

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



*Euro*Reference

Les cahiers de la Référence

Été 2013

Numéro 10



anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



*Euro*Reference

Les cahiers de la Référence

Cahier numéro 10

Été 2013

Éditorial

Ce nouveau numéro d'Euroreference fait un focus sur le Laboratoire de référence de l'Union européenne pour les parasites. Localisé à Rome (Italie) depuis 2006, le LR-UE travaille sur les helminthes et les protozoaires zoonotiques. Essais inter-laboratoires d'aptitude, formation, activités de diagnostic et de normalisation des méthodes d'analyse font partie de son quotidien. Un retour épidémiologique sur la prévalence de quatre espèces de vers du genre *Trichinella* circulant en Europe vous est proposé.

Dans ce numéro, deux articles présentent des évolutions majeures de la réglementation européenne : le premier, publié dans la rubrique Focus, développe l'application de la nouvelle réglementation européenne relative à la protection des animaux et les contraintes qu'elle impose pour les expérimentations animales dans les laboratoires de recherche et de référence ; le second article présente la révision du règlement européen n°882-2004 relatif aux contrôles officiels. Il sera plus longuement détaillé dans le prochain numéro d'Euroreference.

Le Point de vue vous présente un exemple de séquençage des génomes, méthode d'avenir pour les laboratoires de diagnostic et de référence en microbiologie, illustré ici par une application à la métrite contagieuse équine.

Ce numéro, riche de sa diversité, fait également un retour sur deux ans d'essais inter-laboratoires de diagnostic de la rage au moyen de différentes méthodes. Il revient également sur les journées d'échange de la référence française, dans les domaines de la santé animale, de la sécurité sanitaire des aliments et de la santé des végétaux.

Un peu plus d'un an après l'amorce d'une nouvelle phase dans la vie d'Euroreference, nous sommes sur le point de réussir nos objectifs. Trois membres européens (Italie, Belgique et EPPO - European & Mediterranean Plant Protection Organization), et bientôt un quatrième (Pologne), ont rejoint le comité de rédaction. Nous leur souhaitons la bienvenue dans la vie et l'animation du journal. Les deux précédents numéros thématiques, solides et consistants, sont venus soutenir notre démarche et élargissent le lectorat de la revue. Le prochain numéro thématique sera probablement consacré, en 2014, aux réseaux de surveillance des pathogènes et contaminants en Europe.

Nous espérons que vous aurez plaisir à lire ce numéro d'Euroreference et qu'il sera une source d'informations pour vos travaux professionnels.

La rédaction

Au sommaire



Focus

Laboratoire de référence de l'Union européenne pour les parasites (LR-UE-P)

Page 2

Application en droit français de la nouvelle réglementation européenne relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques : Quels progrès pour l'animal ? Quelles contraintes pour la recherche ?

Page 9



Point de vue

Le séquençage complet des génomes, un investissement rationnel pour le développement d'outils de diagnostic et d'épidémiologie : l'exemple de la métrite contagieuse équine

Page 12



Actualités

Journée de la référence : une centaine de personnes réunies

Page 15

Conférence scientifique annuelle 2013 de Med Vet Net

Page 16

Bref compte-rendu du 2^e atelier de l'OEPP destiné aux responsables de laboratoire de diagnostic phytosanitaire

Page 16

Préparation d'un corpus législatif européen sur les contrôles officiels : des animaux et des végétaux plus sains et une filière agroalimentaire plus sûre

Page 17



Réseaux

Étude de deux ans portant sur les résultats d'essais inter-laboratoires de diagnostic de la rage (test d'immunofluorescence, test d'inoculation à une culture cellulaire pour le diagnostic de rage, test d'inoculation à la souris, techniques de PCR) : point de départ pour l'harmonisation des méthodes

Page 18



Agenda

Réunion scientifique annuelle 2013 d'Epizone

Page 27



Focus

Laboratoire de référence de l'Union européenne pour les parasites (LR-UE-P)

Edoardo Pozio (edoardo.pozio@iss.it), Alessia Possenti, Gianluca Marucci, Fabio Galati, Patrizia Rossi, personnel du LR-UE-P (Marco Amati, Simone Cacciò, Adriano Casulli, Simona Cherchi, Maria Angeles Gomez Morales, Maria Interisano, Marco Lalle, Giuseppe La Rosa, Alessandra Ludovisi, Anna Rosa Sannella, Furio Spano, Daniele Tonanzi, Fabio Tosini)

Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italie

Le Laboratoire de référence de l'Union européenne pour les parasites (LR-UE-P) a été mis en place à l'Istituto Superiore di Sanità (Institut supérieur de la santé) de Rome (Italie) en juillet 2006. Le LR-UE-P est certifié conforme à la norme ISO/CEI 17025:2005 et il a déposé une demande de certification en tant que prestataire d'essais interlaboratoires d'aptitude conformément à la norme ISO/CEI 17043 : 2010. Les principaux parasites cibles sont les helminthes zoonotiques des genres *Trichinella*, *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Echinococcus*, *Taenia*, *Diphyllobotrium*, *Opisthorchis* et *Fasciola*, ainsi que les protozoaires zoonotiques des genres *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Sarcocystis* et *Toxoplasma*. Les principales missions du LR-UE-P consistent à soutenir et coordonner le réseau de Laboratoires nationaux de référence (LNR) pour les parasites, en fournissant des matériaux de référence, en identifiant les parasites transmis par les aliments, en formant le personnel des LNR et en organisant des essais interlaboratoires d'aptitude et des ateliers. Le LR-UE-P offre un appui scientifique en matière de parasites transmis par les aliments, auprès de la DG SANCO, de l'EFSA et de l'ECDC de la Commission européenne, ainsi qu'auprès d'organisations internationales telles que la FAO, l'OIE et l'OMS.

Introduction

Les parasites sont un groupe d'agents pathogènes pour l'Homme et les animaux qui comprend des organismes unicellulaires (protozoaires) et multicellulaires (helminthes et arthropodes). Certains de ces organismes sont transmis à l'Homme par la consommation d'aliments issus d'animaux infectés ou contaminés par ces agents pathogènes : il s'agit des parasites transmis par les aliments.

En 2005, la Direction générale de la santé et de la protection des consommateurs de la Commission européenne a lancé un appel à candidatures pour la désignation de laboratoires communautaires de référence (LCR, aujourd'hui appelés laboratoires de référence de l'Union européenne, LR-UE) actifs dans le domaine de la sécurité alimentaire et de la santé animale. Le réseau de LR-UE et de laboratoires nationaux de référence (LNR) constitue un outil essentiel dans le cadre du contrôle officiel des denrées alimentaires et des aliments pour animaux. Son rôle a été reconnu par le règlement (CE) n° 882/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 relatif aux contrôles officiels effectués pour s'assurer de la conformité avec la législation sur les aliments pour animaux et les denrées alimentaires.

