

Appui scientifique et technique relatif à la définition d'un programme d'estimation de la prévalence des cas d'EST ESB like chez les ovins (saisine 2005-SA-0227)

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments s'est auto-saisie le 17/05/2005 sur la question de l'échantillonnage et des modalités pratiques de mise en œuvre d'un dépistage raisonné des ESST chez les ovins. Cette réflexion s'inscrit dans la continuité de l'analyse qui avait été conduite par le Comité d'experts spécialisés « ESST » en mars 2005¹. L'Afssa considère en effet que sur le fondement des pistes fournis dans l'avis du Comité, des propositions graduées concernant un échantillonnage optimal et bien ciblé serait de nature à affiner l'approche actuelle.

Le CES « ESST » saisi par l'Afssa a donc sollicité le Groupe de Travail « Epidémiologie des ESST animales » et rend le rapport suivant.

¹ Avis du CES « ESST » en date du 24 mars 2005 sur « l'analyse des risques liés aux encéphalopathies spongiformes transmissibles dans les filières petits ruminants, les forces et faiblesses du dispositif actuel et les possibilités d'évolution (actualisation en mars 2005 de l'avis de décembre 2001) ».

Evaluation de la présence de formes d'EST *ESB like* dans le cheptel ovin français

Dans l'objectif de contribuer à l'analyse du risque pour la santé publique humaine, lié à l'existence potentielle de cas d'ESB dans le cheptel ovin français, la présente analyse vise à définir le rationnel d'un programme d'estimation de la borne supérieure de l'intervalle de confiance de la prévalence des cas d'EST *ESB like* chez les ovins, sous l'hypothèse d'une prévalence nulle². Si des cas *ESB like* venaient à être détectés, le programme fournirait alors un intervalle de confiance de la prévalence de ces cas. Par ailleurs, dans cette éventualité et s'il était trouvé plusieurs animaux positifs dans un même troupeau, le rationnel de l'étude serait à revoir concernant l'estimation de la prévalence, car ces animaux ne seraient pas indépendants, ayant pu être contaminés par la même source ou par contagion au sein du troupeau auquel ils appartiennent. L'étude de la proportion de cheptels atteints pourrait alors être envisagée.

Sont ensuite abordées les modalités pratiques de mise en œuvre d'un tel programme, cruciales pour garantir la qualité des informations produites. Sont enfin étudiées les conditions dans lesquelles ce programme pourrait répondre aux objectifs complémentaires d'estimation de la prévalence des EST dans la population ovine et d'estimation de la structure génotypique de cette population.

1. Analyse des connaissances actuelles

- **Analyse des données de surveillance active chez les ovins depuis 2002**

	2002	2003	2004*
Abattoir	31/33 764 0.92 ‰	45/ 44 408 1.02 ‰	13/ 12 240 1.04 ‰
Equarrissage	121/ 17 434 6.94 ‰	33/ 18 674 1.77 ‰	26/ 12 307 2.11 ‰
Rapport de prévalence Equarrissage/Abattoir	7.5	1.75	2

* données provisoires

La différence significative de prévalence brute à l'équarrissage entre 2002 et 2003 pourrait, pour partie, s'expliquer par des erreurs d'imputation d'animaux à des programmes en 2002 : certains animaux inclus dans la catégorie équarrissage étaient des animaux testés dans le cadre de la police sanitaire de la tremblante dans les élevages dans lesquels un cas avait été détecté³.

² La détermination du niveau de la borne supérieure de l'intervalle de confiance de cette prévalence, acceptable en termes de risque pour l'Homme ne relève pas de ce groupe de travail.

³ Morignat E, Cazeau G and Calavas D : Surveillance active de la tremblante chez les petits ruminants - Analyse du programme 2003, rapport AFSSA, 2004.

L'augmentation de prévalence entre 2003 et 2004 est non significative. Une certaine prudence s'impose néanmoins dans la comparaison de ces prévalences brutes, étant donné les biais relevés dans la mise en œuvre des programmes : un prélèvement des animaux vraisemblablement non aléatoire à l'abattoir et à l'équarrissage, une hétérogénéité géographique du taux de sondage et l'utilisation de tests ayant des performances différentes. Si on réalise des simulations pour tenir compte de ces trois biais, les prévalences estimées sont sensiblement différentes, cf. tableau ci dessous⁴.

		2002	2003
Abattoir	Prévalence brute	0.92 ‰	1.02 ‰
	Prévalence simulée	1.66 ‰	1.05 ‰
Equarrissage	Prévalence brute	6.94 ‰	1.77 ‰
	Prévalence simulée	13.55 ‰	2.73 ‰

Si on ne considère que les années 2003 et 2004, le rapport des prévalences brutes entre équarrissage et abattoir (respectivement 1,75 et 2) est très différent de ce qui est observé pour l'ESB chez les bovins (respectivement 20, 19, 25 et 17.4 pour l'ESB chez les bovins en 2001, 2002, 2003 et 2004). En matière d'ESB, les animaux détectés positifs en équarrissage sont très majoritairement en phase clinique de la maladie, alors que les animaux détectés positifs à l'abattoir semblent être majoritairement en phase préclinique⁵. Cette différence ne s'explique pas par l'existence de formes atypiques de tremblante. Si on retire les cas atypiques, ces rapports de prévalence entre équarrissage et abattoir sont de 2.55 en 2003 et de 3.98 en 2004. La différence de rapport de prévalence entre bovins et ovins pourrait s'expliquer par une physiopathogénie différente, l'accumulation de PrPres à un niveau détectable dans le système nerveux central étant très certainement plus précoce et plus progressive chez les ovins. Cette explication n'est cependant vraisemblablement pas suffisante pour expliquer une telle différence. Un autre élément d'explication pourrait être lié au fait que la symptomatologie de la tremblante est quelquefois fruste, rendant l'identification des cas cliniques délicate que ce soit au niveau des exploitations ou lors de l'inspection *ante mortem* en abattoir ; la proportion de cas cliniques parmi les cas détectés en abattoir pourrait être supérieure à ce qui est considéré pour les bovins, ce qu'il conviendrait d'explorer formellement.

