

**ETUDE PILOTE DE LA PREVALENCE DE L'INFECTION PAR L'ESB
PAR L'USAGE D'UN TEST RAPIDE DANS DES POPULATIONS
BOVINES CIBLEES**

Maisons-Alfort, le 8 juin 2000

ETUDE PILOTE DE LA PREVALENCE DE L'INFECTION PAR L'ESB PAR L'USAGE D'UN TEST RAPIDE DANS DES POPULATIONS BOVINES CIBLEES

OBJECTIFS ET PERSPECTIVES

Première partie - Le contexte

- Le dispositif actuel d'épidémiosurveillance
- L'apport des nouveaux tests

Deuxième partie - Les objectifs

- Les objectifs généraux
- Orientations proposées par le Comité Interministériel sur les ESST
- Les objectifs de l'étude pilote

Troisième partie - Les études en perspective

- Protocole de comparaison des tests rapides entre eux
- Etude cas-témoin (épidémiologie analytique)
- Etudes additionnelles

Conclusion

Première partie - Contexte

Le dispositif actuel d'épidémirosurveillance

La prévention de la transmission de l'ESB à l'homme repose sur un ensemble de mesures visant à écarter de la consommation humaine et animale les tissus provenant d'animaux susceptibles d'être contaminés. Outre les modifications concernant l'alimentation animale, ces mesures comprennent l'éviction des animaux malades détectés par le système d'épidémirosurveillance passive et l'éviction des tissus « à risque », compte-tenu des connaissances disponibles sur l'infectiosité des tissus.

L'efficacité de ce dispositif repose donc principalement sur sa capacité à bien détecter les animaux susceptibles d'être infectés. Deux limites existent à cette détection :

- la performance du système de surveillance lui-même dans sa capacité à détecter efficacement l'ensemble des animaux présentant des signes cliniques ;
- l'impossibilité actuelle de détecter des animaux en phase d'incubation et la méconnaissance du nombre d'animaux dans ce cas.

En outre, la mesure d'abattage de la cohorte, appliquée dans certains pays, ou de l'ensemble du troupeau, appliquée en France, repose sur le fait que ces animaux sont susceptibles d'avoir été exposés aux mêmes facteurs de risque que le cas diagnostiqué. L'évolution des connaissances scientifiques dans ce domaine et une meilleure connaissance des voies de transmission permettront de disposer de données sur cette question.

Tableau 1 : Bilan de fonctionnement du réseau ESB sur l'année 1999
Laboratoire de pathologie bovine - AFSSA

| Motif | Nombre d'analyses | Négatifs | Positifs | En cours |
|-----------------------------|-------------------|------------|-----------|-----------|
| Suspicion cliniques | 96 | 68 | 26 | 2 |
| Abattages d'urgence | 52 | 24 | 1 | 27 |
| Bovins rage négatifs * | 34 | 34 | 0 | 0 |
| Suisse Portugal ** | 19 | 16 | 1 | 2 |
| Surveillance complémentaire | 75 | 19 | 1 | 55 |
| Total | 276 | 161 | 29 | 86 |

* Animaux atteints cliniquement testés négatifs pour la rage

** Animaux originaires de Suisse et du Portugal

Suspicions écartées sans prélèvement : 32

L'apport des nouveaux tests

- ♦ **Rappel des méthodes actuellement utilisées :**

L'identification des cas d'ESB repose sur la détection des cas cliniques et sur l'application de méthodes conventionnelles de diagnostic, comme rappelé dans l'avis du 2 Mars 2000 du comité interministériel sur les ESST. Dans la perspective d'une meilleure surveillance et d'une meilleure détection de l'ESB, les méthodes utilisées présentent plusieurs limites importantes.

- 1) Les limites de réalisation:

Ces méthodes sont de réalisation lourde en raison du matériel nécessaire et des délais. Elles ne sont valides que pratiquées *post mortem* et à partir de fragments de tissu provenant du système nerveux central.

Elles imposent le plus souvent des délais longs pour l'obtention des résultats peu compatibles avec un dépistage à grande échelle. Ces méthodes n'ont donc été adaptées qu'à un système d'épidémirosveillance passive qui permet d'apprecier la prévalence reposant sur la détection de cas suspects.

- 2) Les contraintes de conservation

Certaines contraintes de conservation des prélèvements peuvent gêner l'interprétation des résultats.

- 3) Les limites de sensibilité :

La plupart de ces méthodes sont peu sensibles. Ce sont plus des méthodes diagnostiques que des méthodes de dépistage puisqu'elles permettent d'établir un diagnostic à partir d'une suspicion clinique ; en particulier, ces méthodes peuvent ne pas être assez sensibles pour détecter des animaux en phase d'incubation.

