Morphologie	Bacilles Gram- de 1 à 2µm de long, mobile	Gram-, non mobiles et non encapsulées, 2-3µm x 0,5-0,7µm	Gram-, 1µm x 2-5µm
Culture	Multiplication : 7°C-45°C pH de 4,1-9,0. Aéro-anaérobies facultatif. Milieu ordinaire et milieu sélectif (milieu SS : Shigella – Salmonella), milieu Muller – Kauffmann, la gélose au vert brillant, la gélose Hektoen, la gélose DCLS, la gélose XLD. oxydase –, catalase +, glucose +, nitrate réductase +, lactose –. Les caractères antigéniques : Ag O, Ag H, et Ag Vi.	Pas de milieu spécial de culture donc pour les différencier des autres entérobactéries : EMB ou McConkey agar. Colonie de petite taille. Aéro-anaérobie, nitrate réductase, oxydase négative, ne fermente pas le glucose.	Gélose McConkey, gélose désoxycholate-citrate. Aéro-anaérobie, nitrate réductase, oxydase négative.
Sensibilité	Chaleur, froid, désinfectants usuels.	Faible survie dans le milieu extérieur.	Chaleur et dessiccation
Résistance	- 30 à 40 jours dans l'eau - 30 mois dans le fumier - dans l'herbe, fourrages, matières fécales - 10 min sur la peau - multirésistance aux antibiotiques.	Sucs gastriques.	Froid, certains antibiotiques. Survit très bien dans l'environnement.

Tableau 18 : Principales caractéristiques morphologiques, biochimiques et de culture.

III- Pathogénie (Crenn 2004 et CNRS 2009)

a) Salmonellose

Fièvre typhoïde et paratyphoïdes : les bactéries sont ingérées. Elles traversent sans léser la paroi intestinale et gagnent les ganglions mésentériques où elles se multiplient. Une partie de ces bactéries se lysent et libèrent leurs endotoxines qui provoquent des signes cliniques (fièvre et tufhos), biologiques (leucopénie) et une irritation des plaques de Peyer qui peut entraîner une hémorragie intestinale. A partir des ganglions mésentériques les salmonelles gagnent la circulation sanguine (hémoculture positive) disséminent dans tous les organes (reins, foie, vésicule biliaire...) et sont excrétées en faible quantité et de façon intermittente dans les selles (coproculture rarement positive). L'organisme ainsi infecté, produit des anticorps contre les antigènes bactériens (sérodagnostic positif) qui contribuent à la guérison spontanée de la maladie. Sans traitement, la mortalité est de 20 %.

Gastro-entérite à Salmonella : les salmonelles dites mineures (*S. enteritidis* et *typhimurium*, les deux sous-espèces les plus fréquentes chez les animaux de laboratoire) sont ingérées souvent après contamination fécale – orale souvent par les mains sales, il s'ensuit des infections purement digestives qui se traduisent par de la diarrhée, des vomissements et de la fièvre. En général, l'évolution est bénigne. Le diagnostic biologique repose sur la coproculture (l'hémoculture et le sérodagnostic sont négatifs). Chez le nouveau-né, le jeune, le sujet âgé, l'immunodéprimé, les salmonelles mineures sont susceptibles de franchir la barrière intestinale et de provoquer un syndrome septicémique de type typhoïdique avec hémoculture positive.

b) Shigellose

La contamination des primates ne nécessitent que peu de bactéries (10 suffisent) car elles ont la capacité de résister au sucs gastriques.

Les bactéries se multiplient dans l'intestin grêle entraînant de la fièvre, des douleurs abdominales et des diarrhées liquides. Au bout de 2 à 3 jours, les bactéries s'établissent dans le colon.

Le facteur de virulence majeur des Shigellas est sa capacité de pénétrer et de se multiplier dans les cellules épithéliales du colon. Cette invasion provoque une réponse inflammatoire importante et des lésions des vaisseaux sanguins.

Les bactéries peuvent également produire une toxine.

c) Yersiniose

Après une inoculation d'une souche virulente par voie orale à la souris, la plupart des bactéries demeurent dans la lumière intestinale et une minorité d'entre elles adhèrent à la muqueuse sans prédilection pour un type cellulaire. Par contre, l'invasion ne concerne, presque exclusivement que les cellules M de l'épithélium des plaques de Peyer. Après pénétration de l'épithélium, les bactéries traversent la membrane basale du dôme des plaques de Peyer et elles se multiplient dans le tissu lymphoïde annexé à la muqueuse et dans la lamina propria où elles sont responsables de la formation de micro-abcès. Par les voies lymphatiques *Y. enterocolitica* gagne les nœuds lymphatiques mésentériques. Eventuellement, les bactéries peuvent se disséminer par voie sanguine et coloniser d'autres organes comme le foie et la rate dans lesquels elles se localisent préférentiellement dans le tissu lymphoïde. *Y. enterocolitica* peut résister à la phagocytose ce qui permet de qualifier cette bactérie de parasite intracellulaire facultatif. Toutefois, les examens histologiques montrent que la majorité des bactéries sont en position extracellulaire.

DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES

I- Répartition géographique et espèces sensibles (Ocholi 1987 et Acha 2005)

Maladie	Distribution	Espèces sensibles	Réservoir
Salmonellose	Répartition mondiale.	- Rongeurs, chiens, chats, reptiles, phoques et lions de mer, volailles, insectes, oiseaux, bovins, porcs, chevaux. - PNH : Rhésus, Babouin, Tamarins, Ouistitis, Orang-outan. Les primates du nouveau monde sont très sensibles.	Monde animal : poule, oiseaux, rongeurs, animaux à sang froid.
Shigellose	Cosmopolite mais en Tanzanie et au Kenya, maladie peu courante, plus fréquente en Asie.	Hommes et PNH. Chez les PNH, toutes les espèces simiennes en colonie sont sensibles. Rhésus+++, les singes d'Amérique sont peu résistants. Exemples de primates infectés : singe araignée, mangabey, macaque, gibbon, cercopithèque.	Primates non humains.
Yersiniose	Maladie cosmopolite : Amérique du nord, Europe, Afrique et Australie. Cependant la distribution des sérovars est variable.	Toutes les espèces animales y sont sensibles.	Les rongeurs constituent le réservoir principal de <i>Y. pseudotuberculosis</i> , mais le porc, les ovins, les bovins, les poissons et l'homme peuvent également jouer ce rôle.

Tableau 19 : Répartition géographique et espèces sensibles aux bactéries entéropathogènes.

On constate que les singes de l'ancien monde sont le plus souvent atteints par les Salmonelloses et les Shigelloses mais ils y résistent très bien.

II- Transmission

a) Salmonellose (Ocholi 1987):

i) Sources de contamination

Les animaux domestiques, de laboratoire et sauvages : bovins, ovins, porcins, caprins, équidés, carnivores, tortues, oiseaux, les rongeurs, les primates... Les plus dangereux sont les porteurs sains à l'origine de contamination par les fèces. Le contenu utérin et l'urine peuvent être des sources de contamination.

ii) Mode de contamination

- Par contact direct avec les animaux, leur sécrétions ou excréments : voie fécale - orale.
- Par voie digestive après consommation d'aliments souillés
- Par contact de personne à personne. – Les vecteurs : insectes.

L'homme contracte en général l'infection en consommant l'eau et les produits alimentaires contaminés. Il peut aussi la contracter au contact direct des animaux. C'est notamment le cas pour le personnel animalier. Les animaux de laboratoire se contaminent entre eux par l'ingestion de matières fécales ou par des aliments contaminés.

b) Shigellose (Kandoorp 2004)

i) Sources de contamination

Les sources essentielles sont donc les malades ou porteurs latents, les matières fécales, ou les objets souillés par les fèces.

ii) Mode de contamination

- par voie digestive (oro-fécale)

- par contact avec les déjections
- par des vecteurs.

Un animal excréteur sain présente peu de risques de contamination lors des manipulations (car les fèces sont pauvres en bacilles) mais s'il est atteint de troubles diarrhéiques, les précautions doivent être augmentées en particulier lors du ramassage des excréments (ils doivent être mis dans un sac étanche et incinérés). Cependant, ce n'est pas toujours évident dans le cas d'une volière où il y a un groupe d'animaux.

c) Yersiniose (Kandoorp 2004)

i) Sources de contamination

Les souches de *Yersinia enterocolitica* sont présentes dans l'environnement, notamment dans les eaux de surface, dans les aliments d'origine animale et végétale et dans le tube digestif de diverses espèces animales (porcs, bovins, ovins, caprins, chiens, chats, renards, porcs-épics, chinchillas, lagomorphes, rongeurs et volailles).

Dans les foyers naturels de *Yersinia pseudotuberculosis*, la maladie se transmet par les puces.

ii) Mode de contamination

Yersinia enterocolitica :

- Par voie digestive après ingestion d'aliments et d'eau contaminés.
- Par contact direct.

Yersinia pseudotuberculosis :

- par des vecteurs (piqûre de puces, de rongeurs, de lagomorphes ou de tiques)
- par blessures ou morsures lors de manipulation des animaux infectés.

EXPRESSION CLINIQUE

Le tableau clinique diffère selon l'entérobactérie pathogène incriminée. Nous allons donc étudier chacun de ces agents séparément.

I- Salmonellose

L'infection peut se manifester cliniquement ou pas. Dans la forme sub-clinique, l'animal peut soit développer une infection latente en hébergeant l'agent pathogène dans ses ganglions soit devenir porteur temporaire, intermittent ou durable excréant l'agent pathogène dans ses fèces.

Chez les animaux de laboratoire la forme asymptomatique est la plus fréquente. Quand la maladie se manifeste cliniquement, les malades présentent des fèces molles, des écoulements oculaires, de la dyspnée et des avortements. Des flambées sporadiques et une forte mortalité surviennent.

On distingue deux formes cliniques principales:

- **la forme digestive** : la plus fréquente, la durée d'incubation est de 12 à 36 heures caractérisée par une forte fièvre, une diarrhée (quelquefois accompagnée de saignement), vomissements, douleurs abdominales et avortements chez les femelles gestantes.

Chez les nouveaux-nés et les jeunes, la maladie s'aggrave entraînant une pneumonie ou une évolution vers la forme septicémique.

- **la forme septicémique** : caractérisée par un choc endotoxémique. La mort survient en 24 à 36 heures. Si l'animal survit à cette forme, des séquelles apparaissent : endocardite, polyarthrite...(CNRS 2007)

II- Shigellose

L'infection peut être inapparente. Cependant les symptômes observés chez les singes sont souvent plus sévères que ceux des hommes. Pathologie commune aux singes de l'ancien monde et du nouveau monde, les porteurs latents représentent un grand risque

épidémiologique. La maladie s'exprime cliniquement à la faveur d'un stress important (transport, peur...), de malnutrition ou d'infections annexes.

Elle se caractérise par une douleur abdominale, des vomissements parfois et une diarrhée liquide qui devient hémorragique et mucoïde contenant des leucocytes et des érythrocytes en grand nombre.

Il est possible d'observer d'autres signes tels que la fièvre, une dépression, une tachypnée et une déshydratation.

Chez le Rhésus, on peut observer des gingivites au niveau des molaires et des prémolaires, des avortements, des pathologies de l'épicarde et des méningites.

Une forme sépticémique peut exister chez les jeunes (Kandoorp 2004).

III- Yersiniose

Les premiers cas chez les primates ont été décrits en 1918 au zoo de Copenhague : 2 cercopithèques et 1 cercocèbe sont touchés. Puis en 1961, des germes de sérotypes O1 et O2 sont isolés sur des cynocéphales à Garches.

Plusieurs formes sont possibles :

- **Une forme aiguë sépticémique** : l'animal meurt subitement sans signe clinique préalable. Cette forme a été décrite chez les Callithrichidés, les Callimiconidés, le Galago à queue touffue.
- **Une forme subaiguë ou chronique** : elle se caractérise par l'apparition d'une léthargie, d'un amaigrissement parfois sévère et généralement d'une phase de diarrhée (témoin d'une entérite), parfois hémorragique, s'accompagnant d'une déshydratation, d'une hyperthermie, parfois d'une dyspnée. Une douleur abdominale est souvent présente (mais sous-diagnostiquée), probablement due à l'entérite et à une adénomégalie mésentérique. Cette forme a été décrite chez les Callithrichidés, les Callimiconidés, l'atèle coaita, le Galago à queue touffue, différentes espèces de macaques. La maladie est toujours fatale dans une durée variable (Fredriksson-Ahomaa 2007).
- Chez des singes-écureuils, il a été décrit une **forme originale** de la maladie, caractérisée par une hypertrophie des nœuds lymphatiques cervicaux de plusieurs animaux, associée à une faiblesse et une apathie. La symptomatologie chez les primates est fruste, l'évolution est rapide et la mortalité importante. Lors d'épizooties, les mortalités peuvent s'échelonner sur

plusieurs jours à quelques semaines, traduisant probablement une résistance plus importante de certains animaux ou l'apparition d'une hypersensibilité retardée.

Une partie des morts fœtales observées chez les Callithrichidés, les Callimiconidés, les macaques, pourrait s'expliquer par des problèmes reproductifs secondaires à une pseudotuberculose due à *Yersinia pseudotuberculosis*, par exemple en conséquence du stress engendré par la maladie ou suite à une entérite sévère.

Une étude sur la pseudotuberculose a montré que jusqu'à 7 % des individus peuvent être porteurs sains, les manifestations cliniques n'apparaissant qu'en cas de stress. Des études sérologiques sur des animaux sains apportent des résultats très variables : 8,9 à 45% des animaux sont séropositifs. En parc zoologique, la maladie revêt plutôt une allure épizootique, mais toutes les espèces ne semblent pas présenter la même sensibilité : ainsi, au parc zoologique d'Anvers, les cercopithèques sont les plus atteints, mais les macaques vivant dans un enclos très proche ne semblent pas touchés.

MÉTHODES DIAGNOSTIQUES

Le diagnostic clinique n'étant pas toujours évident à établir (signes cliniques peu caractéristiques, infection inapparente), il est nécessaire de disposer d'outils de diagnostic.

I- Diagnostic sérologique

Il consiste à rechercher les anticorps dans le sérum du patient. Il s'agit de réactions de séro-agglutination ou microagglutination. On utilise des antigènes polyvalents issus de tous les sérotypes.

On constate donc que l'avantage du test sérologique réside dans l'évolution du taux d'anticorps : si le taux reste élevé, cela signifie qu'un foyer infectieux persiste, par exemple dans les ganglions. La décroissance du taux prouve au contraire la guérison. Il est aussi utile lorsque la culture, test peu sensible, est négative.

Des réactions sérologiques croisées existent avec les *Brucella*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Pasteurella multocida*, *Vibrio*, *Escherichia coli*, *Brucella*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Flaviobacterium meningosepticum*, *Bordetella bronchiseptica* et les salmonelles des groupes B et D pour les types II et IV respectivement. Ainsi, lors de réactions positives, il est nécessaire de vérifier qu'il ne s'agit pas d'une autre bactérie (Acha 1982 et CNRS 2009).

Le diagnostic sérologique est un des moyens de diagnostic le plus fiable, le plus rapide et le plus simple. Il semble plus sensible que le diagnostic bactériologique, surtout en l'absence de signes cliniques gastro-intestinaux. Il s'agit d'un test spécifique. Il a une valeur diagnostique mais aussi pronostique par le suivi des taux et il permet de sérotyper la bactérie. Le principal inconvénient du diagnostic sérologique est que deux sérologies à une semaine d'intervalle sont nécessaires afin de voir si le taux d'anticorps augmente et donc pour confirmer le diagnostic. Même s'il s'agit d'une méthode rapide, le diagnostic peut prendre du temps.