Sur une base annuelle, les ovins détectés positifs à l'équarrissage et à l'abattoir provenaient d'exploitations différentes (pour les animaux traçables), sauf à deux occasions en 2002 et 2004 où un animal positif à l'abattoir et un animal positif en équarrissage provenaient du même troupeau. La quasi indépendance entre troupeaux détectés en équarrissage et abattoir s'explique par le fait que : i) la prévalence de la tremblante est faible au niveau animal (de 1 à 2 ‰ des animaux adultes abattus ou équarris), ii) les programmes de surveillance ne testent qu'un échantillon des populations concernées (sur la base d'une population de 250 000 ovins équarris par an (source DGAI) respectivement 6.9, 7.5 et 4.9 ‰ de la population ovine équarrée en 2002, 2003 et 2004 ; sur la base de 650 000 ovins adultes abattus par an (source DGAI) respectivement 5.2, 6.8 et 1.9 ‰ de la population ovine abattue en 2002, 2003 et 2004)⁶.

⁴ *Ibid.*

⁵ Cazeau G, Ducrot C, Collin E, Desjouis G and Calavas D. Questionnaire analysis of BSE cases in France detected by active surveillance and the reasons for non-notification. *The Veterinary Record* 2004;154(5):133-6.

⁶ Cela démontre clairement qu'un programme de tests basé sur des échantillons de la population ovine (même relativement importants) ne permet de détecter qu'une fraction des troupeaux atteints (pour rappel, une modélisation faite en Norvège (Hopp P, Webb CR and Jarp J. Monte Carlo simulation of surveillance strategies for scrapie in Norwegian sheep. *Preventive Veterinary Medicine* 2003;61:103-25) a estimé que dans le meilleur des cas, un tel programme permettait de détecter 9% des troupeaux atteints). Dans un objectif de dépistage exhaustif des élevages atteints, il conviendrait de tester pendant une durée à définir la totalité de la population ovine équarrée (tester également la population ovine abattue permettrait de dépister plus tôt des troupeaux contaminés, moyennant un coût considérablement plus élevé).

- **Analyse des caractéristiques des tests de détection et de discrimination *ESB like***

Un avis de l'Autorité européenne de sécurité alimentaire (AESA) a été rendu en juin 2005 sur 6 tests *rapides* de dépistage *post mortem* des EST chez les petits ruminants⁷ :

- les 6 tests (BioRad TeSe, BioRad TeSe sheep/goat, Enfer TSE Test v2.0, Institut Pourquier Scrapie Test, Prionics Check LIA Small Ruminant, Prionics Check WB Small Ruminant) donnent des résultats satisfaisants en termes de sensibilité et de spécificité pour détecter la tremblante typique, mais il y a des différences importantes de sensibilité analytique entre tests ;
- tous les tests sauf Prionics Check LIA Small Ruminant détectent les cas atypiques sur le cervelet ;
- les 6 tests détectent les cas d'ESB ovine sur le tronc cérébral, mais il y a des différences importantes de sensibilité analytique entre tests.

Les tests biochimiques discriminants tremblante/*ESB like* (dénommés tests discriminants ci-après) dérivent des tests *rapides*. Ces tests ne sont mis en œuvre que sur les cas détectés positifs en première intention par un test *rapide*, et on ne peut donc trouver des cas *ESB like* que parmi les cas EST positifs. La question de l'existence de cas *ESB like* parmi les prélèvements négatifs par un test rapide ne se pose pas.

On connaît mal la spécificité des tests discriminants. Quand un prélèvement est positif par un test discriminant, ce prélèvement est soumis à un *ring trial*, organisé au niveau européen par le laboratoire communautaire de référence (CRL), avec la mise en œuvre de plusieurs tests discriminants ; à ce stade, certains prélèvements sont écartés (à ce jour dix prélèvements ovins - dont l'isolat ovin britannique CH1641- et un prélèvement caprin en France). Les prélèvements qui passent le *ring trial* sont déclarés *ESB like*. Ces prélèvements sont alors soumis à un bio essai sur souris. Actuellement le seul cas *ESB like* publié a été confirmé indistinguable de l'ESB par ces bio essais (donc une spécificité de 100% sur un cas). Les éventuels défauts de spécificité des tests discriminants sont donc traités *en aval* par les bio essais sur souris (les faux positifs *ESB like*/ ESB sont écartés à ce stade). La prévalence réelle de l'ESB chez les ovins ne sera donc connue qu'à l'issue des bio essais, la prévalence des cas *ESB like* pouvant donc être supérieure à la prévalence de l'ESB, sans que l'on puisse estimer dans quelle proportion.

La sensibilité des tests discriminants est actuellement estimée à 100% ; cette sensibilité a été établie à partir de 19 petits ruminants infectés expérimentalement par l'ESB (14 ovins dans le cadre de la validation par le CRL des cinq tests proposés par les laboratoires inventeurs, 3 ovins provenant d'expérimentations à l'Afssa Lyon et 2 caprins provenant d'expérimentations en Ecosse). La borne inférieure de l'intervalle de confiance (IC) de cette sensibilité est donc de 82.35 % (loi binomiale exacte).

On considère aujourd'hui que la signature biochimique et immunohistochimique de l'ESB chez les ovins est conservée après plusieurs passages dans cette espèce, et ceci quel que soit le génotype des animaux. Parmi les 14 isolats ayant été inclus dans la phase de validation des tests discriminants, 10 isolats provenaient de deuxièmes passages de l'ESB chez le mouton. Notons par ailleurs que ces 14 isolats provenaient d'ovins de même génotype ARQ/ARQ, comme les 3 isolats provenant d'expérimentations à l'Afssa Lyon. Il n'y a pas aujourd'hui de données publiées concernant la stabilité de cette signature en troisième passage chez les ovins, ni de données sur la signature de l'ESB chez des ovins d'autres génotypes. Sachant que l'identification des cas d'ESB chez les ovins va reposer sur la détection des cas *ESB like* par ces tests

⁷ EFSA Scientific report (2005)31,1-17 on the Evaluation of Rapid *post mortem* TSE Tests intended for Small Ruminants.

discriminants, l'hypothèse de la stabilité de la signature est essentielle⁸, en particulier quand on considère que l'exposition de la population ovine à l'agent de l'ESB a eu préférentiellement lieu entre les années 1980 et 1990, et a diminué avec les différents trains de mesure pris depuis, et que les cas d'ESB qui seraient diagnostiqués aujourd'hui chez les ovins seraient en grande partie le fait de transmissions ultérieures dans la population ovine. Il est donc de la plus haute importance de disposer de données complémentaires par rapport à cette hypothèse : stabilité en troisième passage, stabilité quel que soit le génotype.

