

Le directeur général

NOTE
d'appui scientifique et technique
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,
de l'environnement et du travail

relatif au « dépistage des bouquetins infectés de brucellose sur le terrain »

L'Anses a été saisie le 22 novembre 2014 par les ministères de l'écologie, du développement et de l'énergie d'une part et de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt d'autre part, pour la réalisation de l'appui scientifique et technique (AST) suivant : test pour le dépistage sur le terrain, des bouquetins infectés de brucellose.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA DEMANDE

La France est officiellement indemne de brucellose bovine depuis 2005 et aucune infection n'a été identifiée chez les ruminants domestiques entre 2003 et 2012, malgré une surveillance régulière sur tout le territoire français.

En avril 2012, suite à un avortement dans un cheptel producteur de fromage au lait cru en Haute-Savoie (massif du Bargy), le LNR brucellose a confirmé l'infection par *B. melitensis* biovar 3 de 2 vaches de l'exploitation. L'enquête épidémiologique a permis de relier ce foyer à un cas autochtone de brucellose humaine, diagnostiqué en janvier 2012, lequel se serait contaminé en octobre 2011 en consommant un fromage frais de cette ferme (Mailles *et al.*, 2012).

Une enquête épidémiologique exhaustive a été menée conjointement, à l'automne 2012, par les services de la DDPP 74 et ceux de l'ONCFS sur les ruminants domestiques et sauvages de l'aire du foyer, en collaboration avec les LVD 73 et 74 et le LNR Brucellose. Les résultats ont montré une séroprévalence élevée chez les bouquetins des Alpes (*Capra ibex*), sur le massif, en l'absence d'autres cas domestiques (Garin-Bastuji *et al.*, 2014). Des études moléculaires approfondies ont montré la première description d'un réservoir autochtone de *B. melitensis* biovar 3 chez des ongulés sauvages (bouquetin), avec une persistance de l'infection dans cette espèce et une transmission probable de la faune sauvage aux ruminants domestiques (Mick *et al.*, 2014). Dans ce contexte, le LNR a entrepris dès 2013, après concertation avec la DGAI, d'explorer les possibilités d'un diagnostic sérologique rapide de la brucellose chez le bouquetin, sur le terrain, dans la perspective de raccourcir le délai, lié au laboratoire, entre l'obtention d'un diagnostic sérologique positif et l'abattage des animaux infectés.

Indépendamment des travaux actuellement en cours dans le Groupe de Travail sur la brucellose des bouquetins dans le massif du Bargy, les ministères signataires souhaitent savoir, en urgence, s'il existe actuellement un test de dépistage de la brucellose sur les bouquetins, donnant lieu à un résultat rapide de terrain.

Il est plus particulièrement demandé :

- Le niveau de performance de ce test (sensibilité/spécificité, valeurs prédictives positives et négatives attendues, interaction avec d'autres molécules)
- La limite de détectabilité (délai de séroconversion, âge limite de détection) et l'interprétation vis-à-vis de l'infection des animaux, sa disponibilité
- Les modalités pratiques de mise en œuvre qu'il nécessite

2. ORGANISATION DES TRAVAUX

Cet AST a été réalisé par le LNR Brucellose de Maisons Alfort, avec la collaboration d'un expert du GT Brucellose Bouquetins.

Il s'appuie sur les données obtenues au cours des différentes études menées au LNR et sur le terrain.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS

3.1. Existe-t-il un test de dépistage de la brucellose sur les bouquetins, donnant lieu à un résultat rapide sur le terrain ?

Le bouquetin des Alpes (*Capra ibex*) appartient au même genre que la chèvre domestique (*Capra [aegragus] hircus*), et présente très probablement de grandes similarités au plan immunologique avec cette espèce. Plusieurs kits de diagnostic sérologique rapide, basés sur le principe d'immuno-chromatographie sur bandelette [LFIA (pour Lateral Flow Immunochromatographic Assay)], sont disponibles sur le marché pour la détection de la brucellose des ruminants. Deux kits adaptés aux petits ruminants (produits respectivement en Afrique du Sud et Corée) ont ainsi été acquis par le LNR dès 2013, afin d'en évaluer les performances et l'aptitude à un diagnostic rapide de la brucellose sur sang total chez les bouquetins, directement sur le terrain.