La création du réseau de LR-UE/LNR pour les parasites transmis par les aliments constitue une excellente occasion d'harmoniser les méthodes et la surveillance épidémiologique des différents pays européens, d'échanger des matériaux de référence et d'organiser des essais interlaboratoires d'aptitude. Le LR-UE pour les parasites (LR-UE-P) a été mis en place en juillet 2006 (et renouvelé en 2011) à l'Istituto Superiore di Sanità (Institut supérieur de la santé) de Rome (Italie).

Les missions du LR-UE-P couvrent un large spectre de parasites : d'une part les protozoaires et les helminthes en circulation en Europe (**Tableau 1**), et d'autre part les parasites risquant d'être importés dans l'Union européenne (UE) par la filière agroalimentaire. Contrairement aux bactéries transmises par les aliments, dont la plupart contaminent les denrées alimentaires et les aliments pour animaux, bon nombre de parasites transmis par les aliments (par exemple, *Anisakis* spp., *Pseudoterranova* spp., *Trichinella* spp., *Echinococcus*

spp., *Taenia* spp., *Diphyllobotrium* spp., *Opisthorchis felinus*, *Toxoplasma gondii* et *Sarcocystis* spp.) se développent dans les tissus ou les organes de leurs hôtes ; toutes les mesures prises pour prévenir leur transmission doivent donc être mises en œuvre en priorité au stade de la production primaire, et non au stade de l'abattage ou de la transformation industrielle.

Les maladies provoquées par ces parasites chez l'Homme se caractérisent généralement par une longue période d'incubation (allant de plusieurs semaines à plusieurs années), un grand nombre d'infections asymptomatiques ou légères et, souvent, une chronicité (par exemple, échinococcose alvéolaire et kystique). Dans l'UE, le taux de mortalité due aux parasites transmis par les aliments demeure relativement faible.

Les parasites constituent une spécificité dans le domaine de la détection des agents pathogènes transmis par les aliments. En effet, il n'existe aucune méthode normalisée (normes ISO ou CEN) et les matériaux de référence certifiés font défaut. Ainsi, la plupart des méthodes de détection existantes sont élaborées en interne par des organismes de santé et de recherche publique, qui peuvent parfois fournir des matériaux de référence issus de leur propre stock.

Le LR-UE-P

Le LR-UE-P (<http://www.iss.it/crlp/index.php?lang=2>) a été mis en place à l'Unité des maladies parasitaires tissulaires et digestives du Service des maladies infectieuses, parasitaires et à médiation immune. Le LR-UE-P est certifié conforme à la norme ISO/CEI 17025:2005 et il a déposé une demande de certification en tant que prestataire d'essais interlaboratoires d'aptitude conformément à la norme ISO/CEI 17043:2010. Dix-huit personnes (neuf scientifiques et neuf techniciens) travaillent sur les parasites transmis par les aliments pour leur diagnostic (parasitologique, moléculaire, sérologique) chez les animaux, dans les aliments et chez l'Homme, la surveillance épidémiologique des zoonoses parasitaires d'origine alimentaire, l'organisation d'essais interlaboratoires d'aptitude (EILA), la formation du personnel d'États membres (EM) et de pays tiers, la mise au point de nouveaux outils diagnostiques, la production de matériaux de référence (par



Focus

Tableau 1. Parasites transmis par les aliments en circulation en Europe et parasites risquant d'être introduits en Europe par la filière agroalimentaire.

Protozoaires	Principaux hôtes	Mode(s) de transmission à l'Homme	Répartition en Europe	Gravité de l'infection chez l'Homme
<i>Cryptosporidium</i> spp.	bétail, faune sauvage, être humain	ingestion d'oocystes contaminant les végétaux, l'eau ou des vecteurs passifs, contact avec des animaux ou des êtres humains infectés	cosmopolite	asymptomatique à grave ; décès chez les individus immunodéprimés
<i>Giardia duodenalis</i>	être humain	ingestion de kystes contaminant les végétaux, l'eau ou des vecteurs passifs, contact avec des animaux ou des êtres humains infectés	cosmopolite	asymptomatique à légère, plus grave chez l'enfant
<i>Sarcocystis</i> spp.	bovin, porc (hôte intermédiaire), être humain (hôte définitif)	ingestion de bœuf ou de porc cru	cosmopolite	asymptomatique à modérée
<i>Toxoplasma gondii</i>	chat (hôte définitif), animaux homéothermes (hôtes intermédiaires)	ingestion de kystes tissulaires présents dans la viande crue, ingestion d'oocystes excrétés par les chats qui contaminent les végétaux, l'eau ou des vecteurs passifs	cosmopolite	asymptomatique à grave ; décès chez les fœtus et les individus immunodéprimés
Helminthes	Principaux hôtes	Mode(s) de transmission à l'Homme	Répartition en Europe	Gravité de l'infection chez l'Homme
<i>Dyphyllobotrium</i> spp.	poissons d'eau douce (hôtes intermédiaires), mammifères piscivores (hôtes définitifs)	ingestion de poissons d'eau douce crus	foyers infectieux en Estonie, Finlande, France, Grèce, Italie, Lituanie, Pologne, Suède	infection légère
<i>Taenia saginata</i>	bovin (hôte intermédiaire), être humain (hôte définitif)	ingestion de bœuf cru	cosmopolite	infection légère
<i>Taenia solium</i>	porc (hôte intermédiaire), être humain (hôte définitif)	ingestion de porc cru, ingestion d'œufs excrétés par des individus infectés	possibilité de petits foyers infectieux en Europe de l'Est	formes asymptomatiques (téniasis) à graves (neurocysticercose)
<i>Taenia multiceps</i>	mouton (hôte intermédiaire), chien, loup (hôte définitif)	ingestion d'œufs excrétés par des chiens	régions où les moutons sont appelés à brouter	formes asymptomatiques à graves (cénurose)
<i>Echinococcus granulosus</i>	mouton, chèvre, bovin, porc (hôte intermédiaire), chien (hôte définitif)	ingestion d'œufs excrétés par des chiens	prévalence en Europe du Sud	formes asymptomatiques à graves ; décès rare
<i>Echinococcus multilocularis</i>	rongeurs sauvages (hôtes intermédiaires), renard, chien viverrin, chien (hôte définitif)	ingestion d'œufs excrétés par des renards, des chiens viverrins, des chiens	prévalence en Europe centrale	formes asymptomatiques à graves ; décès rare
<i>Fasciola hepatica</i>	bovin, mouton	ingestion d'eau ou de plantes aquatiques crues contaminées par des larves de parasite immatures	cosmopolite	formes asymptomatiques à légères
<i>Opisthorchis felineus</i>	poissons d'eau douce (hôtes intermédiaires), mammifères piscivores (hôtes définitifs)	ingestion de poissons d'eau douce crus de la famille des cyprinidés	13 pays de l'UE	formes asymptomatiques à graves
<i>Anisakis</i> spp.	crustacés d'eau de mer, céphalopodes, poissons (hôtes intermédiaires), mammifères marins (hôtes définitifs)	ingestion de poissons d'eau de mer ou de céphalopodes crus	cosmopolite	formes asymptomatiques à graves ; allergies
<i>Trichinella</i> spp.	porc sauvage et domestique, carnivores	ingestion de viande crue	cosmopolite	formes asymptomatiques à graves ; décès rare



