

Maisons-Alfort, le 31 mai 2002

AVIS

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments
concernant le choix entre les tests de dépistage des ESST chez les petits ruminants**

Considérant que, dans le cadre de la mise en place du dépistage des ESST chez les petits ruminants, et suite à des travaux préliminaires menés par le laboratoire de référence de l'Afssa à Lyon¹ démontrant un écart de sensibilité analytique important en faveur du test Biorad par rapport au test Prionics, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments a consulté le Comité d'experts spécialisé sur les ESST le 30 avril sur les questions suivantes :

- 1) *Les résultats obtenus par le laboratoire national de référence de l'Afssa à Lyon sont-ils de nature à modifier le sens ou la formulation des conclusions concernant les tests rendues dans l'avis du 15 février 2002 sur les programmes de dépistage ?*
- 2) *Ces résultats sont-ils suffisants pour conclure sur la comparaison des performances analytiques des deux tests ? Si non, quels seraient les résultats supplémentaires à obtenir pour éclairer la question du choix des tests, dans la mise en œuvre du programme de dépistage chez les petits ruminants ?*
- 3) *Indiquer si le comité estime qu'il y a suffisamment d'éléments pour aborder les mêmes questions chez les bovins.*

Considérant que, la réponse du Comité, en date du 22 mai, est la suivante :

« La mise en œuvre d'une surveillance active de la tremblante des petits ruminants repose sur l'utilisation des tests de dépistage rapide déjà utilisés pour l'ESB chez les bovins, dans la mesure où ces différents tests permettent aussi de détecter la protéine prion pathologique chez le mouton ou chez la chèvre.

Dans son avis du 15 février 2002 relatif au protocole de l'enquête par sondage prévue chez les petits ruminants, et désormais en cours, le Comité avait écrit qu'il était « indispensable, de se limiter à un seul test pour réaliser ce programme » et que « il serait utile qu'une étude de sensibilité analytique² des tests disponibles portant sur le dépistage des ESST chez les petits ruminants soit réalisée rapidement pour guider le choix sur des arguments ... objectifs ... ».

En effet, il n'existe pas de données concernant la validation de ces tests en terme de sensibilité analytique², sensibilité³ et de spécificité telle que celle qui a été réalisée en

¹ Résultats transmis à la Direction générale de l'alimentation dans une note en date du 10/4/02

² Sensibilité analytique : concentration minimale de PrPres détectée, mesurée par la dilution maximale trouvée positive à partir d'un homogénat de matériel biologique infecté

³ Sensibilité : proportion d'animaux repérés parmi les animaux infectés

1999 chez les bovins, par comparaison avec la méthode de diagnostic histologique. Il peut être noté que la Commission Européenne prépare une étude spécifique dans ce domaine dont les résultats pourraient être obtenus au second semestre 2002.

La sensibilité analytique² des tests Biorad et Prionics a donc été étudiée par le laboratoire de référence de l'Afssa-Lyon à partir de dilutions successives d'homogénats de matériel cérébral positif provenant de quatre moutons (deux de génotype ARQ/ARQ et deux de génotype VRQ/VRQ), ainsi que d'une chèvre, atteints de tremblante et confirmés par examen histologique. Après dilution dans un homogénat de cerveau négatif, les homogénats ont été analysés par les tests commerciaux conformément aux recommandations des fournisseurs. La comparaison des résultats obtenus avec les deux tests indique que le test Biorad a permis de détecter la protéine prion anormale sur des dilutions de 4 à 64 fois plus importantes par comparaison au test Prionics, ce qui correspond à un écart de sensibilité analytique important entre les deux tests.

Le Comité a été saisi par l'Afssa en date du 30 avril 2002 afin de répondre aux questions suivantes :

- les résultats obtenus par le laboratoire de référence de l'Afssa à Lyon sont-ils de nature à modifier le sens ou la formulation des conclusions concernant les tests rendues dans l'avis du 15 février 2002 sur les programmes de dépistage ?
- ces résultats sont-ils suffisants pour conclure sur les performances analytiques de ces deux tests ? Sinon, quels seraient les résultats supplémentaires à obtenir pour éclairer la question du choix des tests dans la mise en œuvre du programme de dépistage chez les petits ruminants ?
- indiquer si le Comité estime qu'il y a suffisamment d'éléments pour aborder les mêmes questions chez les bovins.

Analyse des résultats

Les données obtenues par l'Afssa répondent aux questions formulées dans l'avis du 15 février 2002 sur le protocole de l'enquête de prévalence des ESST chez les petits ruminants concernant le choix des tests. Cet avis envisageait en effet la nécessité d'étude de la sensibilité analytique des tests de dépistage chez les petits ruminants afin de pouvoir guider leur choix pour les programmes de surveillance. En effet, la sensibilité d'un test pourrait être plus élevée si sa sensibilité analytique était plus élevée.