II- Diagnostic bactériologique

Il consiste en l'isolement et l'identification du germe à partir d'un échantillon éventuellement contaminé :

- Prélèvement fécal : la bactérie est difficile à isoler dans les prélèvements fécaux et l'excrétion des bactéries est sporadique. Il faut préférer un prélèvement rectal pour détecter les animaux porteurs sains et pour éviter les risques de faux négatifs liés à l'excrétion intermittente des bactéries, le prélèvement rectal peut être effectué trois jours de suite. La coproculture, souvent utilisée en cas d'entérite, est en général rapide (48h), mais du fait des particularités culturales de la bactérie, l'isolement peut prendre plusieurs semaines (enrichissement par le froid, traitement alcalin,..). Le principal inconvénient est que la coproculture intervient souvent après la mise en place d'un traitement antibiotique, et donc les résultats négatifs peuvent induire en erreur.
- Prélèvements d'autopsie ou de biopsie : des fragments de ganglions, de rate, foie, poumons, moelle osseuse, bile, etc... L'isolement à partir de ces échantillons permet en général d'obtenir de meilleurs résultats que lors de coproculture
- L'hémoculture est possible et indispensable dans les cas de septicémies, mais présente peu d'intérêt pour les autres formes car la bactériémie est alors transitoire. Elle présente un grand intérêt en cas de mort subite chez les animaux, souvent liée à une forme septicémique de la maladie.

Ainsi, il est fondamental d'adapter son prélèvement aux signes cliniques observés et aussi à l'espèce. Lorsque cela est possible, il est conseillé de multiplier les prélèvements sur différents organes. La présence de lésions macroscopiques dans les organes est le signe d'une maladie chronique ou subaiguë ; lors de septicémie aiguë, peu de lésions sont en général visibles, mais par contre le germe peut être isolé à partir d'organes ne présentant pas de lésions.

De nombreux animaux peuvent être porteurs sains. Par conséquent, l'isolement de la bactérie doit toujours être mis en relation avec les signes cliniques observés chez l'animal : une culture fécale positive n'est pas nécessairement le reflet d'une pathologie, il est alors conseillé de rechercher le plasmide de virulence qui signe une souche pathogène.

De manière générale, le diagnostic bactériologique n'est pas une méthode très sensible mais il est le seul moyen d'isoler la bactérie et donc de réaliser un antibiogramme afin de mettre en place un traitement antibiotique efficace (Euzéby 2009 et CNRS 2009).

III- Diagnostic par PCR

La PCR consiste à détecter des gènes associés à la virulence par exemple comme les gènes *virF* plasmidique, *ail* ou *inv* chromosomiques pour la Yersiniose.

Comme pour le diagnostic bactériologique, il est important d'adapter le prélèvement aux signes cliniques et à l'espèce : des essais chez l'homme en Corée ont montré un taux de réussite de 86,7% à partir de sang en phase fébrile, de seulement 28,6% pour les cas en phase non fébrile. Il vaut par conséquent mieux utiliser la PCR sur sang en phase fébrile, c'est-à-dire en phase de bactériémie. Une PCR a été réalisée avec succès à partir de tissus de chimpanzés conservés en paraffine : la digestion de l'échantillon paraffiné est réalisée par une protéinase K, puis une lyse alcaline est réalisée, et l'ADN peut être rapidement et facilement amplifié. Cette méthode présente l'avantage indéniable de pouvoir s'affranchir de la culture.

La PCR présente l'avantage d'être précise, rapide, et d'avoir une forte sensibilité permettant de détecter des bactéries en faible quantité. Elle peut permettre de ne détecter que les souches virulentes et pathogènes par recherche de gènes plasmidiques, de manière plus simple que les tests de dépendance au calcium ou d'absorption du rouge de Congo qui déterminent habituellement si une souche est pathogène ou non. Cependant, il arrive que le plasmide soit perdu pendant la culture. D'autre part, cette méthode permet de différencier les sérotypes (Cheong 1996 et Kageyama 2002).

RÉGLEMENTATION SANITAIRE

Les entérobactéries pathogènes ne sont classées ni dans les maladies réputées contagieuses ni dans les maladies à déclaration obligatoire. Cependant les primates doivent être soumis à une épreuve diagnostique lors d'importations.

I- Réglementation actuelle sur la manipulation des entérobactéries

Agent biologique	Classification selon arrêté du 18 juillet 1994	Classification selon directive 2000/54/CE du parlement européen	U.S. Department of Health and Human Services
Salmonella	2 et 3 (<i>S. typhi</i>)	2 et 3 (<i>S. typhi</i>)	2 et 3 (<i>S. typhi</i>)
Shigella	2 et 3 (<i>S. dysenteriae</i> type 1)	2 et 3 (<i>S. dysenteriae</i> type 1)	2
Yersinia	2	2	2

Tableau 20 : Classification réglementaire des bactéries entéropathogènes.

La réglementation en vigueur concernant la manipulation des agents biologiques est régie par l'article R231-61-1 du code du travail, cet article est en vigueur depuis le 6 mai 1994.

Aux USA, la réglementation actuelle recommande un niveau de biosécurité de niveau 2 et 3 selon l'agent manipulé (U.S. Department of Health and Human Services, 2007).

II- Réglementation actuelle sur l'importation des primates non-humains concernant les bactéries entéropathogènes

L'arrêté du 19 Avril 2002 (annexe 2) fixant les conditions sanitaires pour l'importation et le transit, sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outre-mer, des animaux vivants et de certains de leurs produits visés à l'article L. 236-1 du code rural, exige qu'un vétérinaire officiel certifie que tous les animaux importés ou transitant sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outre-mer en provenance des pays tiers destinés à des établissements de présentation au public à caractère mobile, visés par ce texte « ont été soumis à une épreuve diagnostique annuelle, avec résultat négatif, pour la recherche des entérobactéries pathogènes » ou « ont été soumis à une épreuve diagnostique, avec résultat favorable, pour la recherche des entérobactéries pathogènes dans les quarante jours précédant le chargement ».

Ce même arrêté, exige qu'un vétérinaire officiel certifie que tous les animaux importés ou transitant sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outremer, destinés à des établissements d'expérimentation animale, des établissements d'élevage spécialisés, des établissements fournisseurs (au sens du décret 87-848 modifié du 19 octobre 1987) et des établissements de présentation au public à caractère fixe, en provenance des pays tiers : « ont été soumis à une épreuve diagnostique, avec résultat négatif, pour la recherche des entérobactéries pathogènes. Cette disposition ne s'applique pas aux Microcèbes (*Microcebus spp.*), Chirogales (*Cheirogalus spp.*), Allocèbes (*Allocebus spp.*), Galagos (*Galagos spp.*), Tarsiers spectral (*Tarsius spectrum*), Ouistitis pygmées (*Cebuella pygmea*) et Loris grêle (*Nycticebus tardigradus*) destinés à des établissements de présentation au public à caractère fixe qui ont été soumis à un traitement antibiotique pendant la quarantaine. »

Le terme « entérobactéries pathogènes » est un terme large. On ne s'intéresse actuellement qu'aux agent de la Salmonellose, des Shigelloses et de la Yersiniose, cependant ce terme d' « entérobactéries pathogènes » permet aux autorités de demander la recherche de toute autre entérobactéries pathogènes de manière fondée ou arbitraire et donc rendre plus difficile l'importation de primates.

III- Laboratoires de référence (Kandoorp 2004)

Il n'y a pas de laboratoire de référence en ce qui concerne les Shigelloses ou la Yersiniose, il faut alors s'adresser aux laboratoires vétérinaires locaux. Il en existe pour les agents de la Salmonellose.

Laboratoires de référence de l'OIE :

Dr R.H. Davies

VLA Weybridge

New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB

UNITED KINGDOM

Tel: (44-1932) 35.73.61 Fax: (44-1932) 35.75.95

Email: r.h.davies@vla.defra.gsi.gov.uk

Dr M. Hartung

Bundesinstitut für Risikobewertung (Federal Institute for Risk Assessment)

P.O. Box 330013, 14191 Berlin

GERMANY

Tel: (49.30) 84.12.22.12 Fax: (49.30) 84.12.29.52

Email: m.hartung@bfr.bund.de

Web: <http://www.bfr.bund.de>

Dr Cornelius Poppe

Laboratory for Foodborne Zoonoses, Guelph Laboratory, Health Canada, Public Health Agency of Canada 110 Stone Road West, Guelph, Ontario, N1G 3W4

CANADA

Tel: (1.519) 822.33.00 Fax: (1.519) 822.22.80

Email: cpoppe@sympatico.ca

Dr Antonia Ricci

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, National Reference LaboratoryL for Salmonella

Viale Dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD)

ITALY

Tel: (39.049) 808.42.96 Fax: (39.049) 883.02.68

Email: aricci@izsvenezie.it

Laboratoires appropriés :

- Laboratoires vétérinaires locaux

- Nationales veterinärmedizinisches Referenzlabor für Salmonellen, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz, Postfach 330013, 14191 Berlin, Germany
Tel.: 030-84 12 0 Fax.: 030-84 12 33 74

- ❖ Nationales Referenzzentrum für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger am Robert-Koch- Institut (Bereich Wernigerode),
FG 11 – Bakterielle Infektionen,
Burgstr. 3
D 38855 WERNIGERODE,
Germany
Tel.: 039 – 679 – 206
Fax: “ “ 207
e-mail: tschaep@rki.de

- ❖ Institut für Veterinär-Bakteriologie der Universität Bern, Länggass-Strasse 122, CH-3012 Bern, Switzerland

PROPHYLAXIE ET TRAITEMENT

I- Prophylaxie (Crenn 2004 et Kandoorp 2004)

1. La première mesure importante est l'application des **règles élémentaires d'hygiène**. Il ne s'agit pas là d'une mesure prophylactique particulière aux entérobactéries pathogènes : hygiène des locaux, mise en place de pédiluves aux entrées et sorties des différentes zones du parc et des bâtiments, hygiène dans la préparation alimentaire (lavage, rinçage des fruits par exemple)... Il est important de restreindre l'accès aux enclos ou aux cages au personnel autorisé, qui sera vêtu d'une tenue de travail spécifique (bottes, gants, blouses par exemple), cette tenue ne devant pas franchir les portes des établissements afin d'une part de ne pas exporter d'agents pathogènes mais d'autre part de ne pas en importer non plus.

2. La deuxième mesure importante en parc zoologique ou pour les primates destinés à l'expérimentation est la **mise en quarantaine** de tout animal nouvellement introduit : d'abord afin d'éviter l'introduction de tout nouvel agent pathogène quel qu'il soit, mais aussi parce que l'arrivée de tout nouvel animal représente un stress pour celui-ci, et que ce stress peut entraîner un réveil bactérien du fait d'une immunodépression. On peut d'ailleurs mettre à profit le stress du transport pour rechercher ces germes dans les jours suivant le transfert. Le problème bien souvent rencontré en parc zoologique est que les locaux font souvent défaut, la quarantaine vraie est alors souvent remplacée par un examen clinique approfondi, des analyses sanguines, des analyses de selles (bactériologies, coprologies), des nettoyages soigneux des locaux provisoires. La recherche systématique de certains germes n'est effectuée que si ce germe revêt une importance hygiénique ou médicale particulière. Quelquefois, les entérobactéries sont recherchées par coproculture chez les primates, mais on sait combien ce test est peu sensible. Il est très important, avant et après la quarantaine, d'effectuer un nettoyage haute pression, une désinfection, un rinçage des locaux de la quarantaine. Chaque jour pendant la quarantaine, il faut procéder à l'élimination de tous les déchets. Un vide sanitaire d'environ une semaine est recommandé entre chaque quarantaine. Le plus souvent, les maladies apparaissent à la deuxième ou troisième semaine après l'arrivée.

3. Il faut assurer la **protection de l'eau et de l'alimentation** de toute contamination animale

fécale, surtout de celle des animaux autochtones pouvant être vecteurs, tels que les rongeurs. Ainsi, les stocks alimentaires doivent être stockés à l'abri des nuisibles, surtout la nuit. Les fruits et les légumes peuvent même être désinfectés avec de l'eau de Javel diluée, ils doivent de toute façon être soigneusement lavés, brossés et rincés.

4. La mesure suivante, qui découle de la précédente, est le **contrôle des nuisibles** dans l'enceinte du parc (rongeurs, insectes), afin qu'ils ne contaminent pas les stocks de nourritures ni qu'ils puissent contaminer les enclos en y pénétrant. Une dératisation doit être effectuée tous les deux mois, surtout si des antécédents de pseudotuberculose ont été décrits. Un dépigeonnage peut aussi être effectuée, mais le rôle vecteur des oiseaux est encore discuté. On peut également mettre en place des barrières antirongeurs. Une autre solution consisterait à maintenir les espèces sauvages dans des enclos « hermétiques », donc intérieurs et bien souvent de petite taille, mais on perd alors tout le bénéfice de l'enrichissement permis par un vaste enclos extérieur.

5. Il est fondamental de **minimiser le stress** des animaux quand on sait que bien des épizooties se déclarent suite à un stress. Il est aussi possible de traiter les animaux préventivement avec un antibiotique quand on sait qu'un stress prévisible va survenir.

6. Des **autopsies** doivent être systématiquement effectuée afin de déterminer la cause de la mort chez tous les individus décédés et ce, afin de détecter d'éventuelles épizooties ou zoonoses.

II- Traitement

- Le premier geste thérapeutique consiste à rétablir l'équilibre hydro-électrolytique et acido-basique.

- L'antibiothérapie : est à éviter dans les formes simples de salmonellose car elle prolonge le portage intestinal des salmonelles.

Dans les formes sévères ou chez les animaux fragiles, il faut administrer des antibiotiques. L'utilisation de fluidixine méglumine peut être recommandée pour son effet antipyrétique et son effet antitoxémique. Dans tous les cas, il est conseillé de procéder à un antibiogramme.

- Dans les cas de choc endotoxémique, une corticothérapie est indiquée.

- Adsorbant intestinaux (charbon actif) qui limite le passage sanguin des toxines.

CONCLUSION

Le maintien des primates en captivité dans les parcs zoologiques est justifié par l'importance de conservation et de sauvegarde des nombreuses espèces menacées, mais aussi par le rôle sur l'éducation et l'information du public qu'ils peuvent jouer. Les PNH sont également les espèces animales utilisées en laboratoire avec lesquelles le risque zoonotique est le plus élevé. Par ailleurs, beaucoup de fournisseurs de PNH à l'étranger ne sont pas indemnes des principaux agents pathogènes des PNH. Il est donc primordial de mener une politique sanitaire rigoureuse afin de limiter le risque de zoonoses.

A travers les différentes parties de ce travail, nous avons établi la liste des maladies réglementées chez les primates en distinguant les MRC, les MDO et les maladies réglementées à l'importation.

Au terme de cette thèse, il nous apparaît essentiel d'attirer l'attention sur un certain nombre de problèmes concernant le dépistage des animaux et la conduite à tenir. En effet, un certain nombre de maladies telles que la Brucellose, la Fièvre Charbonneuse ou encore la Maladie d'Aujeszky sont depuis 2006 réglementées chez tous les mammifères, et par conséquent chez les PNH également. Il n'en demeure pas moins que les primates sont très peu sensibles à ces pathologies et les techniques de dépistage ne sont donc que très rarement évaluées pour les PNH, et on est en droit de remettre en cause la validité des résultats lors de tests. De plus, la réglementation reste parfois floue en ce qui concerne les techniques officielles à employer, laissant alors parfois comme seule indication au vétérinaire que « l'existence de la maladie est établie par isolement de l'agent pathogène » (Art. D 223-21 du C.R., alinéa II). Encore faut-il savoir où chercher l'agent pathogène concerné.

Un second problème a été mis en évidence, la conduite à tenir en cas d'infection. Très souvent les textes ne dictent aucune mesure de police sanitaire à suivre en cas de découverte d'animaux positifs dans la faune sauvage et notamment chez les primates non humains. La réglementation ne prêter attention bien trop souvent qu'aux animaux domestiques (carnivores, bovins, ovins) sans s'attacher à l'ensembles des espèces concernées par la loi.