Le test rapide commercialisé par la société Coréenne **Bionote** (<http://www.bionote.co.kr>) sous l'appellation commerciale « **Anigen Rapid GS Brucella Ab Test Kit** » a été retenu pour ses performances décrites par le fabricant (spécificité, sensibilité, robustesse, répétabilité, etc.), pour le sérieux du fabricant/fournisseur et après un essai comparatif des deux tests par le LNR fin 2013. Développé pour les petits ruminants, ce kit permet la détection des anticorps dirigés contre *Brucella melitensis*, *B. abortus* et *B. suis* à partir de sang total, de plasma, de sérum ou de lait d'ovin/caprin selon les indications du fabricant. Le dépôt d'une goutte de sang (ou de sérum) à l'extrémité de la bandelette est suivi par une migration et par l'apparition d'une bande colorée en cas de résultat positif (Fig. 1).

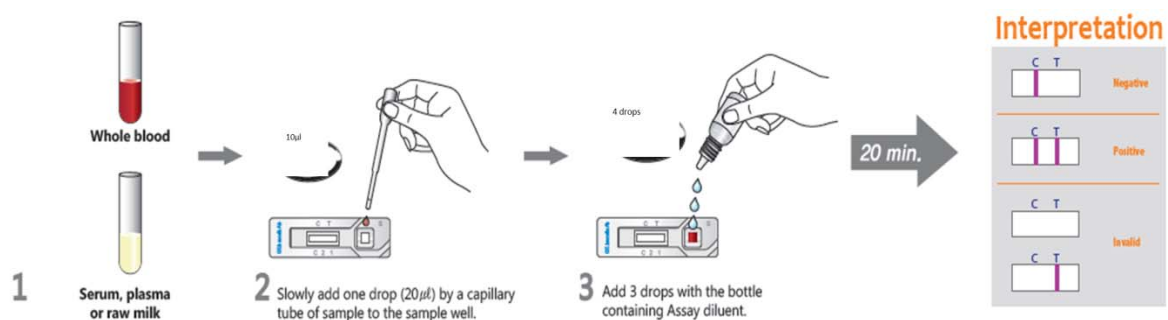


Fig.1 : Principe du test

Des analyses préliminaires sur sérums de référence de petits ruminants ont été réalisées dès la réception des kits par le LNR avec des résultats prometteurs (données non montrées).

Ce test a été ensuite évalué sur des prélèvements de sérum de bouquetins collectés depuis 2012 sur le massif du Bary. En effet, il est impossible de conserver des prélèvements de sang total dans des conditions permettant le maintien de leurs caractéristiques immunologiques sur le moyen ou le long terme. Le sérum représentant environ 40% en volume du sang total, l'utilisation, dans un premier temps de sérum devait permettre d'apprécier grossièrement la sensibilité et la spécificité analytiques maximales qu'on pouvait attendre du test, puisque, à priori, le test sur le sang ne pouvait être qu'au mieux aussi sensible et aussi spécifique que le test sur sérum (moindre concentration des anticorps dans le sang, probabilité de réactions non-spécifiques plus importante dans le sang).

En conclusion, il existe bien un test de dépistage de la brucellose sur sang total de bouquetin, permettant l'obtention d'un résultat rapide sur le terrain.

3.2. Niveau de performance du test « Anigen Rapid GS *Brucella* Ab Test Kit » (Bionote, Corée) appliqué aux bouquetins

Les tests sérologiques recommandés officiellement pour le dépistage de la brucellose chez les petits ruminants par la réglementation de l'UE sont l'Epreuve à l'Antigène Tamponné (EAT) et la Fixation du Complément (FC). L'OIE y ajoute l'ELISA indirect (iELISA). EAT et FC ont largement démontré leurs performances dans les différentes stratégies sanitaires ou médico-sanitaires de contrôle et d'éradication de la brucellose ovine et caprine (dépistage ou confirmation d'une suspicion clinique) (OIE, 2014 ; Directive Européenne 91/68).

Il convient de souligner que la réalisation des tests considérés comme tests de référence (EAT, FC, iELISA) nécessitent des conditions environnementales, une technicité et des équipements spécifiques et donc une mise en œuvre obligatoirement au laboratoire et par du personnel qualifié.