Focus

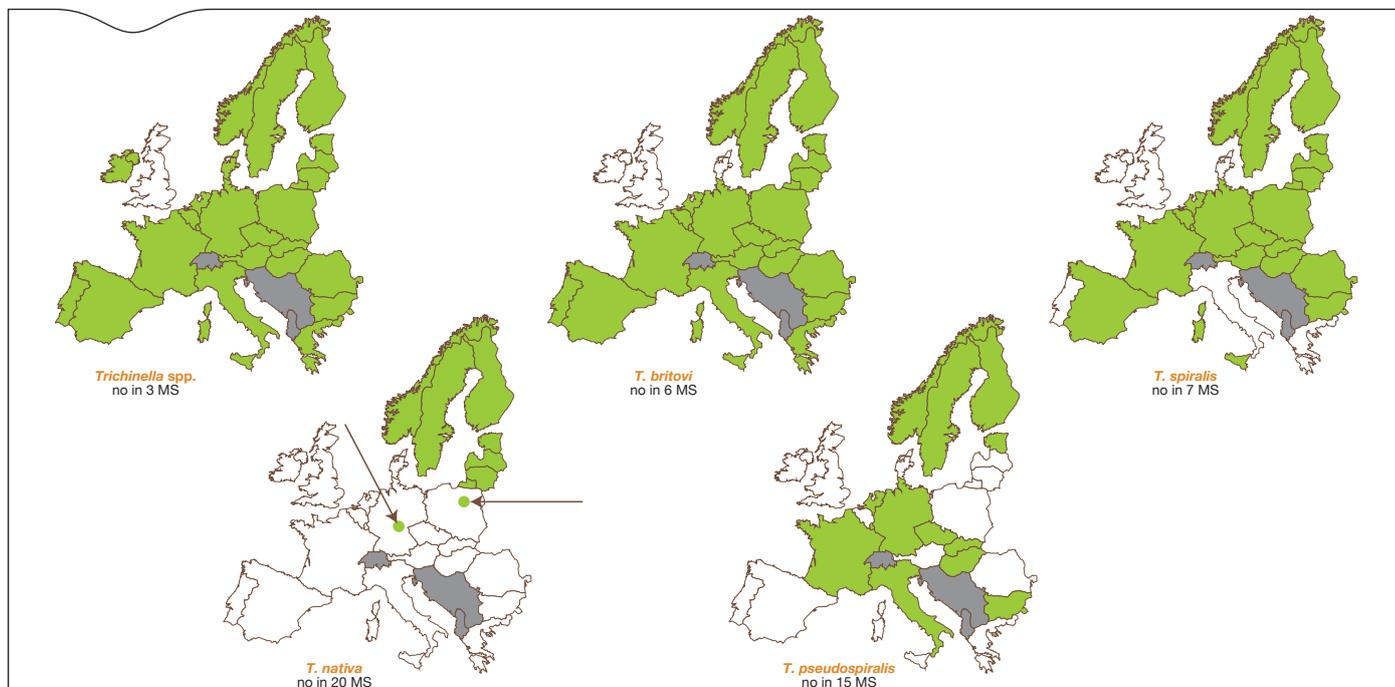


Figure 1. Répartition géographique des espèces de *Trichinella* en circulation dans les pays de l'Union européenne (EU). EM : État membre de l'UE ; EM vert : présence de *Trichinella* sp. ; EM blanc : absence de *Trichinella* sp. ; EM gris : État non membre de l'UE (légendes : no in 3 MS > non identifié dans 3 états membres)

exemple, souches de parasites, antigènes, acides nucléiques, sérums de référence), l'élaboration de normes ISO, la recherche fondamentale et appliquée, et l'appui technique et scientifique de la Commission européenne, du Centre européen pour la prévention et le contrôle des maladies (ECDC), l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE), l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et la Commission internationale sur la trichinellose (ICT).

Les principaux parasites transmis par les aliments en circulation en Europe (**Tableau 1**) ciblés par les contrôles sont les helminthes zoonotiques des genres *Trichinella*, *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Echinococcus*, *Taenia*, *Diphyllobotrium*, *Opisthorchis* et *Fasciola*, ainsi que les protozoaires zoonotiques des genres *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Sarcocystis* et *Toxoplasma* (Dakkak, 2010; Pozio, 2008; Pozio et al., 2013).

Parmi les nombreux parasites zoonotiques transmis par les aliments, le LR-UE-P consacre la majeure partie de ses efforts, de son temps et de ses moyens à ceux du genre *Trichinella*. En effet, bien que ces parasites ne constituent pas le principal problème de santé publique en matière de parasites zoonotiques en circulation en Europe, la législation européenne rend leur dépistage obligatoire chez tous les animaux sensibles destinés au marché européen (règlement de la Commission, 2005).

Épidémiologie de *Trichinella* spp. dans l'UE

Les nématodes du genre *Trichinella* infectent un large spectre d'animaux, sauvages et domestiques, ainsi que l'Homme, et qui présentent une répartition cosmopolite (Pozio, 2007). Dans l'UE, *Trichinella* spp. est transmis *via* un cycle selvatique dans la

plupart des EM, à l'exception de Chypre, de la Grande-Bretagne, du Luxembourg et de Malte, et *via* un cycle domestique dans certains foyers infectieux de Bulgarie, de Hongrie, de Lituanie, de Pologne, de Roumanie et d'Espagne.

Quatre espèces du genre *Trichinella* circulent en Europe (**Figure 1**). *Trichinella spiralis* présente une forte prévalence chez le porc domestique et le sanglier et une plus faible prévalence chez les animaux carnivores tels que le renard commun, le chien viverrin ou les mustélidés. La répartition de cette espèce se caractérise par des foyers localisés dans 19 EM; elle n'a jamais été observée au Danemark, en Grèce, en Italie et au Portugal (**Figure 1**). *Trichinella britovi*, espèce la plus répandue en UE, n'a jamais été détectée au Danemark, en Irlande et en Irlande du Nord (Royaume-Uni). La prévalence de cette espèce est élevée chez les carnivores (renard commun, chien viverrin, loup, mustélidés) et plus faible chez le sanglier (**Figure 1**). *Trichinella pseudospiralis* a été observé dans 12 EM (Bulgarie, République tchèque, Danemark, Estonie, Finlande, France, Allemagne, Hongrie, Italie, Pays-Bas, Slovaquie et Suède). Cette espèce présente une forte prévalence chez le sanglier mais a rarement été détectée chez d'autres animaux carnivores (chien viverrin, renard commun, vison) (**Figure 1**). La répartition de la quatrième espèce en circulation en Europe, *T. nativa*, se limite à l'Estonie, la Finlande, la Lettonie, la Lituanie et la Suède. Elle a récemment été détectée chez des animaux isolés en Allemagne et en Pologne (**Figure 1**).