En conclusion, de nombreux progrès techniques et réglementaires restent à faire afin d'assurer l'état sanitaire des primates et de prévenir le risque de zoonoses.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

Mlle MOLTO Nelly

a été admis(e) sur concours en : 2004

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 9 juillet 2009

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

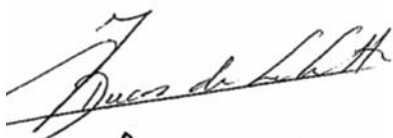
Je soussigné, Jacques DUCOS de LAHITTE, Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
autorise la soutenance de la thèse de :

Mlle MOLTO Nelly

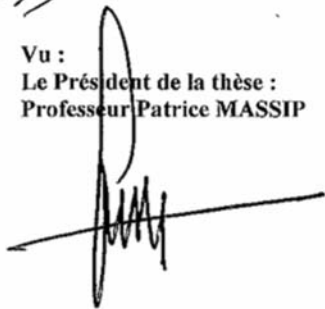
intitulée :

« Les maladies réglementées chez les primates. »


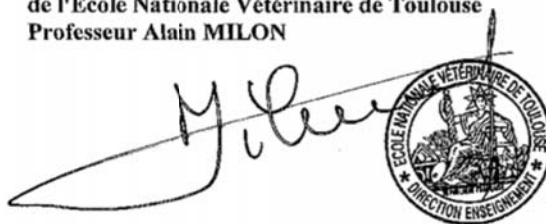
**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Jacques DUCOS de LAHITTE**



**Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Patrice MASSIP**



**Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON**



**Vu le :
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Gilles FOURTANIER**



ANNEXES

Annexe 1 : Classification des primates

L'ordre des primates regroupe actuellement 290 à 310 espèces décrites formant un groupe très diversifié, auquel appartient l'homme (*Homo sapiens*). L'appartenance à cet ordre se fait selon de multiples critères (anatomiques, génétiques, phénotypiques, écologiques, acoustiques, ...).

Les principales caractéristiques communes des primates sont les suivantes :

- un développement embryonnaire s'effectuant entièrement dans l'utérus par voie placentaire (mammifères euthériens) ;
- des mains et des pieds pentadactyles, préhensiles (par opposition du doigt I), avec des ongles plats ;
- un crâne et un cerveau très développés ;
- une vision binoculaire, prédominante sur l'olfaction ;
- la mobilité accrue de certains os par la non-union des radius, ulna, tibia et fibula, et la présence d'une clavicule.

Tous ces caractères en font des animaux adaptés à la vie arboricole ; même si plusieurs espèces sont retournées à une vie au sol, elles en ont gardé les adaptations.

La classification des primates évolue en permanence, en parallèle avec les découvertes de nouvelles espèces et les avancées au niveau moléculaire, et les opinions des spécialistes divergent parfois encore. La classification actuelle selon Pierre Moisson (2005) est présentée dans le tableau suivant.

Cette classification divise les primates en trois sous-ordres :

- les prosimiens strepsirrhiniens : primates présentant des caractères plus primitifs (museau allongé avec formation d'un rhinarium, yeux en position plus latérale, cerveau moins développé,...) mais bien adaptés à leur vie arboricole.
- les prosimiens haplorrhiniens : cet ordre comprend la famille des tarsiidés, classée auparavant dans les strepsirrhiniens ; mais les membres de cette famille ne présentant pas de rhinarium ni de vibrisses, un nouveau sous-ordre a été créé pour eux.
- les anthropoïdes haplorrhiniens : c'est le groupe le plus important, présentant les caractères les plus évolués ; il comprend les Platyrrhiniens (ou "singes du nouveau monde") et les Catarrhiniens (ou "singes de l'ancien monde", sauf l'homme).

Sous-ordre	Infra-ordre	Super-famille	Famille	Sous-famille	Genres	
<i>Prosimii/Strepsirrhini</i>	Lorisiformes	<i>Loroidea</i>	<i>Loridae</i>		<i>Arctocebus, Loris, Nycticebus, Perodicticus</i>	
			<i>Galagonidae</i>		<i>Euoticus, Galago, Galagoidea, Otolemur</i>	
	Lemuriformes	<i>Lemuroidea</i>	<i>Cheirogaleidae</i>	<i>Cheirogaleinae</i>	<i>Allocebus, Cheirogalus, Microcebus</i>	
				<i>Phanerinae</i>	<i>Phaner</i>	
			<i>Megaladapidae</i>		<i>Lepilemur</i>	
			<i>Lemuridae</i>		<i>Eulemur, Lemur, Varecia, Hapalemur</i>	
			<i>Indridae</i>		<i>Avahi, Propithecus, Indri</i>	
		<i>Daubentoniidae</i>		<i>Daubentonia</i>		
<i>Prosimii/Haplorrhini</i>	Tarsiformes	<i>Tarsioidea</i>	<i>Tarsiidae</i>		<i>Tarsius</i>	
<i>Anthropoidea/Haplorrhini</i>	Platyrrhiniens	<i>Ceboidea</i>	<i>Callitrichidae</i>	<i>Callitrichinae</i>	<i>Callimico, Callithrix, Saguinus, Leontopithecus</i>	
			<i>Cebidae</i>	<i>Aotinae</i>	<i>Aotus</i>	
				<i>Callicininae</i>	<i>Callicebus</i>	
				<i>Cebinae</i>	<i>Cebus, Saimiri</i>	
				<i>Pitheciinae</i>	<i>Pithecia, Chiropotes, Cacaço</i>	
				<i>Alouattinae</i>	<i>Alouatta</i>	
	<i>Atelinae</i>	<i>Ateles, Brachyteles, Lagothrix</i>				
	Catarrhiniens	<i>Cercopithecoidea</i>	<i>Cercopithecoidea</i>	<i>Cercopithecoidea</i>	<i>Cercopithecinae</i>	<i>Macaca, Papio, Mandrillus, Theropithecus, Cercocebus, Lophocebus, Allenopithecus, Miopithecus, Erythrocebus, Chlorocebus, Cercopithecus</i>
					<i>Colobinae</i>	<i>Colobus, Procolobus, Presbytis, Semnopithecus, Trachypithecus, Pygathrix, Nasalis</i>
		<i>Hominoidea</i>	<i>Hominoidea</i>	<i>Hylobatidae</i>		<i>Hylobates, Bunopithecus, Nomascus, Symphalangus</i>
				<i>Pongidae</i>		<i>Pongo</i>
				<i>Hominidae</i>		<i>Gorilla, Pan, Homo</i>

Tableau 21 : Classification de l'ordre des Primates (Moisson, 2005)

Annexe 2 : Textes réglementaires

Arrêté 19 Juillet 2002

Arrêté fixant les conditions sanitaires pour l'importation et le transit, sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outre-mer, des animaux vivants et de certains de leurs produits visés à l'article L. 236-1 du code rural

NOR : AGRG0201612A

Article Annexe 5 En vigueur
Créé par Arrêté 2002-07-19 JORF 2 août 2002.

En vigueur depuis le 2 Août 2002

Certificat sanitaire pour l'importation et le transit sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outre-mer de primates non humains en provenance des pays tiers destinés à des établissements de présentation au public à caractère mobile.

Numéro du certificat, pays tiers d'expédition, autorité d'émission compétente, numéro de permis CITES Export (si nécessaire).

1. Identification des animaux.

Nom scientifique et nom commun, pays d'origine et de provenance, numéro d'identification individuel (tatouage ou transpondeur implantable), endroit du marquage, sexe, date de naissance ou âge, nombre total d'animaux.

2. Origine et destination.

Les animaux visés ci-dessus sont expédiés de ... (établissement d'origine, adresse, pays), par le moyen de transport suivant :

nature, numéro d'immatriculation, numéro du vol ou le nom, selon le cas, nom et adresse de l'exportateur ou de l'importateur, nom et adresse des locaux de première destination.

3. Renseignements sanitaires.

Je soussigné, vétérinaire officiel, certifie que les animaux décrits ci-dessus répondent aux conditions suivantes :

a) Sont originaires et proviennent d'un pays tiers dans lequel aucun cas de fièvres hémorragiques simiennes (fièvre de Crimée-Congo, fièvre jaune, fièvre de Mayaro, maladies à virus Ebola, maladie de Marburg, maladie à virus Kungunya) n'a été constaté au cours des 2 dernières années ;

b) Sont originaires d'un établissement placé sous surveillance vétérinaire depuis au moins 6 mois, où est appliqué un programme de surveillance sanitaire adapté des animaux au regard des maladies contagieuses de l'espèce, incluant des analyses microbiologiques et parasitologiques ainsi que des autopsies, dans lequel :

- tous les animaux ont été inspectés quotidiennement pour rechercher tout signe éventuel de maladie et être soumis, si nécessaire, à un examen clinique ;

- tous les animaux trouvés morts pour quelque raison que ce soit ont fait l'objet d'une autopsie complète dans un laboratoire habilité à cette fin par l'autorité compétente ;

- la cause de toute morbidité ou mortalité a été déterminée avant que le groupe auquel appartiennent les animaux soit expédié ;

c) Sont nés dans l'établissement d'origine et y sont restés depuis leur naissance ou ont été introduits dans l'établissement d'origine depuis au moins 6 mois ;
d) Sont originaires et proviennent d'un établissement dans lequel aucun cas de tuberculose et de rage ou d'autres zoonoses n'a été constaté au cours des 2 dernières années ;
e) Ont été soumis à au moins deux traitements annuels contre les parasites internes et externes le ... et le ... au cours des 40 jours précédant l'exportation avec le(s) produit(s) suivant(s) : ... (préciser les molécules actives et les doses de produit utilisées).
f) Ont été soumis, avec résultat négatif, à deux épreuves de dépistage de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*, *bovis*, *africanum*), effectuées au début et à la fin de la quarantaine le ... et le ..., ou ont été soumis, avec résultat négatif, à deux épreuves annuelles de dépistage de la tuberculose, la dernière épreuve ayant été effectuée dans les 40 jours précédant le chargement ;

g) Ont été soumis à une épreuve diagnostique annuelle, avec résultat négatif, pour la recherche des entérobactéries pathogènes ou ont été soumis à une épreuve diagnostique, avec résultat favorable, pour la recherche des entérobactéries pathogènes dans les 40 jours précédant le chargement ;

h) Ont été soumis, pour les macaques (*Macaca* spp.), à une épreuve de dépistage sérologique annuelle avec résultat négatif de l'herpès virose B, réalisée le ... dans un laboratoire autorisé ou à une épreuve de dépistages sérologique avec résultat négatif de l'herpès virose B, réalisée dans les 40 jours précédant le chargement ;

i) Soumis, à J 0, à une épreuve de recherche, avec résultats négatifs, des anticorps neutralisant le virus rabique par un laboratoire officiel (nom et adresse du laboratoire) réalisée le ..., puis vaccinés à J 0 par injection d'un vaccin inactivé d'au moins une unité antigénique internationale (norme OMS Organisation mondiale de la santé) le ..., avec le vaccin suivant (nom du vaccin et numéro du lot) et soumis à nouveau J 30 à une épreuve de titrage des anticorps neutralisant le virus rabique par un laboratoire officiel (nom et adresse du laboratoire), relevant un titre sérique au moins égal à 0,5 unité internationale par millilitre 30 jours après la vaccination le ... et expédiés à J 120 (1).

Dans le cas d'animaux qui ont fait l'objet d'une revaccination sans rupture du protocole vaccinal prescrit par le fabricant, les animaux ont été soumis à une épreuve de titrage des anticorps neutralisant le virus rabique par un laboratoire officiel (nom et adresse du laboratoire), relevant un titre sérique au moins égal à 0,5 unité internationale par millilitre, 30 jours après ce rappel ;

j) Ont été examinés le jour de leur chargement et ne présentent aucun signe clinique de maladie ou de suspicion de maladie et ont été jugés aptes au transport ;

k) Sont accompagnés d'un carnet de santé et de suivi individuel reprenant les informations définies suivantes :

- nom du propriétaire de l'animal ;
- adresse ;
- date de naissance de l'animal ;
- lieu de naissance de l'animal ;
- date d'acquisition de l'animal ;
- sexe de l'animal ;
- identification de l'animal (numéro de tatouage, numéro du transpondeur implantable micropuce et endroit du marquage) ;
- nom scientifique et nom commun de l'animal ;
- origine et provenance ;
- enregistrement des vaccinations (date des vaccinations, lieu des vaccinations, nom du vaccin, numéro de lot, nom en lettres capitales du vétérinaire, signature et cachet du

vétérinaire) ;

- contrôles sanitaires effectués par des laboratoires (date des prélèvements, lieu de réalisation des analyses, résultats des analyses) ;

- date des examens vétérinaires, résultats des examens vétérinaires ; nom en lettres capitales du vétérinaire, signature et cachet du vétérinaire ;

- date des traitements vétérinaires, produits utilisés,

que j'ai reçu du propriétaire ou de son représentant une déclaration attestant :

- que, jusqu'à leur arrivée sur le territoire français, les animaux décrits dans le présent certificat ne seront pas en contact avec des animaux ne présentant pas un statut sanitaire équivalent ;

- que tous les véhicules de transport et conteneurs, dans lesquels les animaux seront embarqués conformément aux normes internationales applicables au transport d'animaux vivants, seront préalablement nettoyés et désinfectés avec le produit suivant ..., et ils sont conçus de telle sorte que les déjections, la litière ou l'alimentation ne puissent pas s'écouler pendant le transport.

Ce certificat est valable 5 jours à compter de sa date de signature.

Fait à ..., le ...

Cachet et signature du vétérinaire officiel (la signature et le cachet doivent être d'une couleur différente de celle du texte imprimé).

Nom en lettres capitales, titre et qualification du vétérinaire officiel.

(1) La disposition J 120 est applicable à compter du 1er décembre 2002.

Textes appliqués :Code rural L236-1.

Arrêté 19 Juillet 2002

Arrêté fixant les conditions sanitaires pour l'importation et le transit, sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outre-mer, des animaux vivants et de certains de leurs produits visés à l'article L. 236-1 du code rural

NOR : AGRG0201612A

Article Annexe 4 En vigueur
Créé par Arrêté 2002-07-19 JORF 2 août 2002.

En vigueur depuis le 2 Août 2002

Certificat sanitaire pour l'importation et le transit sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outre-mer de primates non humains, destinés à des établissements d'expérimentation animale, des établissements d'élevage spécialisés, des établissements fournisseurs (au sens du décret n° 87-848 modifié du 19 octobre 1987) et des établissements de présentation au public à caractère fixe, en provenance des pays tiers.

Numéro du certificat, pays tiers d'expédition, autorité d'émission compétente, numéro de permis CITES Export (si nécessaire).

1. Identification des animaux.

Nom scientifique et nom commun, pays d'origine et de provenance, numéro d'identification individuel (tatouage ou transpondeur implantable), endroit du marquage, sexe, date de naissance ou âge, nombre total d'animaux.

2. Origine et destination.

Les animaux visés ci-dessus sont expédiés de ... (établissement d'origine, adresse, pays), par le moyen de transport suivant :

nature, numéro d'immatriculation, numéro du vol ou le nom selon le cas, nom et adresse de l'exportateur ou de l'importateur, nom et adresse des locaux de première destination.