3.2.1. Objectif

Afin d'apprécier l'efficacité du test rapide « Anigen Rapid GS *Brucella* Ab Test Kit » (Bionote, Corée) appliqué aux prélèvements de bouquetins, le test Bionote a été évalué au LNR en comparant ses performances sur sérum par rapport aux tests sérologiques classiques ainsi qu'à l'iELISA. Compte tenu des contraintes liées au contexte et notamment l'impossibilité de disposer de prélèvements adéquats en nombre suffisant pour une étude de validation *sensu stricto* (espèce sauvage protégée requérant une capture pour tout prélèvement), le LNR a établi en 2013 un plan de l'étude selon 2 étapes :

- Une première étape réalisée au LNR sur sérums de référence caprins et sur la collection de sérums établie au terme des enquêtes 2012-2013, permettant d'approcher la sensibilité et la spécificité analytiques du test rapide ;
- Une seconde étape assurée par les structures proches du terrain (ONCFS et LVD 73) permettant d'évaluer les performances du test en conditions de terrain sur sang total.

3.2.2. Méthodologie

3.2.2.1. Echantillons

Les sérums caprins de référence européens (EU Goat *Brucella* Standard Serum, EUGBSS) et international (International Standard anti-*B. melitensis* Serum, ISaBmS) pour la brucellose des petits ruminants ont été inclus dans cette étude. Ils ont été dilués dans du sérum négatif caprin ou dans du sang total ovin afin de se rapprocher des conditions réelles de mise en œuvre.

Un total de 260 échantillons de bouquetins (sérum et/ou sang) a été analysé avec ce kit LFIA :

- Une première série de sérums de bouquetins (n=172) collectés lors des captures réalisées en 2012 et 2013 a été analysée au LNR.
- En 2014, après transfert sur le terrain et formation des agents de l'ONCFS sur la pratique du test en conditions réelles, une seconde série de prélèvements (sang total) a été analysée directement sur le terrain, au printemps-été 2014, dans le cadre d'une étude pilote, au cours de missions de capture des bouquetins (n=88). Les résultats ont été comparés à ceux des tests EAT et FC réalisés dans les 24 heures suivantes sur les sérums correspondants par le laboratoire LVD 73.

3.2.2.2. Techniques :

- LFIA (Bionote, Rép. Corée)
- EAT (Idexx, France) (AFNOR, 2009a)
- FC (Idexx, France) (AFNOR, 2009b)
- iELISA (Idexx, France) (OIE, 2014)

NB : les épreuves EAT, FC et iELISA ont été réalisées avec des réactifs et selon un protocole conformes aux exigences de l'UE (EAT et FC) et de l'OIE (iELISA).

3.2.2.3. Résultats

• Evaluation de la sensibilité analytique du test LFIA sur sérums de référence

Les sérums de référence ont été analysés en parallèle avec le test LFIA et l'épreuve iELISA aux dilutions correspondant au niveau exigé de détection défini par l'OIE pour l'iELISA des petits ruminants

(ISaBmS 1/64 ; EUGBSS 1/8). Ce test a été privilégié car plus sensible que les tests EAT et FC (l'iELISA détecte la plupart des anticorps anti-*Brucella* et pas seulement les anticorps agglutinants [EAT] ou fixant le complément [FC]).

Tableau 1 : Comparaison des tests LFIA et iELISA sur sérums de référence

Sérum de référence	Dilution	Test rapide LFIA	iELISA
ISaBmS (International Standard anti- <i>B. melitensis</i> Serum)	1/64*	Positif	Positif
	1/300**	Négatif	Négatif
EUGoatBSS (EU Goat anti- <i>Brucella</i> Standard Serum)	1/8*	Positif	Positif
	1/256**	Négatif	Négatif

*Niveau exigé de détection (résultat attendu positif);

**Dilution supérieure à la limite inférieure de détection exigée (résultat attendu négatif);

Les sérums de référence sont détectés avec le test LFIA aux mêmes dilutions seuil définies pour l'iELISA lorsque la dilution est réalisée en sérum négatif caprin (Tableau 1). Ces résultats montrent que les deux techniques présentent une performance similaire en termes de sensibilité analytique.