Aujourd'hui, on pratique chaque année environ 280 tests, la plupart à partir de suspicions cliniques. Cependant, quelques tests sont pratiqués chez des animaux abattus d'urgence, sans que ceux ci n'aient présenté de signes cliniques ;

- ♦ **Les perspectives ouvertes par les nouveaux tests**

Ces tests dits « rapides » sont suffisamment sensibles pour permettre la réalisation de diagnostics en phase précoce d'incubation. Trois tests dits « rapides » ont été validés par la commission européenne en juillet 1999. Ils présentent les caractéristiques suivantes :

- ✓ Leur réalisation plus facile permet de faire un nombre plus important de tests et d'envisager de pratiquer des stratégies actives de dépistage fondées sur la recherche systématique, au sein de populations ciblées ou non, d'animaux en phase d'incubation.

- ✓ Il est cependant difficile de savoir, aujourd'hui, si les tests actuellement disponibles présentent des gains de sensibilité significatifs par rapport aux méthodes conventionnelles en particulier chez les animaux en phase d'incubation.

- ✓ Enfin, ces tests, comme les méthodes conventionnelles, présentent les mêmes difficultés de recueil des échantillons en condition *post mortem* et n'ont été validés que pour le système nerveux central.

En résumé, les nouveaux tests dits « rapides » permettent surtout de dépasser la limite inhérente aux délais d'obtention des résultats et à la complexité des manipulations nécessaires à la réalisation des tests conventionnels même si, pour certains d'entre eux, un gain en sensibilité est probable mais non démontré à ce jour dans les conditions d'utilisation plus larges de ces tests. Ils permettent donc d'envisager des stratégies de dépistage beaucoup plus puissantes que les stratégies actuelles débouchant, à terme, sur des programmes d'épidémirosurveillance active.

Deuxième partie - Objectifs

Les objectifs généraux

La mise à disposition des différents tests conventionnels et des tests dits « rapides » permet d'envisager la poursuite des objectifs épidémiologiques et scientifiques suivants :

- Objectif d'épidémiologie descriptive où il s'agit de déterminer la prévalence de l'infection par l'agent de l'ESB, dans des populations qui peuvent être, dans un premier temps ciblées. Cette démarche s'inscrit dans le programme européen en prévision sur l'étude de la prévalence de l'infection ESB dans les différents pays de la communauté européenne.

- Objectif d'épidémiologie analytique dont le but est d'identifier les différents facteurs de risque intervenant dans la survenue des cas d'ESB au sein du cheptel français

- Objectifs scientifiques qui peuvent se décliner sur différents thèmes

- ❖ Comparaison des performances des tests dits « rapides » par rapport à celles des tests conventionnels
- ❖ Comparaison des performances des tests dits « rapides » entre eux
- ❖ Capacité de ces tests dits « rapides » à détecter la maladie en phase d'incubation chez des animaux appartenant à des populations ciblées ou à un échantillon aléatoire et au sein du troupeau d'où serait issu un animal malade ou détecté positif
- ❖ A terme, mise en évidence de l'infectiosité de tissus autres que le système nerveux central , ce qui ne serait envisageable qu'une fois ces tests validés pour d'autres tissus, ce qui n'est pas le cas actuellement.

Tous ces objectifs peuvent concourir à l'enjeu de santé publique visant à assurer la plus grande protection du consommateur au regard du risque d'ESB. En effet, l'ensemble de ces travaux devrait permettre une appréciation du nombre d'animaux malades susceptibles d'être, à l'heure actuelle, introduits dans la chaîne alimentaire, sachant qu'en tout état de cause, le dispositif français portant d'une part sur les mesures concernant l'alimentation animale, d'autre part sur l'éviction des matériaux à risque spécifiés, vise précisément à tenir compte de cette hypothèse et à ériger une mesure de protection supplémentaire, par rapport à la détection clinique des animaux malades ;

Les orientations proposées par le comité interministériel sur les ESST

Dans son avis du 2 Mars 2000, le comité interministériel sur les ESST a proposé un programme d'étude pour la surveillance de l'épidémie d'ESB en France. Comme le souligne le comité, « *l'évolution de l'épidémie d'ESB en France pose, en outre, au moins trois questions majeures :* »

- 1- *Quelle est l'origine de la contamination des bovins NAIF ?*
- 2- *Quelle sera l'évolution de l'épidémie d'ESB en France ?*
- 3- *Sur la base des travaux et données sur l'épidémie de nvMCJ au Royaume-Uni, doit-on considérer que l'épidémie de ESB en France entraîne un risque de nvMCJ que l'on ne peut considérer comme négligeable ?*