3. Renseignements sanitaires.

Je soussigné, vétérinaire officiel, certifie que les animaux décrits ci-dessus répondent aux conditions suivantes :

- a) Sont originaires et proviennent d'un pays tiers dans lequel aucun cas de fièvres hémorragiques simiennes (fièvre de Crimée-Congo, fièvre jaune, fièvre de Mayaro, maladies à virus Ebola, maladie de Marburg, maladie à virus Kungunya) n'a été constaté au cours des deux dernières années ;
- b) Sont originaires d'un établissement placé sous surveillance vétérinaire, où est appliqué un programme de surveillance sanitaire adapté des animaux au regard des maladies contagieuses de l'espèce, incluant des analyses microbiologiques et parasitologiques ainsi que des autopsies ;
- c) Sont nés dans l'établissement d'origine et y sont restés depuis leur naissance ou ont été introduits dans l'établissement d'origine depuis au moins 6 mois ou ont été introduits dans l'établissement d'origine depuis au moins 60 jours et moins de 6 mois ;
- d) Sont originaires et proviennent d'un établissement dans lequel aucun cas de tuberculose et

de rage n'a été constaté au cours des deux dernières années ;

e) Ont été placés, préalablement à leur exportation, dans une station de quarantaine conformément aux dispositions du code zoosanitaire international de l'Office international des épizooties pour une durée d'au moins 40 jours (date d'entrée en quarantaine le ..., date de sortie de la quarantaine le ..., dans laquelle, durant cette période :

- tous les animaux ont été inspectés quotidiennement pour rechercher tout signe éventuel de maladie et être soumis, si nécessaire, à un examen clinique ;
- tous les animaux trouvés morts pour quelque raison que ce soit ont fait l'objet d'une autopsie complète dans un laboratoire habilité à cette fin par l'autorité compétente ;
- la cause de toute morbidité ou mortalité a été déterminée avant que le groupe auquel appartiennent les animaux soit libéré de la quarantaine ;

f) Ont été soumis à au moins deux traitements contre les parasites internes et externes le ... et le ... au cours des 40 jours précédant l'exportation avec le(s) produit(s) suivant(s) : ... (préciser les molécules actives et les doses de produit utilisées).

g) Ont été soumis, avec résultat négatif, à deux épreuves de dépistage de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*, *Bovis*, *Africanum*), effectuées au début et à la fin de la quarantaine le ... (préciser la date) et le ... (préciser la date). Cette disposition ne s'applique pas aux microcèbes (*Microcebus* sp.), chirogales (*Cheirogalus* sp.), allocèbes (*Allocebus* sp.), tarsier spectral (*Tarsius spectrum*) et ouistiti pygmée (*Cebuella pygmea*) destinés à des établissements de présentation au public à caractère fixe ;

h) Ont été soumis à une épreuve diagnostique, avec résultat négatif, pour la recherche des entérobactéries pathogènes. Cette disposition ne s'applique pas aux microcèbes (*Microcebus* sp.), chirogales (*Cheirogalus* sp.), allocèbes (*Allocebus* sp.), galagos (*Galagos* sp.), tarsiers spectraux (*Tarsius spectrum*), ouistitis pygmées (*Cebuella pygmea*) et loris grêle (*Nyctebus tardigradus*) destinés à des établissements de présentation au public à caractère fixe qui ont été soumis à un traitement antibiotique pendant la quarantaine ;

i) Ont été soumis, pour les macaques (*Macaca* spp.)

à une épreuve de dépistage sérologique avec résultat négatif de l'herpès virale B, réalisé le Cette disposition ne s'applique pas aux macaques à longue queue ou macaques crabiers (*Macaca fascicularis*) originaires et en provenance de l'île Maurice ;

j) Ont été :

- soumis, dans le cas des animaux non vaccinés contre la rage, à deux épreuves de recherche, avec résultats négatifs, des anticorps neutralisant le virus rabique par un laboratoire officiel (nom et adresse du laboratoire) réalisées à l'entrée des animaux en quarantaine le ..., et dans les 10 jours précédant l'expédition le ... ;
- soumis, à J 0 à une épreuve de recherche, avec résultats négatifs, des anticorps neutralisant le virus rabique par un laboratoire officiel (nom et adresse du laboratoire) réalisées à l'entrée des animaux en quarantaine le ..., puis vaccinés à J 0 par injection d'un vaccin inactivé d'au moins une unité antigénique internationale (norme OMS Organisation mondiale de la santé) le ... avec le vaccin suivant ... (nom du vaccin et numéro du lot) et soumis à nouveau J 30 à une épreuve de titrage des anticorps neutralisant le virus rabique par un laboratoire officiel (nom et adresse du laboratoire), relevant un titre sérique au moins égal à 0,5 unité internationale par millilitre 30 jours après la vaccination le ... et expédiés à J 120 (1) ;
- proviennent d'un pays tiers indemne de rage au sens du code zoosanitaire international de l'Office international des épizooties dans lequel ils ont séjourné sans discontinuité ;

k) Ont été examinés le jour de leur chargement et ne présentent aucun signe clinique de maladie ou de suspicion de maladie et ont été jugés aptes au transport, que j'ai reçu du propriétaire ou de son représentant une déclaration attestant :

- que jusqu'à leur arrivée sur le territoire français les animaux décrits dans le présent certificat

ne seront pas en contact avec des animaux ne présentant pas un statut sanitaire équivalent ;
- que tous les véhicules de transports et conteneurs dans lesquels les animaux seront embarqués conformément aux normes internationales applicables au transport d'animaux vivants seront préalablement nettoyés et désinfectés avec le produit suivant :
et ils sont conçus de telle sorte que les déjections, la litière ou l'alimentation ne puissent pas s'écouler pendant le transport.

Ce certificat est valable 5 jours à compter de sa date de signature.

Fait à ..., le ...

Cachet et signature du vétérinaire officiel (la signature et le cachet doivent être d'une couleur différente de celle du texte imprimé).

Nom en lettres capitales, titre et qualification du vétérinaire officiel.

(1) La disposition J 120 est applicable à compter du 1er décembre 2002.

Textes appliqués :Code rural L236-1.

Classement des agents biologiques

La liste des agents biologiques pathogènes a été fixée par l'arrêté du 18 juillet 1994 (J.O. du 30 juillet 1994) puis modifié par les arrêtés du 17 avril 1997 (J.O. du 26 avril 1997) et du 30 juin 1998 (J.O. du 22 juillet 1998).

L'évaluation des risques infectieux, prescrite par le décret n° 94-352 du 4 mai 1994 relatif à la protection des travailleurs contre les risques résultant de leur exposition à des agents biologiques (J.O. du 6 mai 1994), est effectuée sur la base d'un classement des agents biologiques en 4 groupes en fonction de l'importance du risque d'infection qu'ils présentent (art. R. 231-61-1).

- **Groupe 1** comprend les agents biologiques non susceptibles de provoquer une maladie chez l'homme
- **Groupe 2** comprend les agents biologiques pouvant provoquer une maladie chez l'homme et constituer un danger pour les travailleurs ; leur propagation dans la collectivité est peu probable ; il existe généralement une prophylaxie ou un traitement efficace.
- **Groupe 3** comprend les agents biologiques pouvant provoquer une maladie grave chez l'homme et constituer un danger sérieux pour les travailleurs ; leur propagation dans la collectivité est possible, mais il existe généralement une prophylaxie ou un traitement efficace
- **Groupe 4** comprend les agents biologiques qui provoquent des maladies graves chez l'homme et constituent un danger sérieux pour les travailleurs ; le risque de propagation dans la collectivité est élevé ; il n'existe généralement ni prophylaxie ni traitement efficace.

Sont considérés comme agents biologiques pathogènes, les agents des groupes 2, 3 et 4.

**MINISTÈRE DU TRAVAIL, DE L'EMPLOI
ET DE LA FORMATION PROFESSIONNELLE**

**Arrêté du 18 juillet 1994 fixant la liste
des agents biologiques pathogènes**
NOR : TEFT9400844A

Le ministre du travail, de l'emploi et de la formation professionnelle, le ministre de l'agriculture et de la pêche et le ministre délégué à la santé,

Vu la directive n° 93/88/C.E.E. du conseil du 12 octobre 1993 modifiant la directive n° 90/679/C.E.E. concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail (septième directive particulière au sens de l'article 16, paragraphe 1, de la directive n° 89/391/C.E.E.);

Vu l'article R. 231-61-1 du code du travail relatif à la classification des agents biologiques;

Vu l'avis du Conseil supérieur de la prévention des risques professionnels;

Vu l'avis de la Commission nationale d'hygiène et de sécurité en agriculture,

Arrêtent :

Art. 1^{er}. - Les dispositions annexées au présent arrêté fixent la liste des agents biologiques pathogènes et les classent au sein des groupes 2, 3 ou 4 tels que définis à l'article R. 231-61-1 du code du travail.

Art. 2. - Le directeur des relations du travail, le directeur général de la santé et le directeur des exploitations, de la politique sociale et de l'emploi sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au *Journal officiel* de la République française.

Fait à Paris, le 18 juillet 1994.

*Le ministre du travail, de l'emploi
et de la formation professionnelle,*

Pour le ministre et par délégation :

Par empêchement du directeur
des relations du travail :

Le chef de service,
F. BRUN

Le ministre de l'agriculture et de la pêche,

Pour le ministre et par délégation :

Par empêchement du directeur des exploitations,
de la politique sociale et de l'emploi :

L'administrateur civil,
J.-J. RENAULT

Le ministre délégué à la santé,

Pour le ministre et par délégation :

Par empêchement du directeur général de la santé :
Le sous-directeur de la veille sanitaire,
Y. COQUIN

ANNEXE

PARTIE I

Liste des agents biologiques pathogènes des groupes 2, 3 et 4

Tableau A

Les bactéries

AGENT BIOLOGIQUE	CLASSIFICATION	SIGLES et symboles
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	2	
<i>Actinomadura madurae</i>	2	

AGENT BIOLOGIQUE	CLASSIFICATION	SIGLES et symboles
<i>Actinomadura pelletieri</i>	2	
<i>Actinomyces gerencsenaie</i>	2	
<i>Actinomyces israelii</i>	2	
<i>Actinomyces pyogenes</i>	2	
<i>Actinomyces spp.</i>	2	
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i> (<i>Corynebacterium haemolyticum</i>)	2	
<i>Bacillus anthracis</i>	3	
<i>Bacteroides fragilis</i>	2	
<i>Bartonella bacilliformis</i>	2	
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	2	
<i>Bordetella parapertussis</i>	2	
<i>Bordetella pertussis</i>	2	V
<i>Borrelia burgdorferi</i>	2	
<i>Borrelia duttonii</i>	2	
<i>Borrelia recurrentis</i>	2	
<i>Borrelia spp.</i>	2	
<i>Brucella abortus</i>	3	
<i>Brucella canis</i>	3	
<i>Brucella melitensis 1</i>	3	
<i>Brucella suis</i>	3	
<i>Campylobacter fetus</i>	2	
<i>Campylobacter jejuni</i>	2	
<i>Campylobacter spp.</i>	2	
<i>Cardiobacterium hominis</i>	2	
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	2	
<i>Chlamydia trachomatis</i>	2	
<i>Chlamydia psittaci</i> (souches aviaires)	3	
<i>Chlamydia psittaci</i> (souches non aviaires)	2	
<i>Clostridium botulinum</i>	2	T
<i>Clostridium perfringens</i>	2	
<i>Clostridium tetani</i>	2	T, V
<i>Clostridium spp.</i>	2	
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	2	T, V
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	2	
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	2	
<i>Corynebacterium spp.</i>	2	
<i>Coxiella burnetii</i>	3	
<i>Edwardsiella tarda</i>	2	
<i>Ehrlichia sennetsui</i> (<i>Rickettsia sennetsui</i>)	2	
<i>Ehrlichia spp.</i>	2	
<i>Eikenella corrodens</i>	2	
<i>Enterobacter aerogenes cloacae</i>	2	
<i>Enterobacter spp.</i>	2	
<i>Enterococcus spp.</i>	2	
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	2	
<i>Escherichia coli</i> (à l'exception des souches non pathogènes)	2	
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	2	
<i>Fluoribacter bozemanae</i> (<i>Legionella</i>)	2	
<i>Francisella tularensis</i> (type A)	3	
<i>Francisella tularensis</i> (type B)	2	
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	2	

AGENT BIOLOGIQUE	CLASSIFICATION	SIGLES et symboles
<i>Gardnerella vaginalis</i>	2	
<i>Haemophilus ducreyi</i>	2	
<i>Haemophilus influenzae</i>	2	V
<i>Haemophilus spp</i>	2	
<i>Helicobacter pylori</i>	2	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	
<i>Klebsiella spp</i>	2	
<i>Legionella pneumophila</i>	2	
<i>Legionella spp</i>	2	
<i>Leptospira interrogans</i> (tous séro- types).....	2	
<i>Listeria monocytogenes</i>	2	
<i>Listeria ivanovii</i>	2	
<i>Morganella morganii</i>	2	
<i>Mycobacterium africanum</i>	3	V
<i>Mycobacterium avium/intracellulare</i>	2	
<i>Mycobacterium bovis</i> (à l'exception de la souche B.C.G.).....	3	V
<i>Mycobacterium chelonae</i>	2	
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	2	
<i>Mycobacterium kansasii</i>	2	
<i>Mycobacterium leprae</i>	3	
<i>Mycobacterium mageritense</i>	2	
<i>Mycobacterium marinum</i>	2	
<i>Mycobacterium microti</i>	3	(*)
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	2	
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	2	
<i>Mycobacterium simiae</i>	2	
<i>Mycobacterium szulgai</i>	2	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3	V
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	3	(*)
<i>Mycobacterium xenopi</i>	2	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	2	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	2	
<i>Neisseria meningitidis</i>	2	V
<i>Nocardia asteroides</i>	2	
<i>Nocardia brasiliensis</i>	2	
<i>Nocardia farcinica</i>	2	
<i>Nocardia nova</i>	2	
<i>Nocardia otitidiscavicularum</i>	2	
<i>Pasteurella multocida</i>	2	
<i>Pasteurella spp</i>	2	
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	2	
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	2	
<i>Porphyromonas spp</i>	2	
<i>Prevotella spp</i>	2	
<i>Proteus mirabilis</i>	2	
<i>Proteus penneri</i>	2	
<i>Proteus vulgaris</i>	2	
<i>Providencia alcalifaciens</i>	2	
<i>Providencia rettgeri</i>	2	
<i>Providencia spp</i>	2	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	
<i>Pseudomonas mallei</i>	3	
<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	3	
<i>Rhodococcus equi</i>	2	
<i>Rickettsia akari</i>	3	(*)
<i>Rickettsia canada</i>	3	(*)
<i>Rickettsia conorii</i>	3	
<i>Rickettsia montana</i>	3	(*)
<i>Rickettsia typhi</i> (<i>Rickettsia mooseri</i>).....	3	
<i>Rickettsia prowazekii</i>	3	
<i>Rickettsia rickettsii</i>	3	
<i>Rickettsia tsutsugamushi</i>	3	
<i>Rickettsia spp</i>	2	
<i>Rochalimaea quintana</i>	2	
<i>Salmonella arizonae</i>	2	
<i>Salmonella enteritidis</i>	2	
<i>Salmonella typhimurium</i>	2	

AGENT BIOLOGIQUE	CLASSIFICATION	SIGLES et symboles
<i>Salmonella paratyphi A, B, C</i>	2	V
<i>Salmonella typhi</i>	3	V (*)
<i>Salmonella</i> (autres variétés sérolo- giques).....	2	
<i>Serpulina spp</i>	2	
<i>Shigella boydii</i>	2	
<i>Shigella dysenteriae</i> (type 1).....	3	T (*)
<i>Shigella flexneri</i>	2	
<i>Shigella sonnei</i>	2	
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	2	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2	
<i>Streptococcus spp</i>	2	
<i>Treponema carateum</i>	2	
<i>Treponema pallidum</i>	2	
<i>Treponema pertenue</i>	2	
<i>Treponema spp</i>	2	
<i>Vibrio cholerae</i> (y inclus El Tor).....	2	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2	
<i>Vibrio spp</i>	2	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2	
<i>Yersinia pestis</i>	3	V
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	2	
<i>Yersinia spp</i>	2	

Tableau B

Les virus

AGENT BIOLOGIQUE	CLASSIFICATION	SIGLES et symboles
<i>Adenoviridae</i>	2	
<i>Adenoviridae</i> :		
Virus Junin.....	4	
Virus Lassa.....	4	
Virus de la chorioméningite lymphocy- taire (souches neurotropes).....	3	
Virus de la chorioméningite lymphocy- taire (autres souches).....	2	
Virus Machupo.....	4	
Virus Mopeia et virus du complexe Tacaribe.....	2	
<i>Astroviridae</i>	2	
<i>Bunyaviridae</i> :		
Virus Bunyamwera.....	2	
Virus Oropouche.....	3	
Virus de l'encéphalite de Californie.....	2	
Hantavirus :		
Hantaan (fièvre hémorragique avec syndrome rénal).....	3	
Virus Séoul.....	3	
Virus Puumala.....	2	
Virus Prospect Hill.....	2	
Autres Hantavirus.....	2	
Nairovirus :		
Virus de la fièvre hémorragique de Crimée/Congo.....	4	
Virus Hazara.....	2	
Phlébovirus :		
Fièvre de la vallée du Rift.....	3	V
Fièvre à phlébotomes.....	2	
Virus Toscana.....	2	
Autres Bunyavirus connus comme pathogènes.....	2	
<i>Caliciviridae</i> :		
Norwalk Virus.....	2	
Autres <i>Caliciviridae</i>	2	
<i>Coronaviridae</i>	2	
<i>Filoviridae</i> :		
Virus Ebola.....	4	