La sensibilité analytique du test rapide LFIA appliqué aux sérums de référence est donc au moins équivalente à la sensibilité analytique de l'ELISA indirect de diagnostic de la brucellose chez les petits ruminants.

• **Evaluation du test LFIA sur sérums de bouquetin**

Des sérums de bouquetin (n=172) collectés lors des captures réalisées en 2012 et 2013 ont été testés en EAT, en FC et en iELISA spécifique des petits ruminants. Ces résultats ont été comparés avec ceux obtenus en test LFIA (Tableau 2).

Sur 172 échantillons, une excellente concordance est observée entre les résultats du test rapide LFIA et les épreuves EAT (97.67 %), FC (98.84 %) et iELISA (98.84 %) sur la matrice sérum.

Tableau 2 : Comparaison du LFIA avec l'EAT, la FC et l'iELISA sur sérums de bouquetins

n = 172	EAT		FC		iELISA		
	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	
LFIA	Neg	137 (79.65 %)	1 (0.58 %)	138 (80.23 %)	0 (0 %)	138 (80.23 %)	0 (0 %)
	Pos	3 (1.74 %)	31 (18.02 %)	2 (1.16 %)	32 (18.60 %)	2 (1.16 %)	32 (18.60 %)
Concordance*		97.67 %		98.84 %		98,84%	

* La concordance est la somme des résultats négatifs et des résultats positifs dans les deux techniques comparées.

La concordance du test rapide LFIA appliqué aux sérums de bouquetin avec les tests sérologiques classiques de diagnostic de la brucellose chez les petits ruminants est très satisfaisante (>97.6 %).

Seul un animal détecté par l'EAT mais pas par la FC ni l'iELISA n'est pas retrouvé positif par le LFIA. Pour un autre animal, le LFIA est positif comme la FC et l'iELISA alors que l'EAT est négatif. Enfin, seuls deux animaux non détectés par les trois tests classiques sont détectés positifs par le LFIA. Compte tenu de la prévalence élevée de l'infection dans la population locale de bouquetins, il est probable que ces résultats témoignent plus d'une sensibilité du LFIA sur sérum équivalente à celle des tests officiels que d'un défaut de spécificité.

• Evaluation du test LFIA directement réalisé sur le terrain sur les sangs de bouquetin en comparaison avec l'EAT et la FC sur sérums correspondants

Au printemps 2014, après un transfert et une formation opérés par le LNR sur le terrain, le personnel de l'ONCFS a mis en œuvre le test LFIA dans les conditions du terrain, c'est-à-dire sur des prélèvements de sang total de bouquetins anesthésiés (n=88). Ensuite, les sérums correspondants ont été extraits et analysés en EAT et FC dans les 24 h suivant le prélèvement.

Tableau 3 : Comparaison du test LFIA directement réalisé sur le terrain sur sang total avec les tests EAT et FC sur les sérums en laboratoire

(source : J. Hars, ONCFS)

n = 88		EAT		FC	
		Neg	Pos	Neg	Pos
LFIA	Neg	53 (60.2 %)	0 (0 %)	53 (60.2 %)	0 (0 %)
	Pos	0 (0 %)	35 (39.8 %)	0 (0 %)	35 (39.8 %)
Concordance*		100 %		100 %	

* La concordance est la somme des résultats négatifs dans les deux techniques et des résultats positifs dans les deux techniques.

Sur 88 prélèvements de sang, prélevés directement au chevet de l'animal anesthésié, les résultats de l'ensemble des tests (EAT, FC et LFIA) sont strictement identiques (Tableau 3).

Il faut néanmoins préciser que cette étude terrain a été réalisée au printemps 2014 sur une sous-population de bouquetins en majorité jeunes et en pleine épizootie de brucellose dans cette sous-population (près de 40% de prévalence apparente), épizootie caractérisée notamment par des titres en anticorps anormalement élevés dans le sérum des bouquetins inclus dans l'étude (titres allant de 320 à plus de 1280 UI pour un seuil de positivité à 20 UI).

La concordance du test rapide LFIA appliqué au sang total de bouquetin avec les tests sérologiques classiques de diagnostic de la brucellose chez les petits ruminants est optimale (100 %) dans les conditions de l'étude.