Pour aider à répondre à ces trois questions, toutes les études nécessaires à l'évolution de l'épidémie d'ESB en France doivent être mises en œuvre dans les meilleurs délais. »

Dans ce contexte, le comité définit comme prioritaires trois objectifs :

- ➔ « *L'objectif premier : est d'estimer la prévalence des résultats positifs des tests de dépistages de PrP-res dans certains groupes à risque du cheptel bovin français, afin de fournir les bases d'une analyse de la sécurité des aliments et de définir, si nécessaire, une meilleure maîtrise du risque associé pour la santé publique.* » Dans l'optique de cette estimation de la prévalence de l'ESB, la stratégie proposée par le comité est « *d'étudier d'abord des populations de bovins dans lesquelles la prévalence de l'ESB pourrait être particulièrement élevée. Cette proposition paraît être une réponse adaptée à l'urgence des interrogations actuelles sur l'épidémie d'ESB en France. L'étude envisagée pourrait fournir des résultats dans un délai de 6 mois. Elle permettrait de disposer d'une estimation de la prévalence surestimant très vraisemblablement la fréquence de la maladie dans l'ensemble du cheptel bovin. Si la prévalence observée dans le cadre de cette étude est basse, il pourrait ne pas être nécessaire d'étendre l'enquête à d'autres populations de bovins. Si la prévalence observée est élevée, il pourrait alors être important d'avoir une estimation plus représentative de la prévalence de la maladie dans l'ensemble du cheptel bovin français.*

A la lumière de l'étude réalisée en Suisse, deux premières catégories d'animaux ont, comparativement à l'ensemble du cheptel, un risque à priori plus élevé d'être atteints d'ESB : les bovins de plus de deux ans morts et les bovins de plus de deux ans abattus d'urgence. Ce risque devrait être encore plus élevé si l'étude est réalisée dans des régions à forte incidence d'ESB (seuls seront examinés des bovins de plus de deux ans car il est très peu probable de détecter avant cet âge de PrP-res dans le cerveau d'animaux qui auraient été infectés dans leurs premières semaines de vie). Dans les zones retenues pour la réalisation de cette étude, il est important d'étudier l'ensemble des animaux éligibles, afin d'éviter tout biais de sélection. Les contrôles permettant de s'assurer de l'exhaustivité de l'étude dans les zones retenues devront être mis en place. »

« Les régions de Bretagne, Basse Normandie et Pays de Loire totalisent 80% des cas français d'ESB (et 75% des cas NAIF). Les données disponibles indiquent qu'il serait possible, en réalisant l'étude dans ces trois régions, d'obtenir en quelques mois le nombre d'animaux nécessaires, sous l'hypothèse d'une prévalence de 0,1 pour 1000. »

→ Le deuxième objectif : est complémentaire et indissociable du premier. Il s'agit de l'analyse comparative du test rapide retenu et du Western blot conventionnel chez des animaux « tout venant ».

→ Enfin le troisième objectif : est d'adapter la méthodologie d'utilisation des tests rapides, développés au laboratoire, aux conditions du terrain dans les catégories pré-définies (abattages d'urgence, animaux morts et animaux abattus normalement dans des régions pilotes).

Les objectifs de l'étude pilote « 40 000 »

◆ Objectif principal

Si, dans la rédaction initiale du protocole, telle qu'elle a été transmise le 2 mars 2000, apparaît simultanément l'objectif d'une appréciation de la prévalence et la connaissance comparative des performances des tests rapides, il apparaît à la lumière des réflexions de ces derniers mois, qu'il convient de dissocier ces deux objectifs et de s'attacher à y répondre par deux protocoles distincts.

L'étude pilote a pour objectif principal une appréciation de la prévalence de l'infection par l'agent de l'ESB dans des populations à risque. Son premier intérêt réside dans la réalisation d'une étude exhaustive des populations éligibles pendant une période suffisamment longue, de six à neuf mois.

Cet objectif de prévalence pourrait apporter les informations suivantes :

- Apprécier l'efficacité du dispositif d'épidémirosurveillance passive, en vigueur en France.

A l'instar des éléments tirés de l'expérience réalisée en Suisse en 1999, le protocole devrait permettre de mesurer l'écart entre le nombre de cas détectés par le système classique d'épidémirosurveillance passive et cet examen systématique de certaines catégories d'animaux s'intégrant dans un système de surveillance active.

- Avoir des éléments de description sur des niveaux de prévalence par catégories d'animaux.

Si ce protocole devait permettre de détecter des cas supplémentaires, il devrait également donner des informations précieuses sur les catégories d'animaux dans lesquels se situent ces cas supplémentaires, en termes d'âge et d'origine géographique.

- Avoir des éléments d'information sur l'existence d'animaux atteints détectés en phase d'incubation .