Les tests discriminants n'ont été validés que sur le système nerveux central, et plus spécifiquement sur le tronc cérébral (les 14 ovins inclus dans le cadre de la validation par le CRL). Par ailleurs, dans une phase précédente d'évaluation, deux autres animaux avaient été testés de façon satisfaisante par les 4 tests. Il s'agissait de passages primaires, et dans ce cas les tests avaient été effectués sur tronc cérébral, cortex frontal, cortex occipital et cortex pariétal. On doit donc considérer que ces tests ont été validés sur des prélèvements de tronc cérébral avec une indication de portée limitée selon laquelle ces tests peuvent aussi être appliqués au cortex cérébral. On n'a pas d'indication à ce jour sur leur application à des prélèvements de cervelet. Dans l'attente de données complémentaires sur le cervelet, il ne peut donc être envisagé que l'utilisation du tronc cérébral dans l'objectif de mettre en évidence les cas *ESB like* dans la population ovine.

- **Physiopathogénie de l'ESB et de la tremblante chez les ovins**

Les connaissances actuelles, qui reposent sur très peu de cas expérimentaux, conduisent à penser que la physiopathogénie de l'ESB chez les ovins est proche de celle de la tremblante typique, en termes de cinétique d'accumulation de la PrPres et de dissémination de ce marqueur dans l'organisme. Par ailleurs, on admet également que les facteurs de susceptibilité génétique sont proches entre ESB et tremblante typique.

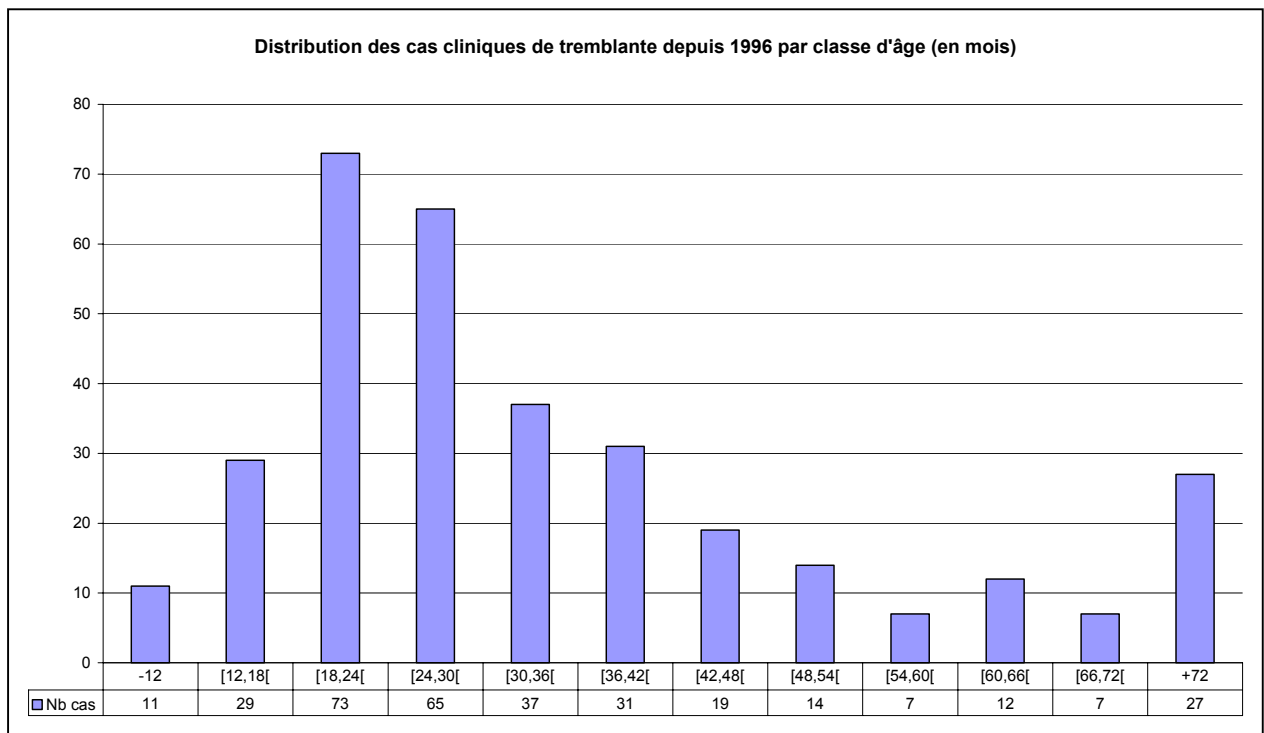
On posera donc l'hypothèse que la proportion de cas *ESB like* est équivalente parmi les cas détectés positifs par un test rapide à l'équarrissage et à l'abattoir.

2. Paramètres généraux du programme

- **Tester des animaux jeunes et/ou âgés ?**

L'expérience du réseau de surveillance clinique depuis 1996 montre qu'une partie non négligeable de cas cliniques (12 %), surviennent avant 18 mois, cf. graphe ci dessous.

⁸ Cette hypothèse est également essentielle pour envisager des mesures de police sanitaire différentes entre foyers de tremblante typique et foyers dus à l'agent de l'ESB.