AGENT BIOLOGIQUE	CLASSIFICATION	SIGLES et symboles	AGENT BIOLOGIQUE	CLASSIFICATION	SIGLES et symboles
Virus de Marbourg.....	4		Orivirus.....	2	
Flaviviridae:			Reovirus.....	2	
Encéphalite d'Australie (encéphalite de la vallée de Murray).....	3		Retroviridae:		(g)
Encéphalite à tiques d'Europe centrale	3	V (*) (a)	Virus de l'immunodéficience humaine	3	
Absettarov.....	3	V (a)	Virus de leucémies humaines à cellules T (HTLV), types 1 et 2.....	3	
Hanzalova.....	3	V (a)	Rhabdoviridae:		
Hypr.....	3	V (a)	Virus de la rage.....	3	V (*)
Kumlinge.....	3	V (a)	Virus de la stomatite vésiculeuse.....	2	
Virus de la dengue, types 1-4.....	3		Togaviridae:		
Virus de l'hépatite C.....	3	(*)	Alphavirus:		
Encéphalite B japonaise.....	3	V	Encéphalomyélite équine Est-américaine.....	3	V
Maladie de la forêt de Kyasanur.....	3	V	Virus Bebaru.....	2	
Louping ill.....	3	(*)	Virus Chikungunya.....	3	(*)
Fièvre hémorragique d'Omsk.....	3	V	Virus Everglades.....	3	(*)
Powassan.....	3		Virus Mayaro.....	3	
Rocio.....	3		Virus Mucambo.....	3	(*)
Encéphalite verno-estivale russe.....	3	V (a)	Virus Ndumu.....	3	
Encéphalite de Saint-Louis.....	3		Virus O'nyong-nyong.....	2	
Wesselsbron.....	3	(*)	Virus de la rivière Ross.....	2	
West Nile.....	3		Virus de la forêt de Semliki.....	2	
Fièvre jaune.....	3	V	Virus Sindbis.....	2	
Autres Flavivirus connus pour être pathogènes.....	2		Virus Tonate.....	3	(*)
Hepadnaviridae:			Encéphalomyélite équine du Venezuela.....	3	V
Virus de l'hépatite B.....	3	V (*)	Encéphalomyélite équine Ouest-américaine.....	3	V
Virus de l'hépatite D (delta).....	3	V (*) (b)	Autres Alphavirus connus.....	2	
Herpesviridae:			Rubivirus (virus de la rubéole).....	2	V
Cytomégalovirus.....	2		Toroviridae.....	2	
Virus d'Epstein Barr.....	2		Virus non classés:		
Virus du cercopithèque type 1 (virus B du singe).....	3		Virus d'hépatites à transmission sanguine non encore identifiés.....	3	(*)
Virus de l'herpès humain, types 1 et 2	2		Virus de l'hépatite E.....	3	(*)
Varicellovirus.....	2		Agents non classiques associés avec les affections suivantes:		(h)
Virus lymphotrope B humain (HBLV-HHV 6).....	2		Maladie de Creutzfeldt-Jakob.....	3	(*)
Orthomyxoviridae:			Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker.....	3	(*)
Virus grippal (influenza) types A, B et C.....	2	V (c)	Kuru.....	3	(*)
Orthomyxoviridae transmis par les tiques: virus Dhori et Thogoto.....	2				
Papovaviridae:					
Birus BK et JC.....	2				
Papillomavirus humain.....	2				
Paramyxoviridae:					
Virus de la rougeole.....	2	V			
Virus des oreillons.....	2	V			
Virus de la maladie de Newcastle.....	2				
Virus parainfluenza, types 1 à 4.....	2				
Virus respiratoire syncytial.....	2				
Parvoviridae:					
Parvovirus humain (B 19).....	2				
Picornaviridae:					
Virus de la conjonctivite aiguë hémorragique (AHC).....	2				
Virus Coxsackie.....	2				
Virus Echo.....	2				
Virus de l'hépatite A (hépatovirus).....	2	V			
Virus poliomyélitique.....	2	V			
Rhinovirus.....	2				
Poxviridae:					
Virus de la variole du buffle.....	2	(d)			
Virus de la variole bovine.....	2				
Virus de la variole de l'éléphant.....	2	(e)			
Virus du nodule des trayeurs.....	2				
Virus du Molluscum contagiosum.....	2				
Virus de la variole du singe.....	3	V			
Virus Orf.....	2				
Virus de la variole du lapin.....	2	(f)			
Virus de la vaccine.....	2				
Virus de la variole (majeure et mineure).....	4	V			
Virus de la variole blanche.....	4	V			
Virus Tana et Yaba.....	2				
Reoviridae:					
Coltivirus.....	2				
Rotavirus humains.....	2				

Tableau C

Les parasites

AGENT BIOLOGIQUE	CLASSIFICATION	SIGLES et symboles
Acanthamoeba castellanii.....	2	
Ancylostoma duodenale.....	2	
Angiostrongylus cantonensis.....	2	
Angiostrongylus costaricensis.....	2	
Ascaris lumbricoides.....	2	A
Ascaris suum.....	2	A
Babesia divergens.....	2	
Babesia microti.....	2	
Balantidium coli.....	2	
Brugia malayi.....	2	
Brugia pahangi.....	2	
Capillaria philippinensis.....	2	
Capillaria spp.....	2	
Clonorchis sinensis.....	2	
Clonorchis viverrini.....	2	
Cryptosporidium parvum.....	2	
Cryptosporidium spp.....	2	
Dipetalonema streptocerca.....	2	
Diphyllobothrium latum.....	2	
Dracunculus medinensis.....	2	
Echinococcus granulosus.....	3	
Echinococcus multilocularis.....	3	
Echinococcus vogeli.....	3	

AGENT BIOLOGIQUE	CLASSIFICATION	SIGLES et symboles
<i>Entamoeba histolytica</i>	2	
<i>Fasciola gigantica</i>	2	
<i>Fasciola hepatica</i>	2	
<i>Fasciolopsis buski</i>	2	
<i>Giardia lamblia</i> (<i>Giardia intestinalis</i>)...	2	
<i>Hymenolepis diminuta</i>	2	
<i>Hymenolepis nana</i>	2	
<i>Leishmania brasiliensis</i>	3	
<i>Leishmania donovani</i>	3	
<i>Leishmania ethiopica</i>	2	
<i>Leishmania mexicana</i>	2	
<i>Leishmania peruviana</i>	2	
<i>Leishmania tropica</i>	2	
<i>Leishmania major</i>	2	
<i>Leishmania spp</i>	2	
<i>Loa loa</i>	2	
<i>Mansonella ozzardi</i>	2	
<i>Mansonella perstans</i>	2	
<i>Naegleria fowleri</i>	3	
<i>Necator americanus</i>	2	
<i>Onchocerca volvulus</i>	2	
<i>Opisthorchis felinus</i>	2	
<i>Opisthorchis spp</i>	2	
<i>Paragonimus westermani</i>	2	
<i>Plasmodium falciparum</i>	3	
<i>Plasmodium</i> (humain et simien) spp.....	2	
<i>Sarcocystis suihominis</i>	2	
<i>Schistosoma haematobium</i>	2	
<i>Schistosoma intercalatum</i>	2	
<i>Schistosoma japonicum</i>	2	
<i>Schistosoma mansoni</i>	2	
<i>Schistosoma mekongi</i>	2	
<i>Strongyloides stercoralis</i>	2	
<i>Strongyloides spp</i>	2	
<i>Taenia saginata</i>	2	
<i>Taenia solium</i>	3	
<i>Toxocara canis</i>	2	
<i>Toxoplasma gondii</i>	2	
<i>Trichinella spiralis</i>	2	
<i>Trichuris trichiura</i>	2	
<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	2	
<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	2	
<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	3	
<i>Trypanosoma cruzi</i>	3	
<i>Wuchereria bancrofti</i>	2	

Tableau D

Les champignons

AGENT BIOLOGIQUE	CLASSIFICATION	SIGLES et symboles
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	A
<i>Blastomyces dermatitidis</i> (<i>Ajiellomyces dermatitidis</i>).....	3	
<i>Candida albicans</i>	2	A
<i>Coccidioides immitis</i>	3	A
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i>).....	2	A
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>gattii</i> (<i>Filobasidiella bacillispora</i>).....	2	A
<i>Emmonsia parva</i> var. <i>parva</i>	2	
<i>Emmonsia parva</i> var. <i>crecens</i>	2	
<i>Epidermophyton floccosum</i>	2	A
<i>Fonsecaea compacta</i>	2	
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	2	
<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> (<i>Ajiellomyces capsulatus</i>).....	3	

AGENT BIOLOGIQUE	CLASSIFICATION	SIGLES et symboles
<i>Histoplasma capsulatum duboisii</i>	3	
<i>Madurella grisea</i>	2	
<i>Madurella mycetomatis</i>	2	
<i>Microsporium spp</i>	2	A
<i>Neotestudina rosatii</i>	2	
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	3	
<i>Penicillium marnettei</i>	2	A
<i>Sporothrix schenckii</i>	2	
<i>Trichophyton rubrum</i>	2	
<i>Trichophyton spp</i>	2	

PARTIE II

Lexique des sigles et symboles

A. - Lexique général

(*)	Accolé à certains agents biologiques pathogènes du groupe 3, cet astérisque indique qu'ils peuvent présenter un risque d'infection limité car ils ne sont normalement pas infectieux par l'air.
A	Agent biologique pathogène qui peut avoir des effets allergisants.
T	Agent biologique qui est susceptible de produire des toxines.
V	Un vaccin efficace est disponible.
spp	Cette mention (<i>species</i>) signifie qu'il est fait référence aux autres espèces qui sont connues pour être pathogènes chez l'homme.

B. - Lexique propre aux virus

(a)	Encéphalite à tiques.
(b)	La vaccination contre le virus de l'hépatite B protégera les travailleurs contre le virus de l'hépatite D (delta) dès lors qu'ils ne sont pas affectés par le virus de l'hépatite B.
(c)	Uniquement en ce qui concerne les types A et B.
(d)	Deux virus peuvent être identifiés sous cette rubrique, celui de la variole du buffle et une variante du virus de la vaccine.
(e)	Variante de la variole bovine.
(f)	Variante de la vaccine.
(g)	Il n'existe actuellement aucune preuve de maladie de l'homme par les rétrovirus d'origine simienne. Par mesure de précaution, un confinement de niveau 3 est recommandé pour les travaux exposant à ces derniers.
(h)	Bien qu'il n'y ait pas de preuve concernant l'existence chez l'homme d'infections dues aux agents responsables de l'encéphalite bovine spongiforme, le niveau de confinement 2 est recommandé comme mesure de protection pour les travaux en laboratoire.

Annexe 3 : Mode d'emploi du test PrimaTB StatPak® (Chembio diagnostic systems 2009)



CATALOG # 60-9620-0
5 Test Kit

3661 Horseblock Road
Medford, New York 11763
U.S. Veterinary License No. 645

Mycobacterium bovis – *Mycobacterium tuberculosis* Antibody Test Kit PrimaTB STAT-PAK® Assay

A Rapid Immunochromatographic Test for the Detection of Antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* in Macaque Serum, Plasma or Whole Blood

FOR *IN VITRO* VETERINARY DIAGNOSTIC USE
READ INSTRUCTIONS FOR USE CAREFULLY BEFORE PERFORMING TEST

INTENDED USE

The PrimaTB STAT-PAK Assay is a qualitative, single use, two-step, immunochromatographic screening test for the detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* in Macaque serum, plasma or whole blood. The test is used for the diagnosis of active tuberculosis (TB) in conjunction with other diagnostic methods.

If specific antibodies are present in the sample, the expected test result is reactive. A reactive result is suggestive of active TB. In the absence of antibodies, the expected test result is nonreactive.

SUMMARY AND EXPLANATION

TB is considered to be one of the most important bacterial diseases of macaques because of its frequency of occurrence, its ability to spread rapidly, its high fatality rate, and its zoonotic potential. TB in macaques is most often caused by the same organism that causes TB in humans – *M. tuberculosis* – and the disease spreads readily from simian to man and vice versa. The second most common type of TB in macaques, accounting for about 15% of cases, is due to *M. bovis* that is also transmissible to and from humans and/or other animals [1-5].

The present method of monitoring macaques for TB -the USDA-approved test for delayed hypersensitivity in response to an intradermal injection of mammalian tuberculin into the skin of the eyelid – has very serious shortcomings. While the incidence of false positives and false negatives varies from batch to batch of tuberculin, false results have tended to be a problem with all skin tests aimed at diagnosing simian TB [6, 7].

Serological methods constitute an attractive alternative, as they are simple, inexpensive, relatively non-invasive, and they do not depend on detection of mycobacteria. None of the existing TB tests alone is sufficient to diagnose disease. Therefore, new TB diagnostic algorithms are being developed, in which serological assays may play an important role (see PERFORMANCE CHARACTERISTICS below) [8-11].

The Chembio PrimaTB STAT-PAK Assay is a rapid immunochromatographic test for antibody detection that is safe, simple, and easy to perform.

PRINCIPLE OF TEST

The Chembio PrimaTB STAT-PAK Assay is based on immunochromatographic (lateral-flow) technology. The test employs a unique cocktail of recombinant *M. tuberculosis* proteins that are bound to the membrane solid phase. Blue latex particles conjugated with protein are used as the detection system. The PrimaTB STAT-PAK Assay can be used with serum, plasma or whole blood. Once a test sample is applied to the SAMPLE (S) well followed by the addition of a diluent, it flows laterally through the membrane strip. When it reaches the conjugate pad, antibodies, if present, bind to protein-latex conjugate and then the migrating immune complex binds to the antigens on the solid phase in the TEST (T) area producing a blue line. In the absence of antibodies there is no line in the TEST (T) area. The sample continues to migrate along the membrane and produces a blue line in the CONTROL (C) area demonstrating that the reagents are functioning properly.

MATERIALS PROVIDED

Each kit contains the following items:

- 5 PrimaTB STAT-PAK test devices
- 5 Disposable pipettes
- 1 Sample Diluent vial (5ml)
- 1 Product insert

Additional Material Required But Not Provided

- Clock, watch or other timing device
- Pipettor capable of delivering 30 µL
- Disposable gloves
- Sterile gauze (for fingerstick whole blood specimens)
- Sterile lancets (for fingerstick whole blood specimens)
- Antiseptic wipes
- Biohazard disposal container
- Collection devices for specimens (other than fingerstick whole blood specimens)

STORAGE AND STABILITY

The PrimaTB STAT-PAK Assay should be stored at 8 to 30°C in the original sealed pouch. The diluent should be stored in the original vial at 8 to 30°C. The kit is stable until the date imprinted on the box label and/or pouch.

NOTE: Do not use expired test kits.

CAUTION: Do not freeze test kits.

PRECAUTIONS

1. The test is designed FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE only. Use the test only in accordance with instructions supplied with the kit.
2. Handle all specimens as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen in the CDC-NIH manual, *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 4th ed., 1999*.
3. Use suitable protective clothing (gloves, lab coat, safety glasses) when handling samples or test devices after samples have been applied. Avoid any contact between hands, eyes, nose or mouth during specimen collection and testing.
4. Do not pipette any material by mouth. Do not smoke, eat or drink in areas where specimens or kit material are kept.
5. All testing should be performed at a temperature of 18 to 30°C.
6. After the completion of the assay, carefully dispose of materials treating them as biohazardous waste.
7. Do not use expired test kits. Do not freeze test kits.
8. Do not mix reagents from different kit lots.

SPECIMEN COLLECTION

The PrimaTB STAT-PAK Assay can be performed on whole blood, serum or plasma.

Whole Blood: Collect whole blood into tubes containing heparin or EDTA. Follow test procedure instructions. Optionally, fingerstick blood may be used via the disposable pipettes included with the test kit. If so, follow the sampling and sample application procedure for fingerstick specimens in the TEST PROCEDURE section.