Cet objectif dépend des performances du test rapide qui sera utilisé dans cette étude pilote, de la qualité du recueil des prélèvements et des informations cliniques et épidémiologiques et, enfin, de la capacité d'interprétation de ces données.

◆ Objectifs spécifiques

Les objectifs spécifiques de l'étude pilote sont de deux ordres :

- Comparaison de certains critères des performances du test rapide qui sera choisi pour l'étude pilote à celles des tests conventionnels que sont l'histologie, le western blot conventionnel et l'immuno-histochimie. La mise en évidence potentielle de résultats divergents entre ces deux familles de tests devrait induire des travaux complémentaires pour déterminer la signification et les mesures spécifiques qu'ils appellent.

- Mise au point et validation de l'organisation pratique d'un dépistage à grande échelle au travers de procédures de prélèvements et de laboratoires dont les performances seront éprouvées au cours de cette étude.

Comme cela est indiqué dans l'avis du comité interministériel du 2 mars 2000, il est nécessaire de connaître les performances des tests dans des conditions réelles. On dispose à l'heure actuelle :

- des résultats de l'évaluation européenne, qui a été réalisée dans des conditions de laboratoire et sur des animaux cliniquement malades;
- des résultats communiqués par les autorités sanitaires suisses.

Troisième partie - Etudes en perspective

Au-delà et à partir de la dynamique mise en place par l'étude pilote, des protocoles additionnels pourront venir compléter le dispositif français d'investigation de l'infection par l'agent de l'ESB. En effet, pour des raisons méthodologiques, il ne paraît pas possible d'alourdir davantage les objectifs déjà conséquents de l'étude pilote. A cet égard, le fait de constituer une banque de prélèvements centralisée est en soi un objectif utile pour la mise en œuvre d'autres protocoles scientifiques et/ou épidémiologiques.

Protocole de comparaison des tests rapides entre eux

Il est indispensable d'avoir des éléments d'appréciation permettant de mieux connaître les performances comparatives des tests rapides reposant sur des technologies différentes des tests conventionnels. Pour des raisons méthodologiques, cette évaluation initialement prévue dans le cadre de l'étude pilote sur 4000 prélèvements, fera l'objet d'un protocole à part entière qui sera mené en fin d'étude pilote et sur le matériel collecté pendant celle-ci.

Il convient de noter que les protocoles de comparaison des performances entre plusieurs tests nécessiteront d'être réalisés en deux temps.

- Dans un premier temps

Les échantillons prélevés devront avoir été testés par les deux ou trois méthodes à comparer, avec un échantillonnage suffisant pour que la comparaison puisse produire des résultats statistiques pertinents et exploitables. Une stratégie possible serait de constituer une banque des 40 000 prélèvements de l'étude pilote et de tester à nouveau ces aliquots, sur un échantillonnage à définir, en utilisant les deux ou trois tests rapides à disposition. Cette étude comparative pourrait conduire à la mise en évidence de résultats divergents.

- Dans un deuxième temps

Il conviendrait de pouvoir interpréter la signification de cette divergence, ce qui en l'état actuel des méthodes disponibles nécessite de mettre en œuvre une inoculation à la souris des tissus pour démontrer leur infectiosité .

Etude cas-témoin (épidémiologie analytique)

Pour comprendre l'origine des cas naïfs, on ne dispose à l'heure actuelle que des résultats des données issues des enquêtes rétrospectives réalisées dans les élevages dont sont issus les cas.

Une étude cas-témoin permettrait de répondre à cet objectif en identifiant les facteurs de risque auxquels auraient pu être exposés les animaux dépistés positifs par rapport à d'autres animaux répertoriés et négatifs. Le protocole de cette étude a déjà fait l'objet d'une validation scientifique.

Autres objectifs donnant lieu à des études additionnelles

D'autres objectifs pourront être poursuivis dans le cadre d'études additionnelles à préciser, sur le plan scientifique comme de la faisabilité technique :

- Mise en évidence d'éventuels cas secondaires dans les troupeaux
- Mesure de l'infectiosité dans d'autres tissus
- Détection d'éventuels cas dans d'autres catégories de bovins

Conclusion

L'étude pilote « 40 000 » est conçue comme un protocole s'intégrant dans un programme plus général de surveillance de l'encéphalopathie spongiforme bovine, concourant aux objectifs rappelés ci-dessus.

Les résultats de cette étude, lorsqu'ils seront validés sur le plan scientifique par le comité scientifique de suivi instauré par l'Agence française de sécurité alimentaire, seront soumis au comité interministériel sur les ESST. Celui-ci, dans le cadre de la réévaluation du dispositif français de prévention de l'ESB demandée à l'Afssa, donnera un avis sur les suites à donner à cette étude.