Le fait de tester dans le cadre d'une surveillance active, des animaux plus jeunes que ceux testés actuellement (à partir de 18 mois), en considérant une infection préférentielle dans le jeune âge, permettrait en tout état de cause de dépister plus de cas et de détecter plus tôt des élevages nouvellement infectés par une EST. En revanche cela conduirait à une augmentation significative du coût du programme par l'inclusion d'une population dans laquelle la probabilité de positivité est beaucoup faible en raison de la cinétique d'accumulation de la PrPres. De plus dans l'objectif de détection de cas d'ESB, on peut faire l'hypothèse que le risque de contamination directe des troupeaux ovins par voie alimentaire est aujourd'hui résiduel (en particulier interdiction des farines de viandes et d'os (FVO) et de certaines graisses en novembre 2000) : si l'ESB est actuellement présente dans le cheptel ovien, on peut faire l'hypothèse que les troupeaux actuellement concernés auraient été contaminés en très grande majorité soit par voie alimentaire avant 2000, soit secondairement par contamination à partir de troupeaux préalablement contaminés par voie alimentaire. Dans ces conditions, il paraît raisonnable de limiter le programme aux animaux de 18 mois et plus.

- **Analyse séparée ou commune des prévalences équarrissage et abattoir ?**

Si on considère que les animaux détectés positifs à l'abattoir, pour une partie d'entre eux en phase préclinique, auraient été détectés de toute manière plus tard à l'équarrissage, on peut confondre les deux populations et définir une prévalence *à la mort*. Ceci s'entend d'autant plus que les données accumulées montrent que la prévalence des EST chez les ovins est du même ordre de grandeur à l'abattoir et à l'équarrissage.

Si on n'admet pas cette position, il faudrait considérer les deux populations séparément et analyser indépendamment les deux prévalences, avec une perte importante de puissance statistique pour le calcul de l'intervalle de confiance de la prévalence observée.

- **Exhaustivité pendant une période donnée ou sondage pendant une période plus longue ?**

L'estimation de l'intervalle de confiance de la prévalence dépend du nombre total d'animaux testés, et non pas de la taille de la population testée (modulo la prise en considération d'un facteur d'exhaustivité dans le calcul de la prévalence si le taux de sondage est élevé).

Les arguments en faveur de l'exhaustivité pendant une période donnée sont :

- absence de problème relatif à la mise en œuvre pratique d'un échantillonnage et donc absence de biais de recrutement lié au sondage (inclusion de clusters d'animaux d'un même troupeau, inclusion préférentielle d'animaux identifiés, etc.) ;
- plus grande facilité à contrôler l'exhaustivité de recrutement que la bonne mise en œuvre d'un sondage (cf. programme pilote ESB Grand Ouest en 2000-2001).

Les arguments en défaveur de l'exhaustivité pendant une période donnée sont :

- possibilité d'échappement (retard à l'abattage, non envoi à l'équarrissage) si le programme ne s'étale que sur une période relativement courte ;
- l'exhaustivité est impossible à obtenir pour la population envoyée à l'abattoir car une bonne partie des animaux de réforme est exportée, et une part non négligeable abattue en dehors des circuits de contrôle officiel.

Cette analyse plaide pour un programme exhaustif pendant une période suffisamment longue (trois à quatre mois minimum) en tenant compte d'une part des périodes de plus grande mortalité des brebis adultes et d'envoi à l'abattoir des ovins de réforme (une grande partie des ovins de réforme sont envoyés à l'abattoir après le dénombrement des troupeaux pour l'attribution d'une prime à la brebis). La période considérée devrait englober l'hiver (plus forte mortalité des adultes) et la période mai-juillet (période importante de réforme).

Si ce choix est fait, le contrôle de l'exhaustivité et sa documentation sont indispensables, à l'instar de ce qui a été fait lors du programme pilote ESB Grand Ouest en 2000-2001.

- **Equarrissage et/ou abattoir ?**

En extrapolant aux populations des ovins équarris et abattus les prévalences estimées en 2003 et 2004, et compte tenu de la taille des deux populations, le nombre de cas d'EST attendu dans ces populations est du même ordre de grandeur⁹, et donc également le nombre de cas potentiels *ESB like* dans ces populations.

Des phénomènes de vases communicants entre populations d'ovins à l'abattoir et en l'équarrissage ne peuvent être exclus. Cela plaide pour la réalisation d'un programme exhaustif à la fois à l'équarrissage et à l'abattoir pendant une période donnée.

En revanche il est à noter qu'une généralisation des tests à l'abattoir sur les animaux de réforme pose d'importants problèmes d'intendance et d'organisation dans les abattoirs, qui seraient à gérer : consigne des animaux dans l'attente du résultat du test de première intention, gestion des MRS par animal ou lot d'animaux, etc.

⁹ Par exemple en 2004, à l'abattoir $1.04 \% * 650\ 000 = 676$ animaux ; à l'équarrissage $2.11 \% * 250\ 000 = 527$ animaux.

Compte tenu de ces contraintes, il est envisageable de mener le programme uniquement à l'équarrissage, moyennant quelques conditions :

- ajustement du nombre d'animaux inclus en fonction de l'objectif visé (borne supérieure de l'intervalle de confiance) ;
- contrôle des éventuels phénomènes de vases communicants entre équarrissage et abattoir (surveillance *ante mortem* renforcée à l'abattoir, maintien d'un programme par sondage à l'abattoir).

- **Programme national ou localisé ?**

Les ovins sont présents sur tout le territoire mais à des densités extrêmement variables (cf. carte 1) ; le Massif central, et plus spécifiquement le centre-ouest et le sud du Massif central, ainsi que la partie occidentale des Pyrénées et dans une moindre mesure le Sud-est de la France sont les zones à forte densité ovine.

En faisant l'hypothèse que la source du risque ESB pour les ovins serait la même que pour les bovins, on peut considérer que les zones les plus à risque pour l'ESB au cours des années quatre-vingt dix (cf. carte 2) pourraient être aussi les plus à risque pour la contamination des ovins par l'ESB.

Partant de ces constatations et hypothèses (cartes 1 et 2), et sans faire d'hypothèses sur le type d'alimentation qui peut varier selon les modes de production, les zones les plus propices à la recherche de cas *ESB like* chez les ovins seraient le Centre ouest et la partie occidentale des Pyrénées. En effet, l'idée sous-jacente est que plus le risque est élevé et plus le nombre d'animaux soumis au risque est important, plus grande est la probabilité d'occurrence de la contamination.