Serum: Serum is used from whole blood collected aseptically by venipuncture into a clean tube without anticoagulant. Allow the blood to clot at room temperature, centrifuge at 2000 rpm for 10 minutes at room temperature, 18 to 30°C, and separate the serum from the clot.

Plasma: Collect whole blood with anticoagulant (heparin, EDTA or sodium citrate), centrifuge at 2000 rpm for 10 minutes at room temperature, 18 to 30°C, and isolate the plasma supernatant.

Samples perform best when tested immediately after collection. Specimens should be immediately refrigerated at 2 to 8°C following collection and can be used up to 3 days. If testing within 3 days is not possible, the specimens should be frozen at -20°C or colder until use. Avoid repeated freezing and thawing. **DO NOT FREEZE WHOLE BLOOD.**

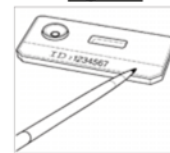
NOTE: If specimens are to be shipped, they should be packed in compliance with regulations covering the

transportation of etiologic agents. Venous whole blood, serum and plasma specimens should be shipped refrigerated with cold packs or wet ice.

TEST PROCEDURE

1. If test samples are refrigerated, remove them from the refrigerator and allow them to come to a temperature of 18 to 30°C before testing.
2. Remove the required number of PrimaTB STAT-PAK Assay devices from their pouches and place the devices on a flat surface area. It is not necessary to remove the desiccant from the package. **NOTE:** If desiccant packet is missing, **DO NOT USE**, discard the test device and a new test device should be used.
3. Label test units with sample names and/or identification numbers. (see Figure 1 below)

Figure 1



- 4a. **For Venous Whole Blood, Serum or Plasma:**
Using a laboratory pipette, obtain 30 µL of the specimen to be tested.
- 4b. **For Fingerstick Blood:**
Pipette Illustration

Air vent regulates volume



Fill line indicates total sample collected

Step 1: Prepare to perform the fingerstick blood collection procedure. Clean the finger with an antiseptic wipe. Allow the finger to dry thoroughly or wipe dry with a sterile gauze pad. Using a sterile lancet, puncture the skin just off the center of the finger and wipe away the first drop with sterile gauze. Avoid squeezing the fingertip to accelerate bleeding as this may dilute the blood with excess fluid. Collect the sample from the second drop as explained in Step 2.

Step 2: Once the drop of blood has formed on the finger, hold the tube horizontally and touch the tip of the pipette to the sample. Capillary action will draw the sample to the black fill line and stop. Test immediately.



CAUTION!
Filling is automatic.
Never squeeze the pipette while sampling.

- 5a. **For Venous Whole Blood, Serum or Plasma:**
Add the 30 µl of specimen onto the center of the SAMPLE (S) well. (See Figure 2 below)

Figure 2



- 5b. **For Fingertick Blood:**

Step 3: To expel the 30 µl sample, align the tip of the pipette with the sample well and squeeze the bulb.



ONLY IF THE SAMPLE DOES NOT COME OUT OF THE TUBE, hold the pipette vertically and slide the finger over the vent hole. Then align the tip with the sample well and squeeze the bulb.



6. Once the specimen has been applied to the SAMPLE (S) well, invert the diluent bottle and hold it vertically (not at an angle) over the SAMPLE well. Add the diluent slowly dropwise; add 3 drops (~100 µl) into SAMPLE (S) well. (See Figure 3)

Figure 3



7. Read results at 20 minutes after the addition of diluent. Do not read any results after 30 minutes. Refer to INTERPRETATION OF RESULTS section below.
8. Discard the used disposable pipette, test device and any other test materials into a biohazard waste container.

QUALITY CONTROL

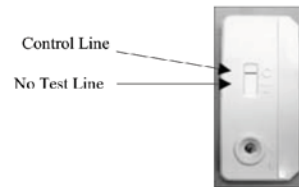
A blue colored line should always appear in CONTROL (C) area if the test has been performed correctly and the device is working properly. It serves as an internal test procedural control.

Good Laboratory Practice (GLP) recommends the use of control materials along with the test samples to ensure proper performance of the test kit. Positive and Negative serum or plasma based commercial controls should be used for this purpose. Use controls as per the TEST PROCEDURE instructions of this insert.

INTERPRETATION OF RESULTS

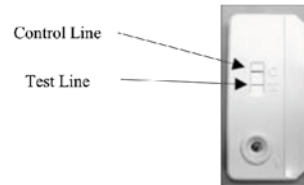
Nonreactive Result

One blue colored line in the CONTROL (C) area, with no visible colored line in the TEST (T) area indicates a nonreactive result. A nonreactive result at 20 minutes means that neither *Mycobacterium tuberculosis* nor *Mycobacterium bovis* antibodies were detected in the specimen. A nonreactive result does not preclude the possibility of TB infection.



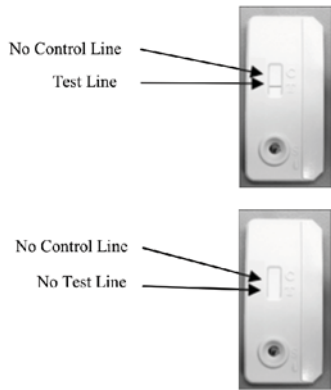
Reactive Result

Two blue lines - one in the TEST (T) area and one in the CONTROL (C) area - indicate a reactive result. Intensities of the TEST and CONTROL lines may vary. Even a very faint line in the TEST (T) area of the device within 20 minutes is indicative of a reactive result. A reactive result means that *Mycobacterium tuberculosis* and/or *Mycobacterium bovis* antibodies were detected in the specimen.



Invalid Results

A blue line should always appear in the CONTROL (C) area, whether or not a line appears in the TEST (T) area. If there is no distinct blue line in the CONTROL (C) area, the test is invalid and should be repeated using a new device.



LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. The assay is designed for detecting antibodies against *M. tuberculosis* and *M. bovis* only from macaque plasma, serum or whole blood. Any result from the testing of other body fluids or of pooled serum or plasma samples should not be used.
2. A reactive result suggests the presence of antibodies to *M. tuberculosis* and/or *M. bovis*.
3. For a reactive result, the intensity of the test line does not necessarily correlate with the titer of antibody in the specimen.
4. Reading nonreactive results earlier than 20 minutes or any results later than 30 minutes may yield erroneous results.
5. Do not use hemolyzed blood samples.
6. Be careful to add only 30 µL of specimen and 3 drops of diluent after applying the specimen to the SAMPLE (S) well.
7. Do not open the sealed test pouch until just prior to use.
8. Do not use kit contents beyond labeled expiration date.
9. Read results in a well-lit area.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Highly specific antibody binding proteins are used in the PrimaTB STAT-PAK Assay. The PrimaTB STAT-PAK Assay was compared to the standard USDA approved methods and the diagnostic performance was found to be superior.

Sensitivity and Specificity

Clinical trial studies were performed on 372 well-characterized samples to evaluate the PrimaTB STAT-PAK Assay. No cross-reactivity was found in Rhesus macaques experimentally infected with *M. avium* or *M. kansasii* (Table 2).

The sensitivity of the PrimaTB STAT-PAK was determined by testing 106 samples. Of these samples 92/106 samples were reactive by the Chembio PrimaTB STAT-PAK antibody test kit. The specificity of the PrimaTB STAT-PAK was determined by testing 266 samples. Of these samples 263/266 samples were nonreactive by the Chembio PrimaTB STAT-PAK antibody test kit.

Table 1. Diagnostic sensitivity of PrimaTB STAT-PAK

	Infection	Number of Positive Results
Rhesus macaque	<i>M. tuberculosis</i>	45/55
	<i>M. bovis</i>	13/13
Cynomolgus macaque	<i>M. tuberculosis</i>	15/16
	<i>M. bovis</i>	19/22
Total		92/106

Table 2. Diagnostic specificity of PrimaTB STAT-PAK

	Status	Number of Negative Results
Rhesus macaque	Normal	221/224
	Infection with <i>M. avium</i> or <i>M. kansasii</i>	6/6
Cynomolgus macaque	Normal	36/36
Total		263/266

REPRODUCIBILITY STUDIES

Reproducibility was tested at three independent laboratories using three serials of PrimaTB STAT-PAK Assay. A reference panel of 20 blinded samples representing negative, weakly reactive and reactive were tested 3 different times on 3 different days. The compiled results from the 3 laboratories demonstrated 98.3% accuracy.

REFERENCES

1. Bernacky B.J., Gibson S.V., Keeling M.E. and Abee C.R. (2002) Nonhuman primates, p.676-777 In J.G. Fox, L.C Anderson, F.M. Loew, and F.W. Quimby (ed.), *Laboratory Animal Medicine*, Second ed. Academic Press, San Diego, Calif.
2. CDC (1993) Tuberculosis in imported nonhuman primates – United States, June 1990-May 1993. *MMWR* 42:572-576.
3. Gibson, S.V. (1998) Bacterial and mycotic diseases, p.59-110. In C. R. A. B. Taylor Bennett, and R. Henrickson (ed.), *Non-human primates in biomedical research*. Academic Press, San Diego, Calif.
4. Kalter S.S., Millstein C.H., Boncyk L.H., and Cummins L.B. (1978) Tuberculosis in nonhuman primates as a threat to humans. *Dev. Biol. Stand.* 41:85-91.
5. Garcia M.A., Bouley D.M., Larson M.J., Lifland B., Moorhead R., Simkins M.D., Borie D.C., Tolwani R., and Otto G. (2004) Outbreak of *Mycobacterium bovis* in conditioned colony of rhesus (*Macaca mulatta*) and cynomolgus (*Macaca fascicularis*) macaques. *Comp. Med.* 54:578-584.
6. Kaufmann A.F. and Anderson D.C. (1978) Tuberculosis control in nonhuman primate colonies. In R.J. Montali, (ed), *Mycobacterial infections of zoo animals*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.
7. Walsh G.P., Tan E.C., Delacruz E.C., Abalos R.M., Villahermosa L.G., Young L.J., Cellova R.V., Nazareno J.B., and Horwitz M.A. (1996) The Philliphine cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) provides a new nonhuman primate model of tuberculosis that resembles human disease. *Nature Med.* 2:430-436.8.
8. Lyashchenko K., Colangeli R., Houde M., Jahdali H.A., Menzies D., and Gennaro M.L. (1998) Heterogenous antibody responses in tuberculosis. *Infect. Immun.* 66: 3936-3940.
9. Lyashchenko K.P., Singh M., Colangeli R., and Gennaro M.L. (2000) A multi-antigen print immunoassay for the serological diagnosis of infectious diseases. *J. Immunol. Methods* 242: 91-100.
10. Brusasca P.N., Peters R.L., Motzel S.L., Klein H.J., and Gennaro M.L. (2003) Antigen recognition by serum antibodies in non-human primates experimentally infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Comp. Med.* 53:165-172.
11. Lyashchenko K.P., Greenwald R., Esfandiari J., Greenwald D., Nancy C.A., Gibson S., et.al. (2007) PrimaTB STAT-PAK Assay, a Novel, Rapid Lateral-Flow Test for Tuberculosis in Nonhuman Primates. *Clin. Vaccine Immunol* 14:1158-1164.

FOR MORE INFORMATION, CONTACT:

CHEMBIO DIAGNOSTIC SYSTEMS, INC.
3661 HORSEBLOCK ROAD
MEDFORD, NY 11763 USA
U.S. Veterinary License No. 645
Tel : 1-800-327-3635
Tel: (631) 924-1135
Fax: (631) 924-6033
Email: info@chembio.com
Web Site: www.chembio.com

ORDERING INFORMATION

Cat #	Product
60-9620-0	PrimaTB STAT-PAK® 5 Test Kit
60-9622-0	PrimaTB STAT-PAK® 20 Test Kit
60-9623-0	PrimaTB STAT-PAK® 50 Test Kit



Antigens licensed from Statens Serum Institut
www.ssi.dk

**Annexe 4 : Bon de commande européen PrimaTB StatPak® (Zootest
2009)**

Bon de commande / zootest.com



Date : ___ / ___ / ___

	Ref	Prix net H.T Hors livraison	Quantité	Total
Commande Normale <small>Facturé et expédié par les USA</small>	PrimaTB STAT-PAK® 5	250 \$		
	PrimaTB STAT-PAK® 20	600 \$		
	PrimaTB STAT-PAK® 50	1000 \$		
	ElephantTB STAT-PAK® 5	250 \$		
	ElephantTB STAT-PAK® 20	600 \$		
	ElephantTB STAT-PAK® 50	1000 \$		
Commande Express <small>Facturé et expédié depuis la France</small>	PrimaTB STAT-PAK® 5	280 €		
	ElephantTB STAT-PAK® 5	280 €		
Test Unique	1 primate	80 €		
	1 Mammifère non primate	90 €		

Nom : _____

Vétérinaire Si non vétérinaire, nom du vétérinaire référent : _____

Institution : _____

Parc Zoologique Animalerie Laboratoire DDSV / DGAL

Adresse : _____

Ville : _____ Code Postal : _____

Tel : _____ Fax : _____

Email : _____

Espèces cibles pour les test commandés : _____

Signature :

Cachet :

▶ FAX : 01 48 83 08 55

Tél : + 33 (0) 1.48.85.10.96 Mobile : + 33 (0) 6.81.75.36.29 E-Mail : info@zootest.com Site : www.zootest.com

BIBLIOGRAPHIE

ACHA, P.N., SZYFRES, B.

Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux. Volume I : bactérioses et mycoses. 3^{ième} édition. Paris : Office international des épizooties, 2005. 378 p.

ACHA, P.N., SZYFRES, B.

Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux. Volume II : chlamydioses, rickettsioses et viroses. 3^{ième} édition. Paris : Office international des épizooties, 2005. 406 p.

ACHA PN, SZYFRES B.

Les yersiniose.

In : zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux. Paris : OIE, 1982, 132-137.

AFSSA, (page consultée le 24 novembre 2009). Site de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, [en ligne]. Adresse URL : <http://www.afssa.fr/index.htm>

ALEXANDER, K.A., PLEYDELL, E., WILLIAMS, M.C., LANE, E.P., NYANGE, J.F.C., MICHEL, A.L.

Mycobacterium tuberculosis: An Emerging Disease of Free-Ranging Wildlife.

Emerging Infectious Diseases, 2002, **8**, 6, 598-601.

ALFONSO, R., ROMERO, R.E., DIAZ, A., CALDERON, M.N, URDANETA, G. *et al.*

Isolation and identification of mycobacteria in New World primates maintained in captivity. *Vet. Microbiol.*, 2004, **98**, 285-295.

ALMEDA, M.F., MASSAD, E., AGUIAR E.A.C., MARTORELLI, L.F.A, JOPPERT, A.M.S.

Neutralizing Antirabies Antibodies in Urban Terrestrial Wildlife in Brazil

Journal of Wildlife Diseases, 2001, **37**, 2, 394–398.

AMADO, A., ALBUQUERQUE, T., GONCALVES, A., DUARTE, E., BOTELHO, A. *et al.*
Tuberculosis in mandrills at the Lisbon zoo.

Vet. Rec., 2006, **159**, 19, 643.

ANDERSON, D. C., R. B. SWENSON, J. L. ORKIN, *et al.*

Primary Herpesvirus simiae (B-virus) infection in infant macaques.

Lab Anim Sci, 1994, **44**, 5, 526-30.

BAKER, H.F., RIDLEY, R.M., WELLS, G.A.H.

Experimental transmission of BSE and scrapie to the common marmoset.

Vet. Rec., 1993, **132**, 403-406.

BATISTA-MORAIS, N., NEILSON-ROLIM, B., MATOS-CHAVES, H.H., BRITO-NETO, J., MARIA-DA-SILVA, L.

Rabies in Tamarins (*Callithrix jacchus*) in the State of Ceará, Brazil, a Distinct Viral Variant?
Mem Inst Oswaldo Cruz, 2000, **95**, 5, 609-610.

BENET, J.J.

La tuberculose, Polycopié des Unités de maladies contagieuses des Ecoles vétérinaires françaises. Mérial (Lyon), 2006. 74 p.