En Europe, l'origine de la trichinellose humaine varie d'un pays à l'autre. Au cours des dix dernières années, on a assisté d'une part à une forte diminution des infections humaines en raison de la consommation de viande issue de porcs domestiques, et d'autre part à une augmentation des cas de trichinellose humaine en raison de la consommation de viande de sanglier (Murrell et Pozio, 2011). On observe toujours des foyers de



Sommaire

Focus

Point de vue

Actualités

Réseaux

Agenda



Focus

trichinellose dus à la consommation de viande issue de porcs élevés dans les arrière-cours ou en divagation dans certaines régions défavorisées de Bulgarie, de Grèce, d'Italie (Sardaigne), de Pologne, de Roumanie et d'Espagne. En France et en Italie, les nombreuses infections humaines dues à la consommation de viande de cheval ont totalement disparu grâce aux contrôles effectués dans les abattoirs. On observe également des infections isolées ou des petits foyers infectieux dus à l'importation illégale de porc ou de produits dérivés du porc n'ayant pas subi les contrôles vétérinaires requis entre les pays de l'Est et les pays de l'Ouest de l'UE.

Environ 400 millions de porcs à viande sont abattus chaque année dans l'UE; la majorité d'entre eux proviennent d'élevages à haut niveau de confinement où aucun parasite du genre *Trichinella* n'a et ne sera jamais détecté en raison de son mode de transmission. Tous ces animaux sont contrôlés à l'abattoir, ce qui implique l'investissement d'importants moyens matériels et humains. Au cours des 50 dernières années, aucune infection à *Trichinella* n'a été signalée chez les porcs issus d'élevages à haut niveau de confinement, ce qui signifie que *Trichinella* n'a

jamais été dépisté chez plus de 15 milliards de porcs (Alban *et al.*, 2011). A contrario, seul un faible pourcentage des porcs élevés dans les arrière-cours ou en divagation – qui présentent un risque de *Trichinella*, mais qui ne sont pas destinés au commerce de détail à grande échelle – sont contrôlés. Par conséquent, on assiste toujours à l'apparition de foyers de trichinellose en Europe, principalement dans les régions pauvres et défavorisées (Figure 2).

Aujourd'hui, conformément à la législation européenne en vigueur, la Commission européenne ne peut pas contrôler le marché intérieur de ses EM. Il serait en réalité beaucoup plus utile d'affecter tous les efforts et moyens actuellement mis en œuvre pour dépister *Trichinella* chez les porcs issus d'élevages à haut niveau de confinement, au contrôle des porcs élevés dans les arrière-cours ou en divagation qui, bien qu'ils ne constituent qu'un faible pourcentage de la quantité totale de porcs abattus chaque année en Europe, présentent un risque de contamination plus élevé.

Au niveau industriel, le coût du dépistage de *Trichinella* provient en grande partie des retards accumulés dans l'expédition des carcasses aux boucheries ou aux commerces de détail en raison de l'attente des résultats des tests de dépistage de *Trichinella*. Ce coût n'est qu'en partie lié à l'opération de contrôle elle-même. Une alternative peut consister à découper les carcasses dans un atelier de découpe attenant à l'abattoir ou séparé de celui-ci, à condition qu'une même carcasse ou que les pièces d'une même carcasse ne soient pas réparties entre plusieurs ateliers de découpe et que l'atelier de découpe se situe sur le territoire de l'EM (règlement de la Commission, 2005).

Activités du LR-UE-P spécifiques à *Trichinella* spp. Essais interlaboratoires d'aptitude (EILA)

Méthode de la digestion. L'une des principales missions du LR-UE-P consiste à organiser des EILA conformément au règlement (CE) n° 882/2004 du Parlement européen et du Conseil (règlement n° 882/2004 de la Commission). Ces essais portent sur l'aptitude des LNR à détecter la présence de larves de *Trichinella* dans des échantillons de viande de porc et/ou de cheval, selon l'une des méthodes approuvées décrites à l'annexe 1 du règlement (CE) n° 2075/2005 de la Commission (Commission européenne, 2005). Ces EILA, dont la gestion est totalement informatisée, sont organisés une fois par an depuis 2007.

Les substances à analyser transmises à chaque laboratoire sont des boulettes de viande émincée élaborées à partir de viande de porc ou de cheval dans laquelle des larves de *Trichinella* ont été inoculées ou non (échantillons négatifs). Jusqu'ici, la méthode de la digestion d'échantillons collectifs utilisant un agitateur magnétique était la plus utilisée par les laboratoires participants; la méthode de la digestion d'échantillons collectifs avec assistance mécanique/technique de la sédimentation était utilisée par 17,2 % des laboratoires et la méthode de digestion automatique pour échantillons collectifs jusqu'à 35 g était utilisée par 10,3 % des laboratoires. La comparaison des résultats des EILA menés à ce jour a révélé une amélioration des performances des laboratoires, dans la mise en œuvre de la méthode de la digestion, entre 2007 et 2008 et des performances fluctuantes entre 2008 et 2013 (Figure 3).

Identification moléculaire de larves de *Trichinella* au niveau de l'espèce par PCR. Conformément au règlement (CE) n° 2075/2005 de la Commission (annexe I, chapitre I), lorsque



Figure 2. Larve de *Trichinella spiralis* encapsulée dans le pilier du diaphragme d'un porc. Échelle : 100 µm.