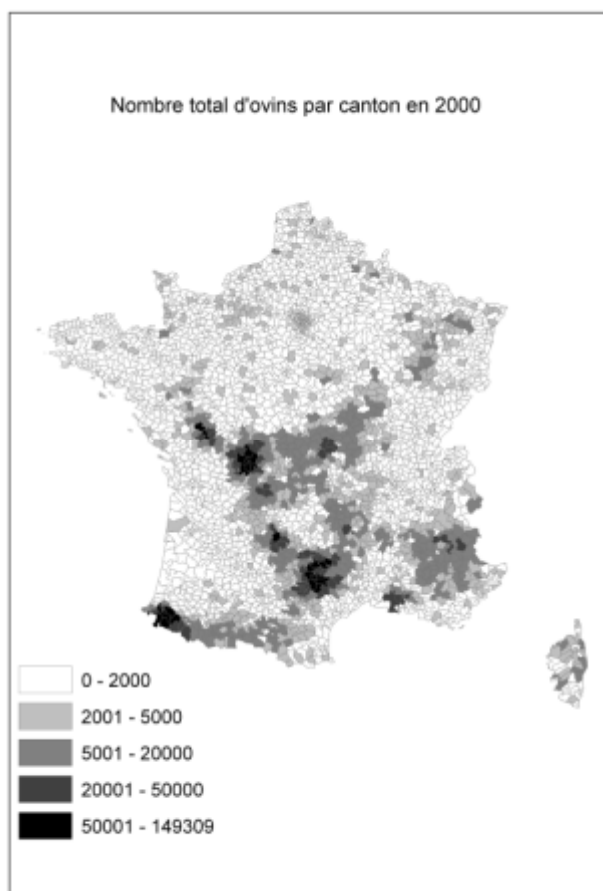
Néanmoins une réserve à ce raisonnement est que l'on s'attend chez les petits ruminants à une transmission horizontale et éventuellement verticale entre animaux. Compte tenu des échanges d'animaux reproducteurs, qui sont avant tout locaux mais peuvent dans certaines races être nationaux, le risque existe de diffusion de l'infection au-delà de la zone de contamination initiale. Ceci atténue en partie la pertinence du raisonnement précédent.

Il y a par ailleurs des réserves importantes à une régionalisation du programme de tests :

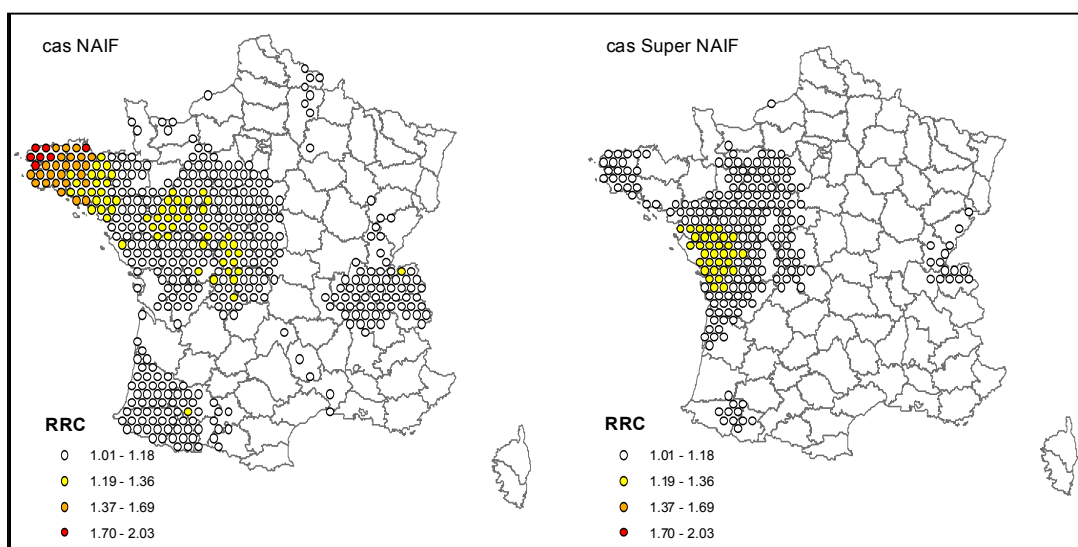
- le fait que ce choix serait basé sur des hypothèses, qui peuvent être contredites en pratique ;
- le discrédit potentiel jeté à une zone donnée.

La réalisation d'un programme au niveau national est donc à privilégier.

Carte 1 : Densité de l'élevage ovin (nombre total d'ovins par canton, données du Recensement général agricole 2000).