3.2.2.4. Limites de l'étude

Cette étude ne permet d'apprécier que grossièrement les performances du test rapide LFIA. Il ne s'agit nullement d'une étude de validation *sensu stricto* car :

- Le statut infectieux des populations positives ou négatives aux tests de référence n'est pas précisément connu, même si, compte tenu du niveau de prévalence de l'infection les animaux présentant des résultats positifs à quelque test que ce soit sont très probablement infectés (forte Valeur Prédictive Positive des tests). La vérification de ce statut aurait été possible par la mise en œuvre d'une étude bactériologique approfondie et complète (sur au moins trois paires de nœuds lymphatiques ainsi que sur plusieurs organes cibles comme la rate et les organes génitaux – impraticable car nécessitant l'abattage et l'autopsie des animaux). A l'inverse, le statut indemne des animaux négatifs à un test n'est pas appréciable (Valeur Prédictive Négative faible) mais on

doit constater que les animaux négatifs aux trois tests officiels le sont également au test LFIA alors que la spécificité des tests officiels est connue comme excellente (> 99.8 % pour l'iELISA voire > 99.95% pour l'EAT et la FC chez les petits ruminants).

- La taille de la population testée est trop faible pour une étude précise de validation
- Le coût du test et le délai imparti n'a pas permis d'en vérifier la spécificité sur les collections de sérums issus d'autres massifs alpins indemnes de brucellose et disponibles dans plusieurs LVD alpins.

En revanche, sensibilité et spécificité analytiques du test LFIA semblent très similaires à celles des tests officiels.

Concernant la valeur diagnostique du test LFIA, si la spécificité et la sensibilité diagnostique ne peuvent en être précisément déterminées dans les délais impartis, il est probable que ce test permette de détecter sans difficulté les animaux dont les titres en EAT et en FC sont élevés et qui sont très certainement infectés. Si on ne peut écarter l'obtention de résultats positifs par excès avec le test LFIA, il est très probable que ceux-ci seront rares. Inversement, des résultats négatifs par défaut pourraient survenir mais seraient aisément identifiables par la suite par un test des sérums correspondants en EAT et en FC en laboratoire.

3.3. Délai d'approvisionnement/ quantité disponible

Fin septembre 2014, la société Bionote facturait 51 US\$ pour 10 tests, auxquels s'ajoutaient environ 200US\$ de frais de port. Un délai de 1 à 2 semaines était nécessaire pour leur acheminement. Actuellement, 100 tests sont disponibles au LVD73.

3.4. Modalités de mise en œuvre

La réalisation du test rapide ne semble pas nécessiter de compétence particulière, ni aucun équipement spécifique. Ce test rapide (résultat disponible en 20 min) et facile à mettre en œuvre, est donc utilisable sur le terrain, notamment lors des missions de captures des bouquetins en haute montagne. Après une rapide démonstration, les agents de l'ONCFS formés à l'utilisation de ces tests lors de la dernière campagne de capture ont souligné sa facilité de mise en œuvre.

Sa mise en œuvre ne nécessite qu'un prélèvement sanguin chez l'animal anesthésié, réalisé lors d'une capture par téléanesthésie par exemple. Le résultat est disponible dans les 20 minutes suivantes, ce qui est compatible avec la durée de l'anesthésie et de l'immobilisation des animaux capturés.

3.5. Résumé et conclusions

- Existe-t-il un test de dépistage de la brucellose sur les bouquetins, donnant lieu à un résultat rapide sur le terrain ?

Un test de diagnostic sérologique rapide de type « home-test » (LFIA), facile à mettre en œuvre en conditions de terrain (montagne) est disponible sur le marché pour la détection de la brucellose des petits ruminants sur sang total. Le LNR a évalué, dans la mesure des contraintes liées au contexte (espèce sauvage protégée de montagne) son application aux bouquetins sur le terrain.

Ce test dénommé « **Anigen Rapid GS *Brucella* Ab Test Kit** » est commercialisé par la société Bionote (Rép. Corée).