BENTE, D., GREN, J., STRONG, J.E., FELDMANN, H.

Disease modeling for Ebola and Marburg viruses.
Disease Models and Mechanisms, 2009, **2**, 12-17.

BONS, N., MESTRE-FRANCES, N., CHARNAY, Y., TAGLIAVNI, F.

Spontaneous spongiform encephalopathy in a young adult rhesus monkey.
The Lancet, 1996, 348, 435-438.

BONS, N., LEHMANN, S., NISHIDA, N., MESTRE-FRANCES, N., DORMONT, D., BELLI, P., DELACOURTE, A., GRASSI, J., BROWN, P.

BSE infection of the small short-lived primate *Microcebus murinus*
C. R. Biologies, 2002, 325, 67-74.

BORIO, L., INGLESBY, T., PETERS, C.J.

Hemorrhagic Fever Viruses as Biological Weapons: Medical and Public Health Management.
Journal of the American Medical Association, 2002, **287**, 2391-2405.

BOSSERS, A.

General introduction,

In prions diseases: susceptibility and transmissibility, in vivo and in vitro studies with sheep scrapie, 1999, chapter 1, 4-32.

BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNIC, M., DAVIS, R.W.

Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism.
Am. J. of Human Genet., 1980, **32**, 314-331.

BOUMANDOUKI, P., BILECKOT, R., IBARA, J.R., SATOUNKAZI, C., WASSA WASSA, D., LIBAMA, H., MOUDZEO, H., BOLANDA, J.D., NGOKABA, C.

Orthopoxvirose simienne (ou variole du singe) : étude de 8 cas observés à l'hôpital d'Impfondo de la République du Congo.
Bull Soc Pathol Exot, 2007, **100**, 1, 17-21.

BRACK, M.

Agents Transmissibles from Simians to Man. Germany : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1987. 454 p.

BURTON, J.E., OSHOTA, O.J., SILMAN, N.J.

Differential identification of *Bacillus anthracis* from environmental *Bacillus* species using microarray analysis.
Journal of Applied Microbiology, 2006, **101**, 754-763.

BUSHMITZ, M., LECU, A., MATZ-RENSING, K., PREUSSING, E., RENSING, S., VERECK, F.

Guidelines for the prevention and control of tuberculosis in non human primates. Recommendations of the European primate veterinary association working group on tuberculosis.

J. Med. Primatol., 2008, **38**, 1, 59-69.

CAPUANO, S.V., CROIX, D.A., PAWAR, S., ZINOVIK, A., MYERS, A. *et al.* Experimental *Mycobacterium tuberculosis* infection of *cynomoglus macaques* closely resembles the various manifestations of human *M.tuberculosis* infection.

Infect. Imm., 2003, **71**, 5831-5844.

CDC: Centers for disease Control and Prevention. (Page consultée le 2 mai 2010). "Monkeypox" [en ligne]. Adresse URL : <http://www.cdc.gov/ncidod/monkeypox/lab.htm>

CDC: Centers for disease Control and Prevention. (Page consultée le 16 décembre 2009). "Division of Tuberculosis Elimination", [en ligne]. Adresse URL : <http://www.cdcgov/tb/>

CENTRE D'ETUDE ET DE RECHERCHES VETERINAIRES ET AGROCHIMIQUES. (Page consultée le 7 avril 2010). Maladie d'Aujeszky, [en ligne]. Adresse URL : http://www.var.fgov.be/index.php?option=com_content&view=article&id=132&Itemid=226&lang=fr

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE. (Page consultée le 7 juillet 2009). La brucellose, [en ligne]. Adresse URL : <http://ethique.ipbs.fr/sdv/brucellose.pdf>

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE. (Page consultée le 10 juillet 2009). La fièvre charbonneuse, [en ligne]. Adresse URL : <http://ethique.ipbs.fr/sdv/fievrecharb.pdf>

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE. (Page consultée le 23 mars 2010). La fièvre hémorragique Crimée-Congo, [en ligne]. Adresse URL : <http://ethique.ipbs.fr/sdv/fievrehemocc.pdf>

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE. (Page consultée le 10 juillet 2009). La salmonellose, [en ligne]. Adresse URL : <http://ethique.ipbs.fr/sdv/salmonellose.pdf>

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE. (Page consultée le 10 juillet 2009). La tuberculose, [en ligne]. Adresse URL : <http://ethique.ipbs.fr/sdv/tuberculose.pdf>

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE. (Page consultée le 10 juillet 2009). La yersiniose, [en ligne]. Adresse URL : <http://ethique.ipbs.fr/sdv/yersiniose.pdf>

CHEMBIO DIAGNOSTIC SYSTEMS. (Page consultée le 9 janvier 2010). PrimaTB STAT-PAK, [en ligne]. Adresse URL : <http://www.chembio.com/animaltest6.html>

CHEMBIO DIAGNOSTIC SYSTEMS. (Page consultée le 17 juillet 2009). Antibody Test Kit PrimaTB STAT-PAK® Assay, [en ligne]. Adresse URL : <http://www.chembio.com/pdfs/10-6244-0%20PrimaTB%20PI%2020%20Rev%205.pdf>

CHEONG, H.I. *et al.*

Diagnosis of *Yersinia pseudotuberculosis* infection by polymerase chain reaction.
Pediatr. Infect. Dis. J., 1996, **15**, 596-9.

CHOMEL, B., LERCHE, N. (Page consultée le 25 avril 2010). Tuberculosis and other mycobacterial zoonoses, [en ligne]. Adresse URL : <http://faculty.vetmed.ucdavis.edu/zooprime-tuberculosis.pdf>

CRENN, L.

La pseudotuberculose à *Yersinia pseudotuberculosis* en parcs zoologiques.
Th.: Med. Vet. : Alfort : 2004. 144 p.

COULIBALY, C., HACK, R., SEIDL, J., *et al.*

A natural asymptomatic herpes B virus infection in a colony of laboratory brown capuchin monkeys (*Cebus apella*).
Lab Anim, 2004, **38**, 4, 432-438.

COUSINS, D., FLORISSON, N.

A review of tests available or use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species.
Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz., 2005, **24**, 3, 1039-1059.

COUTROT, L.

Herpès virose B : gestion du risque infectieux chez le macaque et l'homme.
Th.: Med. Vet. : Toulouse: 2006; 2006 – TOU 3 – 4065. 234 p.

COUTROT, E., BLANCHER-SARDOU, M., MARCHOU, B., APOIL, P-A., DUCOS DE LAHITTE, J., BLANCHER, A.

Place du diagnostic biologique de l'herpès virose B (cehv1) chez le macaque dans la gestion du risque de transmission à l'homme.
Revue Méd. Vét., 2007, **158**, 7, 367-379.

DANIEL, M. D., GARCIA, F.G., MELENDEZ, L.V., *et al.*

Multiple Herpesvirus simiae isolation from a rhesus monkey which died of cerebral infarction.
Lab Anim Sci, 1975, **25**, 3, 303-308.

DELNATTE, P.

Etude de la tuberculose chez l'éléphant : importance en parc zoologique.
Th.: Med. Vet. : Toulouse: 2008 – TOU 3 – 4014. 232 p.

DENIS F., MARTIN C.

Mycobactéries.
Bactériologie médicale : techniques usuelles. Masson, 2007, **34**, 467-488.

DENIS, F., PERRONNE, C.

Mycobacterium tuberculosis et mycobactéries atypiques. Elsevier Masson, 2004, 298p.

DORMONT, D.

Encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles ou maladies à prions
EMC-Maladies Infectieuses, 2004, **1**, 99-127.

ECKROADE, R.J., ZU RHEIM G.M., MARSH, R.F., HANSON, R.P.
Transmissible mink encephalopathy : expérimental transmission to the squirrel Monkey.
Science, 1970, **169**, 1088-1090.

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON. (Page consultée le 10 décembre 2009).
La maladie d'Aujeszky dans la faune sauvage, [en ligne]. Adress URL : http://www2.vet-lyon.fr/ens/faune/Fiches/pdf/fiche_maladie_Aujeszky.pdf

EUZEBY, J.P., (Page consultée le 26 octobre 2009), Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, [en ligne].
Adresse URL : <http://www.bacteriologie.net/generale/annexesystematique.html>

FAVORETTO, S.R., MATTOS, C.C., MORAIS, N.B., ALVES ARAUJO, F.A., MATTOS, C.A.
Rabies in Marmosets (*Callithrix jacchus*), Ceará, Brazil.
Emerging Infectious Diseases, November-December 2001, **7**, 6, 1062-1065.

FELLOWS, P.F., LINSKOTT, M.K., IVINS, B.E., PITT, M.L., ROSSI, C.A., GIBBS, P.H.,
FRIEDLANDER, A.M.
Efficacy of a human anthrax vaccine in guinea pigs, rabbits, and rhesus macaques against
challenge by *Bacillus anthracis* isolates of diverse geographical origin.
Vaccine, 2001, **19**, 3241–3247.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M., NAGLIC, T., TURK, N., SEOL, B., GRABAREVIC, Z.,
BATA, I., PERKOVIC, D., STOLLE, A.
Yersiniosis in zoo marmosets (*Callitrix jacchus*) caused by *Yersinia enterocolitica* 4/O:3
Veterinary Microbiology, 2007, 121, 363–367.

FOWLER, M.E.; MILLER, R.E.
Zoo and wild animal medicine. 5ième édition.
Missouri: Elsevier Science, 2003. 782 p.

GANIERE, J.-P. *et al.*
La brucellose animale, Polycopié des Unités de maladies contagieuses des Ecoles vétérinaires
françaises. Merial (Lyon), 2006. 46 p.

GAJDUSEK, D.C., GIBBS, C.J., ALPERS, M.
Experiemntal transmission of a Kura-like synfrome to chimpanzés.
Nature, 1966, **209**, 794-796.

GADJUSEK, D.C., GIBBS, C.J., ASHER, D.M., DAVID, E.
Transmission of expérimental kuru to the spider monkey.
Science, 1968, **162**, 693-694.

GIBBS, C.J., GAJDUSEK, D.C., ASHER, D.M., ALPERS, M.P., BECK, E., DANIEL, P.M.,
MATTHEWS, W.B.
Creutzfeldt-Jacob disease (spongiform encephalopathy) : transmission to the chimpanzee.
Science, 1968, **161**, 388-389.

GIBBS, J.C.

Experimental subacute spongiform virus encéphalopathies in primates and her other laboratory animals.

Science, 1973, **182**, 67-68.

GEORGES, A.J., GEORGES-COURBOT, M.C.

Fièvres hémorragiques virales: historique et enseignements des quarante dernières années.

Méd. Trop, 2000, **60**, 5-19.

GOMEZ, M.C., NIETO, J.A., ROSA, C., GEIJO, P., ESCRIBANO, M.A., MUNOZ, A., LOPEZ, C.

Evaluation of Seven Tests for Diagnosis of Human Brucellosis in an Area Where the Disease Is Endemic.

Clinical and vaccine immunology, Juin 2008, **15**, 6, 1031-1033.

GOSZTONYI, G., D. FALKE and H. LUDWIG

Axonal-transsynaptic spread as the basic pathogenetic mechanism in B virus infection of the nervous system.

J Med Primatol, 1992, **21**, 1, 42-3.

HADJINICOLAOU, A.V., DEMETRIOU, V.L., HEZKA, J., BEYER, W., HADFIELD, T.L., KOSTRIKIS, L.G.

Use of molecular beacons and multi-allelic real-time PCR for detection of and discrimination between virulent *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* isolates.

Journal of Microbiological Methods, 2009, **78**, 45–53.

HINIE, V., BRODARD, I., THOMANN, A., HOLUB, M., MISEREZ, R., ABRIL, C.

IS711-based real-time PCR assay as a tool for detection of *Brucella* spp. in wild boars and comparison with bacterial isolation and serology.

BMC Veterinary Research, 2009, **5**:22.

HIRANO, M., NAKAMURA, S., OKADA, M., *et al.*

Rapid discrimination of monkey B virus from human herpes simplex viruses by PCR in the presence of betaine.

J Clin Microbiol, 2000, **38**, 3, 1255-7.

HIRANO, M., NAKAMURA, S, MITSUNAGA, F., *et al.*

Efficacy of a B virus gD DNA vaccine for induction of humoral and cellular immune responses in Japanese macaques.

Vaccine, 2002, **20**, 19-20, 2523-32.

HOCHREIN, H., B. SCHLATTER, M. O'KEEFFE, *et al.*

Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways.

Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, **101**, 31, 11416-21.

HUFF, J. L., EBERLE, R., CAPITANIO, J., *et al.*

Differential detection of B virus and rhesus cytomegalovirus in rhesus macaques.

J Gen Virol, 2003, **84**, Pt 1, 83-92.

IVINS, B.E., FELLOWS, P.F., PITT, M.L.M., ESTEP, J.E., WELKOS, S.L., WORSHAM, P.L., FRIEDLANDER, A.M.

Efficacy of a standard human anthrax vaccine against *Bacillus anthracis* aerosol spore challenge in rhesus macaques.

Salisbury Med. Bull., 1996, **87**, 125–126.

IVINS, B.E., PITT, M.L., FELLOWS, P.F., FARCHAUS, J.W., BENNER, G.E., WAAG, D.M., LITTLE, S.F., ANDERSON Jr, G.W., GIBBS, P.H., FRIEDLANDER, A.M.

Comparative efficacy of experimental anthrax vaccine candidates against inhalation anthrax in rhesus macaques.

Vaccine, 1998, **16**, 1141–1148.

JARLAUD, F.

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles: étude de la maladie des espèces autres que ruminants, de la transmission et de la notion de barrière d'espèce.

Th.: Med. Vet. : Lyon: 2002; n°32. 134 p.

KAANDORP, J.

Transmissible diseases handbook. 2nd Edition. Houten : EAZWV publications, Mai 2004. 662 p.

KAGEYAMA, T. *et al.*

Yersinia pseudotuberculosis infection in breeding monkeys :detection and analysis of strain diversity by PCR.

J. Med. Primatol., 2002, **31**, 129-135.

KALTER, S.S., KUNTZ, R.E, ALDOORY, Y, KATZBERG, A.A.

Collection of biomedical study materials from baboons in East Africa ; Preliminary report.

Laboratory animal care, 1967, **16**, 161-177.

KEEBLE, S. A.

B virus infection in monkeys.

Ann N Y Acad Sci, 1960, **85**, 960-9.

KEET, D.F., KRIEF, N.P., BENGIS, R.G., GROBLER, D.G., MICHEL, A.

The rise and fall of tuberculosis in a free-ranging chacma baboon troop in the Kruger National Park.

J. Vet. Res. 2000, **67**, 2, 115-122.

KIM, K., SEO, J., WHEELER, K., PARK, C., KIM, D., PARK, S., KIM, W., CHUNG, S.I., LEIGHTON, T.

Rapid genotypic detection of *Bacillus anthracis* and the *Bacillus cereus* group by multiplex real-time PCR melting curve analysis

FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2005, **43**, 301–310.

KITTELBERGER, R., REICHEL, M.P., JOYCE, M.A., STAAK, C.

Serological crossreactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 0:9

III. Specificity of the in vitro antigen-specific gamma interferon test for bovine brucellosis diagnosis in experimentally *Yersinia enterocolitica* 0: 9-infected cattle.

Veterinary microbiology, 1997, **57**, 361-371.

KRAUSS, H., WEBER, A., APPEL, M., ENDERS, B., ISENBERG, H.D., SCHIEFER, H.G., SLENCZKA, W., VON GRAEVENITZ, A., ZAHNER, H.
Zoonoses. Infectious Diseases Transmissible from Animals to Humans. 3rd édition. Canada: ASM Press, 2003. 456 p.

KRECH, U., LEWIS, L.
Propagation of B-virus in tissue cultures.
Proc Soc Exp Biol Med., 1954, **87**, 1, 174-8.

LECU, A., RIQUELME, L.
Evolution des outils diagnostiques de la tuberculose des espèces animales sauvages.
Bull. Acad. Vét. France, 2008, **161**, 2, 151-157.