Focus

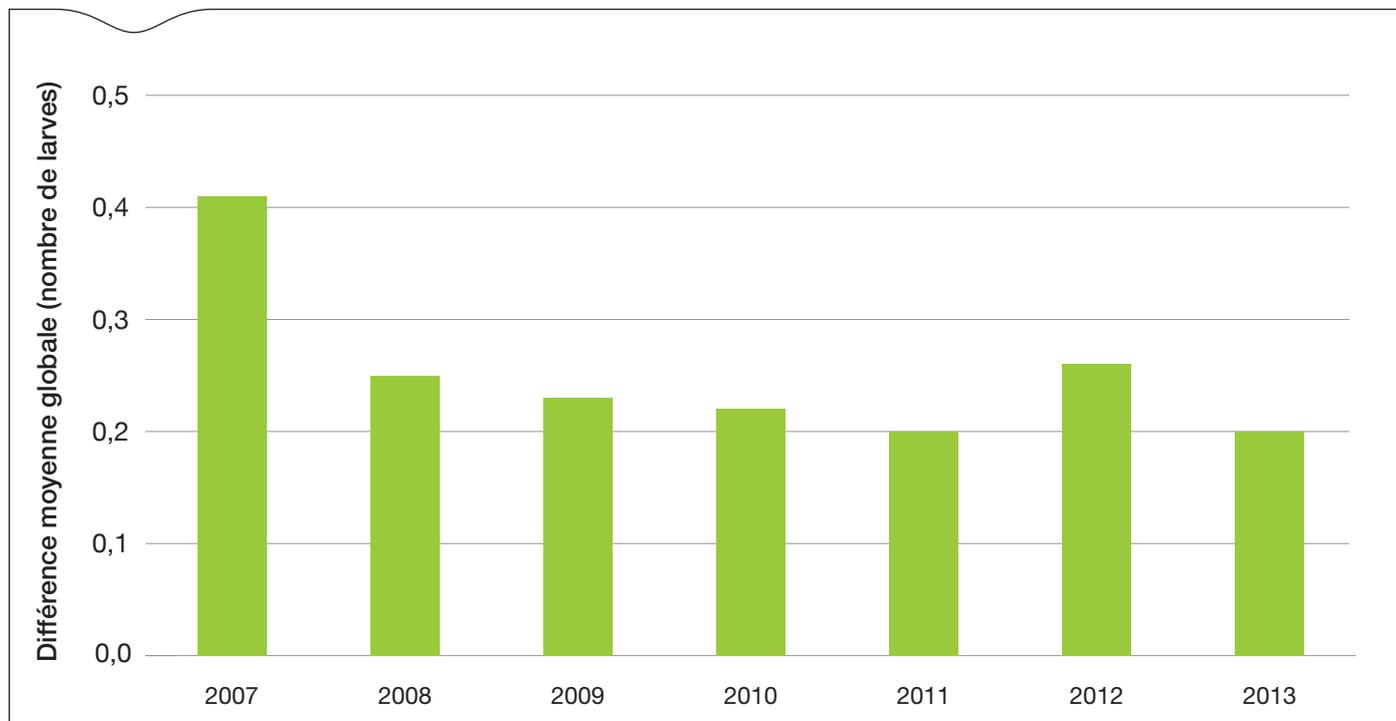


Figure 3. Résultats de sept essais interlaboratoires d'aptitude (EILA) menés de 2007 à 2013 pour détecter la présence de larves de *Trichinella* spp. dans des tissus musculaires, conformément au règlement 2075/2005 de la Commission, organisés par le LR-UE-P pour les Laboratoires nationaux de référence pour les parasites. Pour chaque année, la différence moyenne globale (à savoir, la moyenne de la différence relative entre les valeurs théoriques et les valeurs observées en tenant compte de tous les échantillons et de tous les laboratoires), exprimée en nombre de larves, est indiquée ; plus la valeur de la différence moyenne globale est faible, meilleur est le résultat.

des larves de *Trichinella* spp. sont détectées par digestion de muscles d'animaux, ces larves doivent être placées dans de l'alcool éthylique à 90 % en vue de leur conservation et de leur identification au niveau de l'espèce au LR-UE-P ou dans les LNR. Ces EILA, organisés depuis 2011, portent sur l'aptitude des LNR à correctement identifier les espèces en circulation en Europe, au moyen de méthodes moléculaires mises en œuvre sur des larves isolées ou regroupées.

Formation

Entre 2006 et 2012, 38 personnes provenant de 11 EM de l'UE, de deux pays européens ne faisant pas partie de l'UE, ainsi que de l'Australie, du Brésil, des Philippines et du Vietnam ont visité le LR-UE-P afin d'apprendre les tests diagnostiques qui permettent de détecter la présence de larves de *Trichinella* dans des échantillons de viande, d'identifier ces parasites au niveau de l'espèce par PCR et de détecter la présence d'anticorps anti-*Trichinella* dans des sérums humains et animaux.

Autres activités

Diagnostiques

Les activités de diagnostic du LR-UE-P sont menées conformément à la norme ISO/CEI 17025. À ce jour, seule la norme internationale ISO 15553:2006 (Qualité de l'eau – Isolement et identification des oocystes de *Cryptosporidium* et des kystes de *Giardia*) a été publiée, mais cette méthode ne permet ni d'identifier l'agent pathogène au niveau de l'espèce, ni de déterminer l'hôte d'origine, ni de caractériser la viabilité et/

ou l'infectivité des oocystes de *Cryptosporidium* ou des kystes de *Giardia* éventuellement présents. L'absence de méthodes répondant à une norme internationale de référence pour le diagnostic des affections parasitaires d'origine alimentaire constitue une entrave importante à la mise en œuvre d'un système d'assurance qualité. Il n'existe actuellement aucune norme européenne ou internationale pour les méthodes de diagnostic ; tous les kits et tests commerciaux conçus en interne doivent donc être validés. Le LR-UE-P a élaboré, validé et homologué neuf méthodes de diagnostic (disponibles dans le cadre des services assurés par le LR-UE-P auprès des LNR) (Figure 4). Par ailleurs, le LR-UE-P fabrique des réactifs et des matériaux de référence et participe à l'élaboration de recommandations internationales.

Autres EILA

Le LR-UE-P organise également des essais interlaboratoires d'aptitude pour la détection et/ou l'identification de parasites transmis par les aliments autres que ceux du genre *Trichinella*, conformément à la norme ISO/CEI 17043:2010.

Détection de vers adultes d'*Echinococcus* spp. dans la muqueuse intestinale de l'hôte définitif. Ces EILA, organisés en 2010, 2011, 2012 et 2013, portent sur l'aptitude à détecter la présence de vers adultes d'*Echinococcus* spp. dans une matrice constituée de muqueuse intestinale. Un panel de trois échantillons est transmis aux LNR participants, chaque échantillon étant constitué de muqueuse intestinale homogénéisée, fixée dans de l'éthanol à 70 %, dans laquelle