Résultat positif obtenu avec le test bandelette

- Niveau de performance du test
 - La sensibilité et la spécificité analytiques du test sont conformes à celles attendues de l'ELISA indirect, test le plus sensible disponible actuellement pour la détection des anticorps anti-brucelliques chez les petits ruminants domestiques ;
 - Sensibilité et spécificité diagnostiques n'ont pu être établies précisément pour ce test faute de populations animales de statut connu au regard de l'infection brucellique et en nombre suffisant ; Des résultats positifs par excès ou négatifs par défaut ne peuvent donc être exclus, mais ces derniers pourraient être rapidement identifiés par les tests EAT et FC réalisés par la suite en laboratoire.
 - En revanche, en comparaison avec les tests sérologiques reconnus chez les petits ruminants, les performances du test rapide semblent adaptées au dépistage de la brucellose chez le bouquetin, notamment pour les animaux présentant une réponse sérologique importante, témoignant d'une infection brucellique très probable.

Le test semble donc pouvoir être mis en œuvre dans le cadre d'une stratégie de contrôle de type sanitaire. Il permettrait d'abattre immédiatement, sans risque majeur d'erreur, les animaux dont les résultats au test rapide sont positifs. En revanche, les résultats négatifs mériteraient d'être confirmés en EAT et FC au laboratoire sur un nombre suffisamment important d'individus avant de considérer que sa spécificité est similaire à celle des tests de laboratoire officiels.

- Modalités de mise en œuvre

La réalisation du test LFIA est :

- facile: personnel ONCFS non qualifié pour le travail en laboratoire
- rapide (résultats disponibles en 20 minutes)
- utilisable sur le terrain
- nécessite un prélèvement sanguin chez l'animal anesthésié et immobilisé.

Le directeur général

Marc Mortureux

MOTS-CLES

Brucellose, bouquetin, dépistage, test rapide

BIBLIOGRAPHIE

Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM (1988) Techniques for the brucellosis laboratory. INRA Publications, Paris, France.

AFNOR (2009a) Norme U 47-003 - Recherche d'anticorps contre la brucellose par la technique de l'épreuve à l'antigène tamponné, AFNOR, avril 2009.

AFNOR (2009b) Norme U 47-004 - Recherche d'anticorps contre la brucellose par la microméthode de fixation du complément, AFNOR, avril 2009.

Corde Y, Drapeau A, Game Y, Maucci E, Hars J, Jaÿ M, Garin-Bastuji B (2014). A rapid test for evaluating *B. melitensis* infection prevalence in an Alpine ibex (*Capra ibex*) reservoir in the French Alps. In proceedings of the *Brucellosis 2014 International Research Conference, including the 67th Annual Brucellosis Research Meeting, Berlin, Allemagne, 9-12 septembre 2014* (Poster, abstract publié).

EU (2008). European Union: Council Directive of 28 January 1991 on animal health conditions governing intra-Community trade in ovine and caprine animals (91/68/EEC) In: 1991L0068- EN-03092008 - 012001, 2008: 1-34.

Garin-Bastuji B, Hars J, Drapeau A, Cherfa MA, Game Y, Le Horgne JM, Rautureau S, Maucci E, Pasquier JJ, Jay M, Mick V (2014) "Reemergence of *Brucella melitensis* in wildlife, France". *Emerg. Infect. Dis.* 20(9).

Mailles A, Rautureau S, Le Horgne JM, Poignet-Leroux B, d'Arnoux C, Denetière G, Faure M, Lavigne JP, Bru JP, Garin-Bastuji B (2012) Re-emergence of brucellosis in cattle in France and risk for human health. *Euro Surveill* 17(30): pii=20227.

OIE, 2014. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2014. Chapter 2.7.2. Caprine and Ovine Brucellosis (excluding *Brucella ovis*). OIE, Paris http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.02_CAPRINE_OVINE_BRUC.pdf

Mick V, Le Carrou G, Corde Y, Game Y, Jaÿ M, Garin-Bastuji B (2014) "*Brucella melitensis* in France: MLVA suggests the persistence in wildlife and a probable spill-over from Alpine ibex to domestic animals and humans". *PLoS ONE.* 9(4):e94168.

ONT CONTRIBUE A CETTE ETUDE

- Laboratoire National de Référence pour la brucellose animale, Laboratoire de Santé animale, ANSES, Maisons-Alfort
- Laboratoire Départemental d'Analyses Vétérinaires de la Savoie (LDAV73), Chambéry
- Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage (ONCFS), Gières
- Laboratoire Vétérinaire Départemental de Haute-Savoie (LIDAL 74), Seynod