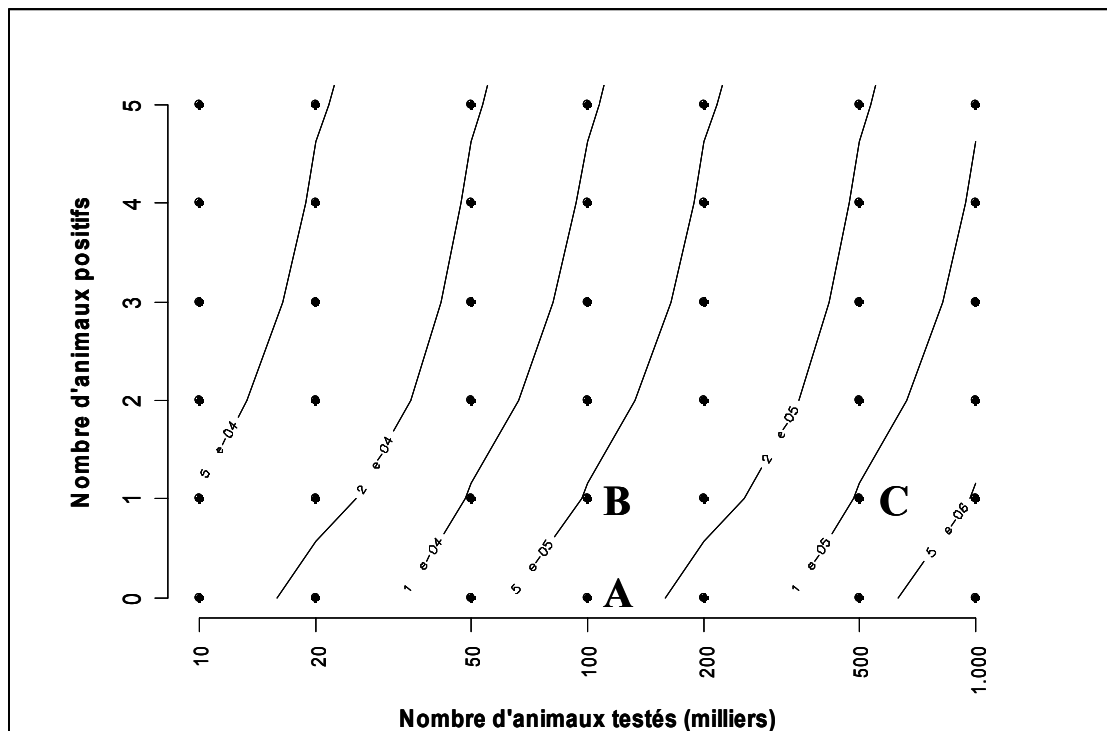


Carte 2 : Zones à risque ESB significativement supérieur à la moyenne nationale ($p \leq 0.01$), pour les cas NAIF et super NAIF chez les bovins (période de détection juillet 2001-juillet 2003 ; les quatre couleurs indiquent l'intensité de ce risque exprimé par le risque relatif de contamination (RRC) de chaque zone par rapport au risque national moyen).



- Comment raisonner l'intervalle de confiance (IC) de la prévalence *ESB like* en cas de prévalence nulle ?

Une approche simplifiée pour estimer la prévalence maximale de l'ESB chez les ovins selon le nombre d'animaux testés et le nombre de positifs, consiste à calculer la borne supérieure de l'intervalle de confiance exact unilatéral à 95% correspondant à des effectifs de 0, 1, 2, 3, 4, 5 animaux positifs pour des effectifs testés de 10 000, 50 000, 100 000, 500 000, 1 000 000 d'animaux, cf. graphe ci dessous. Les contours correspondant aux niveaux de risque sont interpolés à partir des valeurs des points.



Mode de lecture : Pour un nombre d'animaux testés donné (abscisse), on compte le nombre de cas positifs (0 à 5 sur le graphique). On reporte le point sur le diagramme, et on prend la première courbe à gauche. Le label de cette courbe correspond à la borne supérieure de l'intervalle de confiance de la prévalence.

Exemple : si l'on teste 100 000 animaux, et que l'on trouve aucun positif, on conclura que la prévalence est au maximum de 5/100 000 (5×10^{-5} , point A sur le graphique). On aura la même conclusion avec 1 positif sur 100 000 (point B). En revanche si on observe 1 positif sur 500 000, la prévalence sera au maximum de 1/100 000 (point C).

3. Modalités pratiques de mise en œuvre du programme

Etant donné son enjeu, et le coût considérable qu'il représenterait, la mise en œuvre pratique d'un tel programme ne peut pas se faire sans des aménagements préalables qui permettront d'en

assurer la qualité et d'en rendre les résultats interprétables, pour lesquels il faudra apporter des éléments documentant leur réalisation.

Exhaustivité des prélèvements

Si le protocole retenu fait appel à un dépistage exhaustif des ovins de réforme en équarrissage et à l'abattoir sur l'ensemble du territoire national pendant une période de quelques mois, il faudra prendre en compte notamment les risques d'échappement.

Au regard de l'équarrissage :

- cadavres non collectés par l'équarrissage (enfouissement sur place, nourrissage des vautours...);
- cadavres collectés dans des conditions impropres à la réalisation de prélèvements (containers de collecte dans le Sud Est de la France...);
- cadavres collectés mais non prélevés (erreur d'estimation de l'âge, évitement des cadavres non ou mal identifiés...).

Au regard de l'abattoir :

- augmentation des flux d'exports ;
- augmentation des abattages clandestins...

Si le protocole retenu est différent, d'autres risques devront en outre être pris en compte :

- phénomènes de vases communicants entre abattoir et équarrissage ;
- flux d'animaux à abattre vers les zones où la surveillance serait moins intensive ;
- abattages retardés...

L'ensemble des phénomènes d'échappement aura pour conséquence d'affaiblir la puissance du protocole retenu (perte de précision) et pourrait contribuer à biaiser les résultats obtenus (ex : augmentation préférentielle des flux d'export en provenance des départements fortement atteints de tremblante).

Il conviendrait donc de maîtriser ces risques d'échappement lorsque cela est réalisable (inspections en équarrissage par ex.) et, dans tous les cas, de les évaluer globalement (évolution des tonnages en équarrissage et en abattoir au cours du programme) et spécifiquement (nourrissage des oiseaux nécrophages, région PACA, exports : quantité d'ovins éligibles au programme, département d'origine...).

Traçabilité

Les proportions des ovins non traçables, très vraisemblablement sous estimées du fait d'un recrutement préférentiel d'animaux identifiés, étaient de 9.7% et de 7.4% respectivement en 2002 et 2003, équarrissage et abattoir confondus. Ces proportions devront être réduites autant que possible, et faire en sorte que la proportion d'animaux non traçables ne soit pas hétérogène sur le territoire comme c'est le cas dans le cadre des programmes de surveillance active actuels.

Une procédure d'identification des cadavres doit donc être mise en place de manière à connaître avec certitude la dernière exploitation dans laquelle se trouvaient les animaux.

Ceci est indispensable :

- sur le plan de l'analyse épidémiologique afin de pouvoir estimer des prévalences sans biais au niveau national et pour estimer au mieux les prévalences "troupeau" ;

- sur le plan de la gestion du risque pour être en mesure d'appliquer les mesures de police sanitaire spécifiques (abattage total en particulier) dans les troupeaux dans lesquels un cas *ESB like* aurait été trouvé.

Analyses individuelles ou groupées ?