Focus

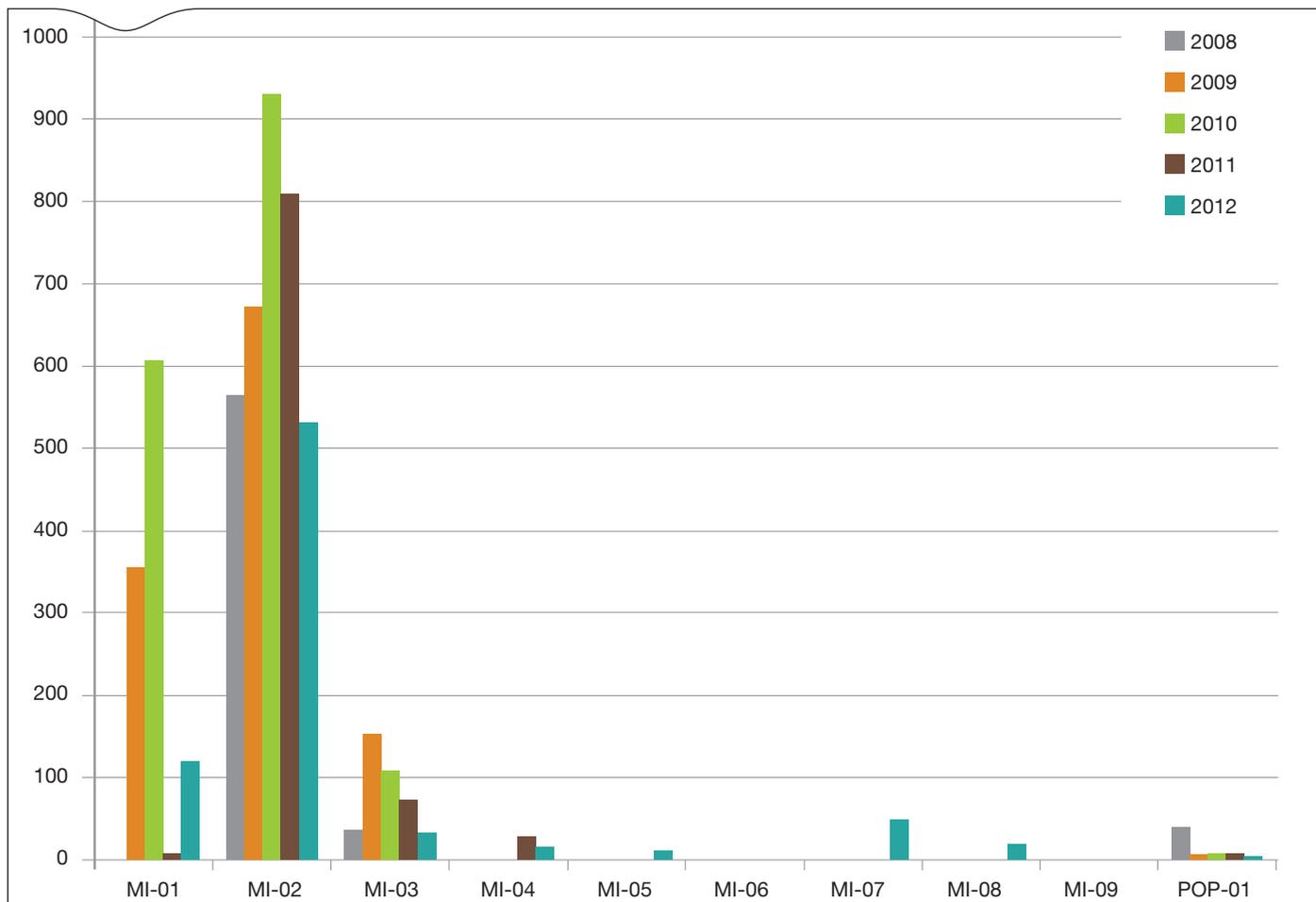


Figure 4 : échantillons analysés au LR-UE-P, selon des méthodes approuvées, entre 2008 et 2012 ;

MI-01 : détection d'anticorps anti-*Trichinella* dans du sérum de porc par dosage ELISA indirect ;
 MI-02 : identification de larves musculaires de *Trichinella* au niveau de l'espèce par analyse PCR multiplex ;
 MI-03 : détection d'anticorps anti-*Trichinella* dans des sérums humains par dosage ELISA indirect ;
 MI-04 : identification de parasites de la famille des anisakidés au niveau de l'espèce par PCR/RFLP ;
 MI-05 : identification de complexe *Echinococcus granulosus*, à partir de kystes hydatiques, au niveau du génotype/de l'espèce par PCR et séquençage ;
 MI-06 : identification d'oocystes de *Cryptosporidium* au niveau de l'espèce par PCR/RFLP ;
 MI-07 : détection d'anticorps anti-*Opisthorchis* dans des sérums humains ;
 MI-08 : identification d'œufs d'*Opisthorchis* spp. au niveau de l'espèce par PCR ;
 MI-09 : identification de kystes de *Giardia duodenalis* au niveau de l'assemblage par PCR/RFLP ;
 POP-01 : méthode de la digestion d'échantillons collectifs utilisant un agitateur magnétique pour la détection de *Trichinella* dans de la viande fraîche (Règlement n° 2075/2005 de la Commission).

des vers adultes d'*Echinococcus* spp. ont été inoculés ou non (témoin négatif). Les échantillons doivent être analysés par sédimentation et comptage (SCT).

Détection de larves L3 d'*Anisakis* spp. dans des filets de poisson. Ces EILA, organisés en 2009 et 2013, portent sur l'aptitude à détecter la présence de larves d'anisakidés dans des filets de poisson au moyen de l'une des méthodes suivantes : i) mirage ; ii) écrasement ; iii) examen aux UV après congélation ; iv) digestion. Un panel de trois échantillons est transmis aux LNR participants, chaque échantillon étant constitué de 100 g de sandwich de filet de poisson dans lequel des larves L3 d'*Anisakis* spp. libérées de leur capsule ont été inoculées ou non.

Activités de recherche sur les parasites transmis par les aliments et les infections animales associées

De nombreuses activités de recherche sur les parasites transmis par les aliments ont été ou sont menées au LR-UE-P depuis sa mise en place, à savoir :

- *Trichinella* spp. : identification de la variabilité génétique intraspécifique de *Trichinella spiralis* et *T. britovi*, et évaluation de l'utilisation de la sérologie pour surveiller les infections à *Trichinella* chez le sanglier et/ou le renard commun ;
- *Toxoplasma gondii* : identification des protéines spécifiques du stade oocystique ;
- anisakidés : identification et élaboration de méthodes d'analyse pour la spéciation des parasites appartenant à cette famille ;



Focus

- *Echinococcus* spp : identification et élaboration de méthodes d'analyse pour la spéciation des parasites appartenant à ce genre;
- identification par codes-barres des helminthes et protozoaires zoonotiques et non zoonotiques parasitant les animaux domestiques, les aliments et l'Homme;
- *Cryptosporidium* spp : élaboration de méthodes d'analyse pour la spéciation des parasites appartenant à ce genre;
- *Alaria alata* : collecte de données épidémiologiques sur la prévalence de ce ver trématode dans les populations de sangliers des EM.

Normalisation des méthodes d'analyse

L'harmonisation et la normalisation des méthodes de diagnostic entrent dans le cadre des missions des LR-UE. Ainsi, le LR-UE-P prend part aux travaux des groupes ISO/TC34/SC9 (Organisation internationale de normalisation/Comité technique 34 – Produits alimentaires/Sous-comité 9 – Microbiologie) et CEN/TC275/WG6 (Comité européen de normalisation/Comité technique 275 – Analyse des aliments – Méthodes horizontales/Groupe de travail 6 – Microbiologie de la chaîne alimentaire). Ces deux sous-comités collaborent, en vertu de l'Accord de Vienne, dans le but d'accélérer le processus de normalisation et d'éviter les chevauchements de tâches. Le projet de norme internationale: *Microbiologie des aliments – Recherche des larves de Trichinella dans la viande – Méthode physique par digestion* a été élaboré sous la présidence du LR-UE-P et le vote d'approbation de ce projet (DIS) a été ouvert en avril 2013 auprès des EM du CEN et de l'ISO.

Ateliers

Tous les ans, le LR-UE-P organise un atelier de deux jours à destination du personnel des LNR. Des experts de renommée internationale sont invités à donner une conférence dans le domaine des zoonoses parasitaires d'origine alimentaire. Le premier jour, chaque LNR présente les principales données épidémiologiques de l'année passée et fait part des éventuels problèmes rencontrés en matière de diagnostic et de contrôle.