LEES, D. N., BASKERVILLE, A., CROPPER, L.M, *et al.*
Herpesvirus simiae (B virus) antibody response and virus shedding in experimental primary infection of cynomolgus monkeys.
Lab Anim Sci, 1991, **41**, 4, 360-4.

LEFFEL, E.K., TWENHAFEL, N.A., WHITEHOUSE, C.A.
Nosocomial infection of *Serratia marcescens* may induce a protective effect in monkeys exposed to *Bacillus anthracis*.
Journal of Infection, 2008, **57**, 162-164.

LE GUENNO, B.
Le virus Ebola
Bull. Soc. Microbiol., 1995, 10 (HS).

LE PORTAIL DE LA SCIENCE. (Page consultée le 25 mars 2010). Site du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, [en ligne]. Adresse URL : <http://www.science.gouv.fr/fr/dossiers/bdd/res/2656/le-reservoir-du-virus-de-marburg-identifie-chez-la-roussette-d-egypte/>

LITTLE, S.F., IVINS, B.E.
Molecular pathogenesis of *Bacillus anthracis* infection.
Microbes and Infection, 1999, 2, 131-139.

LODDE, S.
Transmission des zoonoses chez les primates.
Th.: Med. Vet. : Toulouse: 1998; n°98-TOU3-4051. 582 p.

LOOMIS, M. R., O'NEILL, T., BUSH, M., *et al.*
Fatal herpesvirus infection in patas monkeys and a black and white colobus monkey.
J Am Vet Med Assoc, 1981, **179**, 11, 1236-9.

LOOMIS-HUFF, J. E., EBERLE, R., LOCKRIDGE, K.M., *et al.*
Immunogenicity of a DNA vaccine against herpes B virus in mice and rhesus macaques.
Vaccine, 2001, **19**, 32, 4865-73.

LUND, J., SATO, A., AKIRA, S., *et al.*

Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells.

J Exp Med, 2003, **198**, 3, 513-20.

LYASHCHENKO, K.P., SINGH, M., COLANGELI, R., GENNARO, M.C.

A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases.

J. Immunol., 2000, **242**,1, 91-100.

MANTECON, M., GUTIERREZ, M., ZARZOSA, M., FERNANDEZ-LAGO, L., DIOS COLMENERO, J., VIZCAINO, N., BRATOS, M.A., ALMARZAZ, A., CUBERO, A., MUNOZ, M., TORRES, A.R., ORDUNA, A.

Influence of brucellosis history on serological diagnosis and evolution of patients with acute brucellosis.

Journal of Infection, 2008, **57**, 397-403.

MÉDOCOPÉDIA. (Page consultée le 10 avril 2010). La rage, [en ligne]. Adresse URL : <http://www.medicopedia.net/term/19954,1,xhtml>

MENSE, M.G., BORSCHER, R.H., WILHELMSSEN, C.L., PITT, M.L., HOOVER, D.L.

Pathologic changes associated with brucellosis experimentally induced by aerosol exposure in rhesus macaques (*Macaca mulatta*).

AJVR, Mai 2004, **65**, 5, 644-652.

MEYER, H., PFEFFER M., RZIHA H.-J.

Sequence alterations within and downstream of the A-type inclusion protein genes allow differentiation of *Orthopoxvirus* species by polymerase chain reaction.

J. Gen. Virol., 1994, **75**, 1975-1981.

MICHEL, AL., VENTER, L., ESPIE, IW., COETZEE, M.L.

Mycobacterium tuberculosis infections in eight species at the National Zoological Gardens of South Africa, 1991-2001.

J. Zoo. Wildlife Med., 2003, **34**, 4, 364-370.

MITKA, S., ANETAKIS, C., SOULIOU, E., DIZA, E., KANSOUZIDIOU, A.

Evaluation of different PCR assays for early detection of acute and relapsing brucellosis in humans in comparison with conventional methods.

Journal of Clinical Microbiology, Avril 2007, **45**, 4, 1211-1218.

MOISSON P.

Classification et protection des primates.

Cours optionnel de primatologie, T1 pro ENVT, 2005.

MONTALI, R., MIKOTA, S., CHENG, L.

M.tuberculosis in zoo and wildlife species.

Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 2001, **20**,1, 291-299.

- MULLER, J.D. et al
Specificity of an immunochromatographic test for anthrax
Australian Veterinary Journal, 2004, **82**, 220–222.
- OCHOLI, R.A., ENURAH, L.H., ODEYEMLE, P.S.
Fatal Case of Salmonellosis (*Salmonella pullorum*) in a Chimpanzee (*Pan troglodytes*) in the Jos Zoo.
Journal of Wildlife Diseases, 1987, 23, 4, 669-670.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES
Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines. 4ième Edition. Paris: OIE, 2000. 957 p.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. (Page consultée le 9 mars 2010). Site de l'Office International des Epizooties, [en ligne]. Adresse URL : http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/F_summry.htm
- OHSAWA, K., LEHENBAUER, T.W., EBERLE, R.
Herpesvirus papio 2: alternative antigen for use in monkey B virus diagnostic assays.
Lab Anim Sci, 1999, **49**, 6, 605-16.
- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE. (Page consultée le 28 mars 2010). Site de la Fièvre jaune: vaccins et produits biologiques, maladies transmissibles surveillance et action, [en ligne]. Adresse URL : <http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF/www9854.pdf>
- PARTHASARATHY, N., SAKSENA, R., KOVAC, P., DESHAZER, D., PEACOCK, S.J., WUTHIEKANUN, V., HEINE, H.S., FRIEDLANDER, A.M., COTE, C.K., WELKOS, S.L., ADAMOVICZ, J.J., BAVARI, S., WAAG, D.M.
Application of carbohydrate microarray technology for the detection of Burkholderia pseudomallei, Bacillus anthracis and Francisella tularensis antibodies.
Carbohydrate Research, 2008, **343**, 2783–2788.
- PERELYGINA, L., L. ZHU, H. ZURKUHLLEN, *et al.*
Complete sequence and comparative analysis of the genome of herpes B virus (Cercopithecine herpesvirus 1) from a rhesus monkey.
J Virol, 2003, **77**, 11, 6167-77.
- PERELYGINA L., PATRUSHEVA I., HOMBAIAH S., ZURKUHLLEN, H., WILDES M.J., PATRUSHEV N., HILLIARD J.
Production of herpes B virus recombinant glycoproteins and evaluation of their diagnostic potential.
J. Clin. Microbiol., 2005, **43**, 2, 620-628.
- PHIPPS, A.J., PREMANANDAN, C., BARNAWALL, R.E, LAIRMOREL, M.D.
Rabbit and nonhuman primate models of toxin-targeting human anthrax vaccines.
Microbiology and molecular biology reviews, 2004, **68**, 617–629.
- RICCIARDI, I.D., NUNES, M.P., ANDRADE, C.M., DA SILVA, A.G.
Anti-brucella agglutinins in bats and “Callithrix” monkeys.
Journal of wildlife diseases, 1976, **12**, 52-54.

RIQUELME, L.

La tuberculose chez les espèces sauvages de zoo : utilisation du dosage de l'interféron gamma pour le diagnostic.

Th. : Med.vet. : Alfort : 2009. 242 p.

ROZENBERG, F.

Herpes simplex virus infection: host-virus interaction.

Pathol Biol (Paris), 2002, **50**, 7, 414-8.

SABIN, A. B. A. W., W. M.

Acute ascending myelitis following a monkey bite, with isolation of a virus capable of reproducing the disease.

J Exp Med, 1934, **59**, 115-136.

SAPOLSKY, R.M., ELSE, J.G.

Bovine tuberculosis in a wild baboon population : epidemiological aspects.

J. Med. Primatol., 1987, **16**, 4, 229-35.

SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N.E., WHATMORE, A.M., QUANCE, C.R., KOYLASS, M.S., CUMMINS, L.B., DICK JR, E.J., SNIDER, C.L., CAPPELLI, D., EBERSOLE, J.L., NATHANIELSZ, P.W., HUBBARD, G.B.

A novel Brucella isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates – first report.

J Med Primatol, 2009, **38**, 70–73.

SETTER, M.D., MIKOTA, S.K., GUTTER, A.F., MONTERROSO, E.R. *et al.*

Epizootic of *Mycobacterium bovis* in a zoologic park.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 1995, **207**, 12, 1618-1621.

SIMON, M. A., DANIEL, M.D., LEE-PARRITZ, D., *et al.*

Disseminated B virus infection in a cynomolgus monkey.

Lab Anim Sci, 1993, **43**, 6, 545-50.

SMITH, A. L., D. H. BLACK and R. EBERLE

Molecular evidence for distinct genotypes of monkey B virus (herpesvirus simiae) which are related to the macaque host species.

J Virol, 1998, **72**, 11, 9224-32.

SOHNI, Y., KANJILAL, S., KAPUR, V.

Cloning and development of synthetic internal amplification control for Bacillus anthracis real-time polymerase chain reaction assays.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2008, **61**, 471-475.

STERNE, M.

The effect of different carbon dioxide concentrations on the growth of virulent anthrax strains.

Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind., 1937, **9**, 49-67.

- TAKANO, J., T. NARITA, K. FUJIMOTO, *et al.*
 Detection of B virus infection in cynomolgus monkeys by ELISA using simian agent 8 as alternative antigen.
Exp Anim, 2001, **50**, 4, 345-7.
- TARARA, R., SULEMAN, M.A., SAPOISKY, R., WABOMBA, M.J., ELSE, J.G.
 Tuberculosis in wild olive baboons, *Papio cynocephalus anubis* (lesson), in Kenya.
Journal of wildlife diseases, 1985, **21**, 2, 137-140.
- TERRIER, M.E., VAISSAIRE, J. (Page consultée le 20 janvier 2010). La fièvre charbonneuse quelques rappels, [en ligne]. Adresse URL : http://www.oncfs.gouv.fr/events/point_faune/suivisanitaire/2005/La_fievre_charbonneuse.pdf
- THOEN, C.O., RICHARD, W.D., JARNAGIN, J.L.
 Mycobacteria isolated from exotic animals.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 1977, **170**, 9, 987-990.
- THOMPSON, S. A., HILLIARD, J.K., KITTEL, D., *et al.*
 Retrospective analysis of an outbreak of B virus infection in a colony of DeBrazza's monkeys (*Cercopithecus neglectus*).
Comp Med, 2000, **50**, 6, 649-57.
- THOREL, M.F., KAROUI, C., VARNEROT, A., FLEURY, C. *et al.*
 Isolation of *Mycobacterium bovis* from baboons, leopards and a sea lion.
Vet. Res. 1998, **29**, 2, 207-212.
- TOMA, B *et al.*
 Les zoonoses infectieuses, Polycopié des Unités de maladies contagieuses des Ecoles vétérinaires françaises. Mérial (Lyon), 2006. 171 p.
- TOMA, B. (Page consultée le 8 avril 2010). La maladie d'Aujeszky, [en ligne]. Adresse URL : http://agriculture.gouv.fr/guide_epizooties/monographies/f-ma.htm
- U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES
 Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5ième édition. Washington: US Government Printing Office, février 2007. 413 p.
- VIZOSO, A. D.
 Recovery of herpes simiae (B virus) from both primary and latent infections in rhesus monkeys.
Br J Exp Pathol, 1975, **56**, 6, 485-8.
- WEIGLER, B. J.
 Biology of B virus in macaque and human hosts: a review.
Clin Infect Dis, 1992, **14**, 2, 555-67.
- WEIGLER, B. J., F. SCINICARIELLO, F., HILLIARD, J.K.
 Risk of venereal B virus (cercopithecine herpesvirus 1) transmission in rhesus monkeys using molecular epidemiology.
J Infect Dis, 1995, **171**, 5, 1139-43.

VERVENNE, R., JONES, S., VAN SOOLINGEN, D., LAAN, T., ANDERSEN, P. *et al.*
Tuberculosis diagnosis in non-human primates: comparaison of two interferon gamma and the skin for identification of *M. tuberculosis* infection.
Vet. Immunol. Immunopathol., 2004, **100**, 61-71.

WIKIPEDIA (Page consultée le 25 mars 2010). *Bacillus anthracis*, [en ligne]. Adresse URL: http://fr.wikipedia.org/wiki/Bacillus_anthraxis

WIKIPEDIA (Page consultée le 25 mars 2010). Ebolavirus, [en ligne]. Adresse URL: <http://fr.wikipedia.org/wiki/Ebolavirus>

WIKIPEDIA (Page consultée le 25 mars 2010). Virus Marburg, [en ligne]. Adresse URL: http://fr.wikipedia.org/wiki/Virus_Marburg

WILSON, L.G.

The historical decline of tuberculosis in Europe and America: its causes and significance.
J. Hist. Med. All. Sci., 1990, **45**, 366-396.

WORLD HEALTH ORGANIZATION

Anthrax in humans and animals. 4ième édition. China : WHO Press, 2008. 217 p.

ZELLER, H.

Les Fièvres Hémorragiques Virales : précautions et diagnostic de laboratoire.
Revue Française des Laboratoires, Mars/Avril 2000, **321**, 47-50.

ZHU, C., DENG, X., SHI, F.

Rapid detection of *Brucella abortus* by a novel proximity ligation-based loop-mediated isothermal amplification method.
Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology, 2009, **17**, 154–163.

ZOOTEST, (Page consultée le 17 juillet 2009). Dépistages sérologiques de la tuberculose, [en ligne]. Adresse URL: <http://www.vetosphere.com/zootest/index.html>

ZWARTOUW, H. T., BOULTER, A

Excretion of B virus in monkeys and evidence of genital infection.
Lab Anim, 1984, **18**, 1, 65-70.

Toulouse, 25 Juin 2010

NOM : MOLTO

Prénom : Nelly

TITRE : LES MALADIES RÉGLEMENTÉES CHEZ LES PRIMATES

RÉSUMÉ : Le terme de Primates Non Humains (PNH) regroupe près de 290 espèces de taille, de mœurs et caractéristiques très variées. Cette thèse établit de manière précise la liste des MRC, MDO et maladies réglementées l'importation concernant les PNH. Chacune des maladies est traitée sur le même modèle : description de l'agent pathogène, épidémiologie, expression clinique, méthodes diagnostiques, réglementation sanitaire, prophylaxie traitement.

Ainsi certains défauts ont pu être mis en évidence dans les techniques de dépistage, souvent peu adaptées aux espèces sauvages et notamment les PNH. Il paraît essentiel également d'attirer l'attention sur un certain nombre de difficultés concernant la conduite à tenir en cas de découverte d'un animal positif. En effet, très souvent les textes ne dictent aucune mesure de police sanitaire à suivre dans la cas d'espèces sauvages. Beaucoup de progrès restent donc à faire afin de garantir l'état sanitaire des animaux.

MOTS-CLÉS : PRIMATES NON HUMAINS, RÉGLEMENTATION, BRUCELLOSE, FIÈVRE CHARBONNEUSE, FIÈVRES HÉMORRAGIQUES SIMIENNES, RAGE, MALADIE D'AUIESZKY, HERPÈS B, TUBERCULOSE, VARIOLE DU SINGE, ESST, ENTÉROBACTÉRIES PATHOGÈNES.

ENGLISH TITLE : REGULATED DISEASES IN PRIMATES

ABSTRACT : Non-Human Primates (NHP) include 290 species of very varied sizes, habits and characteristics. This study accurately establishes the list of the contagious diseases, the notifiable diseases and the regulated diseases for import of NHP. Each disease is described on the same model: information on the pathogenic agent, epidemiology, clinical expression, diagnostic methods, regulation, disease prevention and treatment.

Screening techniques showed weaknesses as they are often ill-adapted to wild species, especially to NHP. It seems essential to draw the attention to several difficulties met in order to give an appropriate response when a positive animal is identified. Indeed, official documents often fail to give precise sanitary policy guidelines for wild species. Much progress remains to be made to guarantee the health status of animals.

KEYWORDS : NHP, REGULATION, BRUCELLOSIS, ANTHRAX, SIMIAN HEMORRHAGIC FEVER, RABIES, AUJESZKY'S DISEASE, HERPES B, TUBERCULOSIS, MONKEYPOX, TRANSMISSIBLE SUBACUTE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHIES, PATHOGENIC ENTEROBACTERIA.