La possibilité de mettre en œuvre des analyses sur des prélèvements groupés a été analysée par le Comité ESST de l'Afssa dans son avis du 25 mars 2005¹⁰. Il en ressort les points suivants :

« - le mélange des prélèvements d'encéphale est possible au prix d'une faible perte de sensibilité dans le repérage des animaux infectés; pour ce qui est des prélèvements de tissus lymphoïdes, le groupage ne semble pas possible sans perte importante d'efficacité ; une hypothèse à étudier pourrait être de grouper les prélèvements d'encéphale et de tissu lymphoïde pour chaque animal, - le groupage devrait affecter de façon plus importante la détection des cas atypiques qui sont souvent associés à des concentrations plus faibles de PrPres, - compte tenu de coûts incompressibles (réalisation du prélèvement, transport, et extraction avant la réalisation du test) qui représentent plus de 50% du coût total des tests, l'économie réalisée ne porte que sur une fraction des coûts totaux. ».

Au delà des limites techniques liées au groupage de prélèvements, qu'il conviendrait d'estimer précisément en fonction de la sensibilité analytique des tests retenus pour le programme, le fait de grouper des prélèvements induirait des complications sur le plan logistique, dont il conviendrait également d'étudier les conséquences : gestion de lots d'animaux ayant été inclus dans un pool d'analyse (carcasses et MRS), mise en œuvre de tests individuels dans le cas où un pool de prélèvement est positif, etc.

Protocole de prélèvement

Cf. annexe.

4. Conditions permettant de répondre à des objectifs complémentaires

Selon l'avis de l'AESA du 17 mai 2005 concernant l'évaluation des tests *rapides* de dépistage *post mortem* des EST chez les petits ruminants¹¹, et compte tenu du fait que les tests discriminants ont été définis quasiment exclusivement sur le tronc cérébral, le programme visant à estimer la prévalence des cas *ESB like* pourrait répondre aux objectifs complémentaires d'estimation de la prévalence des cas de tremblante typique et atypique, moyennant certains choix dans l'utilisation des tests rapides et de la zone de prélèvement.

Pour atteindre les objectifs complémentaires, sans perdre de vue l'objectif initial, il faudrait :

- soit utiliser le seul test Biorad TeSe sheep/goat sur le tronc cérébral, en raison de sa plus grande sensibilité analytique à la fois vis-à-vis de l'ESB et de la tremblante atypique ;
- soit mettre en œuvre une combinaison de tests sur le tronc cérébral et sur le cervelet (à l'exception du test Prionics Check LIA Small Ruminant qui ne détecte pas les cas atypiques), ce qui reviendrait à doubler le coût des tests pour ce programme.

¹⁰ Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur l'analyse des risques liés aux encéphalopathies spongiformes transmissibles dans les filières petits ruminants, les forces et faiblesses du dispositif actuel et les possibilités d'évolution - Actualisation en mars 2005 de l'avis de décembre 2001.

¹¹ - Les 6 tests (BioRad TeSe, BioRad TeSe sheep/goat, Enfer TSE Test v2.0, Institut Pourquier Scrapie Test, Prionics Check LIA Small Ruminant, Prionics Check WB Small Ruminant) donnent des résultats satisfaisants en termes de sensibilité et de spécificité pour détecter la tremblante typique, mais il y a des différences importantes de sensibilité analytique entre tests ;
- Tous les tests sauf Prionics Check LIA Small Ruminant détectent les cas atypiques sur le cervelet ;
- Les 6 tests détectent les cas d'ESB ovine sur le tronc cérébral, mais il y a des différences importantes de sensibilité analytique entre tests.

En tout état de cause, quelle que soit la stratégie retenue, il conviendrait de ne retenir qu'un seul test ou que deux tests dans l'éventualité d'une combinaison de tests, de manière à rendre les résultats interprétables et non biaisés (cf. recommandations de l'avis de l'EFSA du 17 mai 2005).

Ces aménagements de programme permettraient de plus d'obtenir une estimation de la distribution intra troupeau de la prévalence des cas typiques/atypiques. Cette distribution n'est pas connue actuellement pour plusieurs raisons : plusieurs tests sont utilisés en première intention, mais également dans l'application des mesures de police sanitaire dans les troupeaux dans lesquels un cas d'EST a été détecté. La connaissance de cette distribution serait de la plus haute importance dans la définition de programmes de certification des élevages.

Enfin, le programme permettrait de définir un échantillonnage d'animaux visant à estimer la structure génétique de la population ovine. Cette connaissance n'est pas disponible aujourd'hui (on ne dispose que de la structure génétique de certaines populations de béliers (éleveurs en schéma de sélection, certains groupements de producteurs)). Cette connaissance, couplée aux informations sur la distribution des formes d'EST dans les troupeaux atteints serait également fondamentale dans la définition de programmes de certification des élevages, prenant en compte l'effort de sélection génétique fait dans les élevages (programme de certification différents en fonction de la structure génétique des troupeaux).

ANNEXE

PROJET DE PROTOCOLE DE PRELEVEMENT DE L'ISTHME ENCEPHALIQUE CHEZ LES PETITS RUMINANTS POUR LA RECHERCHE DES ESST

1- Définitions préalables

L'isthme encéphalique, aussi appelé tronc cérébral, prolonge antérieurement la moelle épinière et repose sur le plancher crânien et se trouve surmonté par les hémisphères cérébraux et le cervelet. Il est constitué du bulbe rachidien, de la protubérance annulaire (pons), et des pédoncules cérébraux du mésencéphale.

L'obex est situé à la jonction du voile médullaire caudal avec le tronc cérébral, au niveau de la séparation définitive des faisceaux grâciles. C'est une petite lame grise transversale reliant les deux corps restiformes.

2- Objectifs

Chez les petits ruminants, le dépistage de la tremblante, dans sa forme classique mais aussi dans ses formes atypiques, ainsi que de l'ESB ovine constituent des objectifs différents qui peuvent être recherchés par des prélèvements de matériel cérébral différents ou communs selon les tests de dépistage de première intention employés.

Deux protocoles de prélèvements peuvent être alors proposés :

- protocole tronc cérébral (comme effectué jusqu'à présent) ;
- protocole tronc cérébral et cervelet.

3- Réalisation pratique

3.1- Remarques préalables

1. En équarrissage, le prélèvement doit être effectué par des vétérinaires sanitaires organisés en équipe pour assurer la régularité et la continuité des prélèvements.

2. En abattoir, il peut être effectué par les agents des services vétérinaires sous la responsabilité d'un vétérinaire inspecteur.