Conclusion

Conformément aux règlements de la Commission européenne, les autorités de chaque EM doivent transmettre chaque année à l'ECDC et à l'EFSA, respectivement pour l'Homme et pour les animaux, les données épidémiologiques qu'elles détiennent sur les zoonoses d'origine alimentaire. Ces deux agences européennes traitent ces données et publient un rapport de synthèse communautaire annuel. Malheureusement, les données transmises par les EM ne sont pas toujours complètes, contrôlées et relues avec un œil critique par les organismes scientifiques nationaux. Les informations publiées sont donc souvent de mauvaise qualité, du fait d'erreurs de collecte, de traitement et d'interprétation des données. À titre d'exemple, des parasites du genre *Trichinella* ont été détectés chez des porcs issus d'élevages à haut niveau de confinement, ce qui traduit le manque de compréhension du concept d'« élevage à haut niveau de confinement », souvent confondu avec un « élevage en intérieur ». En fait, par définition, *Trichinella* ne peut pas circuler dans un élevage à haut niveau de confinement, où les porcs ne sont pas nourris avec des farines de porc (ce parasite se transmet exclusivement par l'ingestion de muscles infectés par *Trichinella*).

De plus, les obligations de signalement des affections

parasitaires humaines et de contrôle parasitaire chez les animaux, dans les aliments ou dans l'eau potable diffèrent d'un EM à l'autre; les données transmises ne sont donc pas comparables. L'un des exemples les plus frappants concerne les données officielles relatives à l'échinococcose kystique (EC) humaine: dans certains pays de l'UE pour lesquels des cas d'EC ont été décrits dans la littérature scientifique, les données officielles ne font souvent état d'aucun cas, car le signalement n'est pas obligatoire ou en raison de retards de signalement de plusieurs années.

Bibliographie

- Alban, L., Pozio, E., Boes, J., Boireau, P., Boué, F., Claes, M., Cook, A.J., Dorny, P., Enemark, H.L., van der Giessen, J., Hunt, K.R., Howell, M., Kirjusina, M., Nöckler, K., Rossi, P., Smith, G.C., Snow, L., Taylor, M.A., Theodoropoulos, G., Vallée, I., Viera-Pinto, M.M., Zimmer, I.A., 2011. Towards a standardised surveillance for *Trichinella* in the European Union. *Prev. Vet. Med.* 99, 148-160.
- Dakkak, A., 2010. Echinococcosis/hydatidosis : a severe threat in Mediterranean countries. *Vet. Parasitol.* 174, 2-11.
- Dupouy-Camet, J., Peduzzi, R., 2004. Current situation of human diphyllbothriasis in Europe. *Euro Surveill.* 9, 31-5.
- European Commission, 2004. Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules. *Off. J. EC. L.* 165, 1-59.
- European Commission, 2005. Regulation (EC) No 2075/2005 of the European Parliament and of the Council of 5 December 2005 laying down specific rules on official controls for *Trichinella* in meat. *Off. J. EC. L.* 338, 60-82.
- Murrell, K.D., Pozio, E., 2011. Worldwide occurrence and impact of human trichinellosis, 1986-2009. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 2194-2202.
- Pozio, E., 2007. World distribution of *Trichinella* spp. infections in animals and humans. *Vet. Parasitol.* 149, 3-21.
- Pozio, E., 2008. Epidemiology and control prospects of foodborne parasitic zoonoses in the European Union. *Parassitologia* 50, 17-24.
- Pozio, E., Armignacco, O., Ferri, F., Gomez Morales, M.A., 2013. *Opisthorchis felineus*, an emerging infection in Italy and its implication for the European Union. *Acta Trop.* 126, 54-62.
- Smith, A., Reacher, M., Smerdon, W., Adak, G.K., Nichols, G., Chalmers, R.M., 2006. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003. *Epidemiol Infect.* 134, 1141-1149.



Focus

Application en droit français de la nouvelle réglementation européenne relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques : Quels progrès pour l'animal ? Quelles contraintes pour la recherche ?

Florence Lavissière (florence.lavissiere@anses.fr)

Anses, Direction scientifique des laboratoires, Maisons-Alfort, France

Suite à la directive européenne 2010/63/UE, les textes d'application français relatifs à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques ont été publiés en février 2013. Cette nouvelle réglementation impose un certain nombre de limites et de contraintes à la recherche scientifique et place la souffrance animale au cœur des préoccupations.

Introduction

Fruit de deux années de réflexion et de collaboration entre les autorités de l'État (Ministère chargé de l'agriculture et Ministère chargé de la recherche), les professionnels et les associations de protection des animaux, la transposition de la directive 2010/63/UE (directive, 2010) relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques s'est concrétisée le 7 février 2013 par la publication des textes français au journal officiel de la République française. Ces textes se déclinent en :

- un décret (décret, 2013) relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques qui « fixe les conditions relatives notamment aux espèces concernées, à l'origine des animaux, aux conditions d'hébergement et d'entretien ainsi qu'aux procédures expérimentales que devront remplir les établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs pour être autorisés à effectuer des procédures expérimentales sur des animaux ou à élever ou fournir des animaux à cette fin. Il prévoit les modalités d'agrément et de contrôle des établissements éleveurs, fournisseurs et utilisateurs d'animaux utilisés ou destinés à être utilisés à des fins scientifiques. » ;
- cinq arrêtés interministériels (arrêté, 2013 a ; arrêté, 2013 b ; arrêté, 2013 c ; arrêté, 2013 d ; arrêté, 2013 e).

Le bien-être animal étant une valeur de l'Union consacrée à l'article 13 du traité sur le fonctionnement de l'Union européenne, la nouvelle réglementation française découlant de la directive européenne 2010/63 s'articule autour de la règle des 3R (Russell et Burch, 1959) : « Remplacement » des animaux quand cela est possible, « Réduction » de leur nombre dans les procédures mises en œuvre et « Raffinement », c'est-à-dire limitation des dommages causés aux animaux. Cette nouvelle réglementation est résolument tournée vers le bien-être animal et introduit des évolutions marquées dans le domaine de l'utilisation des animaux à des fins expérimentales.

Les dispositions de la nouvelle réglementation française s'appliquent lorsque des animaux sont utilisés ou destinés à être utilisés dans des procédures expérimentales, ou lorsqu'ils sont élevés pour que leurs organes ou tissus puissent être utilisés à des fins scientifiques. Sont concernés les animaux vertébrés et, premières grandes nouveautés, les formes larvaires capables de se nourrir de façon autonome, les formes fœtales de mammifères à partir du dernier tiers de leur développement normal et les céphalopodes.

Sur le plan pratique un certain nombre de mesures sont à mettre en place au sein des établissements utilisateurs (anciennement appelés établissements d'expérimentation animale), mais aussi fournisseurs et éleveurs, autre nouveauté de cette réglementation.