Les répercussions attendues en terme de sensibilité³ d'un test sont cependant d'autant plus importantes que l'accumulation de la protéine prion pathologique est plus précoce et plus progressive dans les tissus d'un animal infecté. Chez les petits ruminants, les données connues de la pathogénie de la tremblante montrent des éléments de complexité supplémentaires en comparaison avec l'encéphalopathie bovine chez les bovins, à savoir :

- l'existence de facteurs génétiques de sensibilité (génotype PrP) qui peuvent modifier considérablement la cinétique d'accumulation de la protéine prion pathologique dans les différents tissus,

- *l'existence de souches de prions différentes,*
- *l'atteinte précoce du système lymphoïde, dont la mise en évidence nécessite l'utilisation de tests possédant une importante sensibilité analytique.*

Certaines observations expérimentales suggèrent que la protéine prion anormale peut être détectée de façon précoce dans le système nerveux central chez le mouton, parfois longtemps avant l'apparition des manifestations cliniques de la maladie. Ainsi, des ovins de génotype VRQ / VRQ, naturellement exposés à l'agent de la tremblante, ont été euthanasiés séquentiellement (4 ovins par classe d'âge). La PrPsc a été détectée par immunohistochimie :

- *à 9 mois, dans le noyau dorsal du vague (Andréoletti et al. 2000),*
- *à 10 mois, dans les segments médullaires thoraciques Th7 - Th10,*
- *entre 13 et 16 mois, dans les segments médullaires Th3 – Th7 et Th7 - S1.*

Les premiers signes cliniques ont été observés vers 18 – 22 mois. La présence de PrPsc dans le névraxe est donc détectable, de façon très localisée, environ à mi période d'incubation. Dans les mêmes conditions, le tissu lymphoïde iléal était positif dès l'âge de 2 mois.

Une autre étude a concerné l'infection expérimentale de moutons de génotype ARQ/ARQ par l'agent de l'ESB (Jeffrey et al. 2001). Alors que les premiers signes cliniques ont été observés à partir de 21 mois après l'épreuve expérimentale réalisée par voie orale, la présence d'une accumulation localisée de PrPsc a été détectée dans le cerveau par immunohistochimie chez certains animaux sacrifiés 16 mois après cette épreuve expérimentale.

La démonstration définitive de la sensibilité³ supérieure de l'un des tests de diagnostic ne pourrait être établie que par l'analyse des résultats obtenus par ces différents tests sur les mêmes animaux dans un protocole spécifiquement établi pour cet objectif.

Enfin, les résultats analysés correspondaient à des échantillons de petits ruminants et ne permettent pas de répondre à la question posée sur les bovins.

Avis

Le Comité confirme l'avis exprimé le 15 février 2002 sur la nécessité d'utiliser un seul test pour la réalisation de l'enquête de prévalence chez les petits ruminants, et d'étayer ce choix sur la base de l'interprétation des données disponibles.

Compte tenu du fait qu'il n'existe pas d'argument en faveur du fait que la robustesse et la spécificité des deux tests chez les petits ruminants soient différentes de celles enregistrées lors de leur utilisation en routine chez les bovins, et considérées comme acceptables et de même niveau pour les deux tests, le choix optimal sur le critère de la performance du dépistage est de retenir le test ayant la meilleure sensibilité analytique², c'est à dire le test Biorad. Les données scientifiques suggèrent en effet que, chez les petits ruminants, cette meilleure sensibilité analytique devrait se traduire par une meilleure sensibilité³ en terme de dépistage, c'est à dire une meilleure

capacité à dépister des animaux infectés, sans qu'il soit néanmoins possible en fonction des données actuelles de quantifier l'écart entre ces deux tests sur ce critère.

Sans qu'il s'agisse d'un préalable au choix du test ayant la meilleure sensibilité analytique, la quantification de l'écart en terme de sensibilité du dépistage pourrait s'appuyer sur les données suivantes :

- étude de la cinétique d'accumulation de la PrPres détectée par les deux tests chez des animaux en cours d'incubation, dont les prélèvements sont disponibles (Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse),
- recherche de PrPres par les deux tests chez les animaux abattus dans les troupeaux sous police sanitaire⁴,
- analyse des résultats obtenus par chacun des deux tests de dépistage dans le cadre de l'enquête de prévalence en cours, confrontée aux résultats obtenus par les tests biochimiques ou/et immunohistochimiques de confirmation, dans les limites de la comparabilité des populations de petits ruminants étudiées par chacun des tests,
- analyse des échantillons trouvés positifs par l'un des tests de dépistage par l'autre test, permettant de préciser la fréquence des discordances entre ces tests à l'échelon individuel.

La robustesse de ces deux tests sur des prélèvements dégradés pourrait faire l'objet d'une étude spécifique sur des prélèvements initialement positifs, après une phase ultérieure d'autolyse. »

Références

ANDRÉOLETTI,O., BERTHON,P., MARC,D. & SARRADIN,P. (2000) Early accumulation of PrPsc in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *Journal of General Virology*, **81**, pp. 3115-3126.

JEFFREY,M., RYDER,S., MARTIN,S., HAWKINS,S.A., TERRY,L., BERTHELIN-BAKER,C. & BELLWORTHY,S.J. (2001) Oral inoculation of sheep with the agent of bovine spongiform encephalopathy (BSE). 1. Onset and distribution of disease-specific PrP accumulation in brain and viscera. *J.Comp Pathol.*, **124**, pp. 280-289.

Au vu des conclusions apportées par le CES aux questions qui lui étaient posées, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments :

- recommande que la surveillance active des ESST chez les petits ruminants⁵, initiée avec deux tests, soit poursuivie, dès que possible, avec un seul test, à savoir celui présentant la meilleure sensibilité analytique ;

⁴ dans lesquels la probabilité de trouver des animaux en incubation est plus élevée que dans la population générale

- étudiera, avec les autres organismes concernés, comment réaliser les travaux complémentaires recommandés par le Comité d'experts spécialisé.

Martin HIRSCH

⁵ Ces résultats et ces préconisations concernent exclusivement le dépistage des ESST chez les petits ruminants et n'apportent aucune précision sur la pertinence de l'utilisation des deux tests dans le dépistage de l'ESB chez les bovins