3. En équarrissage, une procédure d'identification des cadavres doit impérativement être mise en place. Une boucle numérotée peut être apposée par l'équarrisseur lors du ramassage du cadavre. Ce numéro sera inscrit sur le bon d'enlèvement préétabli par l'industriel. Enfin un exemplaire de ce bon sera fourni au vétérinaire préleveur.

4. La désarticulation atlanto-occipitale sera effectuée à l'équarrissage mais la tête doit rester attenante au cadavre en vue de la détermination du sexe et de la race de l'animal. Si l'atlas reste du côté céphalique, son ablation est nécessaire avant de procéder au prélèvement par le trou occipital.

3.2- Modalités de prélèvement du tronc cérébral chez les petits ruminants

Elles sont adaptées à partir des modalités de prélèvements chez les bovins mais des différences anatomiques nécessitent des ajustements.

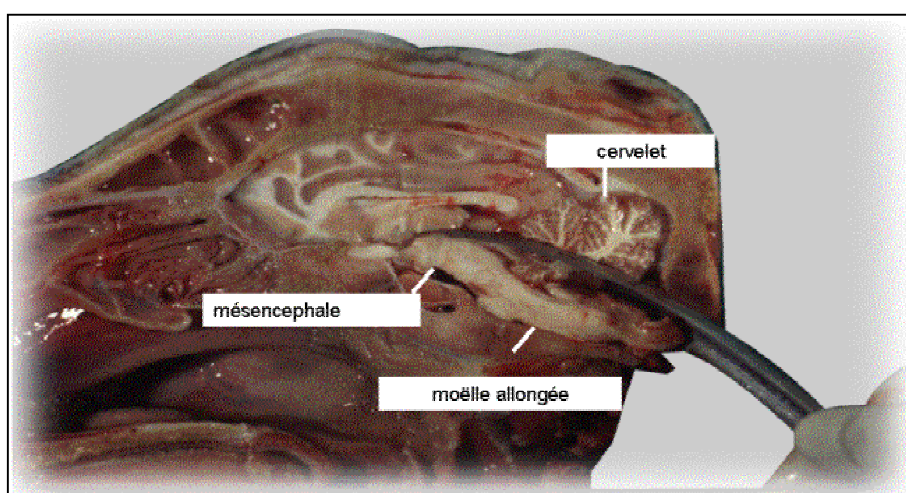
La tête est déposée sur le chanfrein et le front. Le trou occipital est bien visible avec en son centre l'extrémité du tronc cérébral. La dure-mère est bien visible, blanchâtre et résistante, elle est séparée du bulbe par l'espace sous-arachnoïdien, la pie-mère quant à elle est adhérente au

bulbe. L'espace sous-arachnoïdien des petits ruminants est plus large sur le côté ventral, à la différence des bovins.

L'introduction de la cuillère adaptée aux petits ruminants se fait donc sur le côté ventral du tronc cérébral, dos de la cuillère tournée vers le haut, avec un angle d'environ 60°. Des mouvements doux de rotation vont rompre les racines nerveuses des nerfs crâniens postérieurs et les pédoncules cérébelleux sur la face dorsale du tronc, permettant alors l'extraction du matériel d'analyse.

3.3- Modalités de prélèvement du tronc cérébral et de matière cérébelleuse.

La technique décrite par une équipe norvégienne diffère de celle précédemment exposée par la position de la tête de l'animal (posée sur ses ganaches), par le matériel utilisée (cuillère plus courbée), et par l'introduction de la cuillère sur le coté dorsal du bulbe. Dans ces conditions un peu de cervelet peut être obtenu. (cf. photo ci dessous).



(Metal spoon designed at the National Veterinary Institute of Oslo, Norway, Bjørn Bratberg)

Un aménagement pourrait être proposé. Une cuillère assez étroite (gouttière), assez courbée, avec des bords assez affûtés, et plus souple que celle utilisée jusqu'ici, permettrait de travailler dans les conditions habituelles (c'est-à-dire avec une pénétration ventrale). Une fois introduite sur le plancher du tronc, la cuillère est redressée vers la verticale (modérément en fonction de la souplesse) puis animée de mouvement de rotation, permettant de saisir du matériel cérébelleux dans la gouttière de celle ci.

Des essais peuvent être conduits en fonction de ces différentes hypothèses, mais il faut garder en mémoire que les conditions d'évaluation devront se rapprocher au mieux de la pratique quotidienne de prélèvements car l'état de conservation des cadavres de petits ruminants ne permet pas toujours une différenciation parfaite des éléments macroscopiques de diagnose des pièces anatomiques prélevées.

4- Conclusion

Les objectifs visés conditionneront la technique de prélèvement de l'isthme encéphalique des petits ruminants. La recherche exclusive de la tremblante et de l'ESB ne nécessite pas d'aménagement particulier par rapport à ce qui est déjà en place.

Le dépistage de formes atypiques de tremblante passe, soit par l'utilisation d'un test unique sur le tronc cérébral, soit par l'utilisation d'un des tests agréés sur le cervelet et d'un test complémentaire sur le tronc cérébral, en sachant que les conditions de prélèvement à l'équarrissage ne garantissent pas une bonne différenciation des pièces anatomiques requises.

Bibliographie

- GABRIEL A., JACOBS C., SIMOENS P. Prélèvement de l'isthme encéphalique pour la recherche d'encéphalopathie spongiforme transmissible chez le mouton. Annales de Médecine Vétérinaire, 2002, 146, 295-300.
- PAVAUX C. Neurologie des mammifères domestiques, système nerveux central. Cours magistral ENVT, 1976.
- Projet de mise en œuvre d'un programme pilote de surveillance de l'ESB, document DGAI-AFSSA-INRA, 2000.
- VENTURINI M. Matériel et méthode de prélèvement d'un échantillon de tronc cérébral pour le diagnostic de laboratoire de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (E.S.B.). Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France, 2000, 153, 383-390.
- VENTURINI M. Mise au point d'une technique et d'un instrument de prélèvement d'un fragment de tronc cérébral pour le diagnostic de laboratoire de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB). Revue de Médecine Vétérinaire, 2003, 154, 8-9, 537-542.