Responsabilités et bien-être animal

Parmi les dispositions de ce nouveau cadre réglementaire, on peut mentionner (1) la nomination d'un responsable du bien-être des animaux et (2) la mise en place d'une structure chargée du bien-être des animaux au sein de chaque établissement, utilisateurs, fournisseurs et éleveurs. Un grand nombre de missions sont dévolues au responsable et à la structure chargée du bien-être des animaux. Le responsable a en charge la surveillance du bien-être animal dans l'établissement, le contrôle et le suivi des projets autorisés ainsi que le suivi des compétences des personnels concevant ou réalisant les procédures expérimentales, appliquant ces procédures aux animaux, dispensant les soins aux animaux et effectuant leur mise à mort. La structure a pour mission, entre autres :

- de conseiller le personnel sur les questions relatives au bien-être, au soin et à l'hébergement des animaux ;
- de conseiller le personnel, notamment le personnel en charge de la conception des procédures expérimentales, sur la mise en œuvre de la règle des 3R ;
- d'informer le personnel sur les développements techniques et scientifiques relatifs à l'application de cette règle.

Cette structure doit également s'acquiescer de suivre l'évolution et les résultats des projets utilisant des animaux réalisés au sein de l'établissement et de fournir des conseils sur les programmes de placement des animaux (c'est-à-dire la possibilité de faire adopter les animaux par des particuliers – pour les animaux domestiques – ou de les placer dans des structures adaptées (pour les animaux de rente et les animaux sauvages), quand leur état de santé à la fin de l'étude le permet). Si les rôles du responsable du bien-être des animaux et de la structure en charge du bien-être animal et leur apport en termes de bien-être animal sont importants, il n'en reste pas moins que le travail demandé est conséquent ce qui, dans les contextes économique et budgétaire actuels des établissements ayant recours à l'utilisation d'animaux à des fins expérimentales, en particulier des établissements publics, est compliqué à assumer.

Compétences des personnels

Un autre point important concerne la compétence des personnels travaillant en expérimentation animale qui résulte de leur formation initiale, de leur participation à une formation spécifique à l'expérimentation animale (effectuée au plus tard dans l'année suivant leur prise de poste) et de leur formation continue. Ce dernier point se fait selon un rythme minimum de trois jours de formation tous les six ans. Si à première vue cela semble peu, il faut se rendre compte que cette nouvelle



Focus

disposition est une avancée importante qui permettra à tous les personnels, scientifiques mais aussi techniciens et animaliers, de maintenir leurs connaissances et de se tenir informés des nouvelles technologies et avancées dans les domaines qui les concernent. L'ensemble des compétences et formations des personnels seront répertoriées dans un livret de compétences, propre à chacun, attestant de l'adéquation des compétences aux fonctions exercées.

Autorisation de projet

Un des changements majeurs par rapport au système existant jusqu'alors est l'obligation d'obtenir une autorisation préalable à la réalisation de tout projet comportant l'exécution d'une ou plusieurs procédures expérimentales utilisant des animaux. Le dossier d'autorisation de projet comprend notamment un résumé non technique fournissant des informations sur les objectifs du projet ainsi que sur le nombre et le type d'animaux utilisés. Ce résumé étant destiné à être publié sur le site du Ministère chargé de la recherche et donc accessible au grand public, les scientifiques devront être vigilants afin de ne pas divulguer des informations confidentielles.

Les projets sont autorisés pour cinq ans maximum par le Ministère chargé de la recherche qui, pour délivrer les autorisations, s'appuie, et là aussi c'est une grande nouveauté, sur une évaluation éthique réalisée par le comité d'éthique en matière d'expérimentation animale auquel est rattaché l'établissement dans lequel est mis en œuvre le projet. Sur le plan pratique tous les établissements mettant en œuvre des projets impliquant l'utilisation d'animaux à des fins expérimentales doivent donc se doter d'un comité d'éthique qui, cela va de soi, doit être fonctionnel et enregistré auprès du Ministère chargé de la recherche. Ces comités d'éthique dont le rôle est primordial pour la mise en œuvre de projets dans le respect de l'éthique et du bien-être animal existaient déjà en France pour la plupart des organismes de recherche publics et privés. La nouvelle réglementation rend donc officiel le travail de ces structures qui fonctionnaient déjà dans le respect de la Charte nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale dont la philosophie est très proche des textes réglementaires européens (directive, 2010) et français (décret, 2013). Pour le moment le système de soumission des projets au ministère chargé de la recherche se fait par voie postale, une saisie en ligne des dossiers et une soumission directe par voie électronique doivent être mises en place ultérieurement ce qui devrait faciliter le processus.

Soins et hébergement

Concernant les conditions de soins et d'hébergement des animaux, la nouvelle réglementation implique une révision des exigences dans le but d'améliorer le bien-être des animaux hébergés tant en expérimentation qu'en élevage (arrêté, 2013a, annexe II). Les établissements ont jusqu'au 1^{er} janvier 2017 pour se doter de matériel d'hébergement aux normes requises. Par ailleurs, il est désormais exigé que les établissements veillent à mettre en place des techniques d'enrichissement appropriées permettant aux animaux d'exprimer un large répertoire comportemental. Le *programme d'enrichissement* de l'établissement devant être régulièrement revu et mis à jour. L'hébergement individuel peut être autorisé conformément au projet autorisé mais doit être limité autant que possible et des contacts visuels, auditifs, olfactifs et/ou tactiles doivent être maintenus avec les autres animaux. Enfin, dernier point

sur ce sujet, et non des moindres, les animaux doivent être *contrôlés quotidiennement* par une personne compétente. Dans les faits, les contrôles quotidiens étaient déjà mis en place au sein des structures expérimentant sur les chiens, les chats, les ruminants et les primates non-humains, et lors de projets pouvant engendrer de la souffrance chez les animaux expérimentés (projets classés en classe de gravité sévère). Cependant, ce contrôle n'était pas effectué dans la plupart des animaleries abritant des rongeurs, espèces pouvant se contenter d'une distribution automatique de la nourriture et se passant très bien de la présence de l'Homme. Cette nouvelle exigence peut poser des problèmes dans l'organisation du travail, notamment dans les établissements de petite taille, pour un bénéfice discutable pour les rongeurs, ceux-ci étant connus pour préférer la tranquillité à un excès de manipulation et de contrôle.

Primates non-humains (PNH)

Pour terminer, les primates non humains (PNH) disposent d'un statut particulier et font l'objet de mesures spécifiques. En effet, après bien des débats et comme demandé dans le rapport sur la directive 86/609 (Evans, 2002; directive, 1986), l'Europe, et par extension la France, ont décidé de considérer les PNH comme un groupe d'espèces particulières faisant l'objet de dispositions spécifiques. La première mesure concerne la finalité des procédures impliquant des PNH qui doit avoir trait à la prévention, la prophylaxie, le diagnostic ou le traitement d'affections humaines invalidantes ou susceptibles d'être mortelles. La seconde mesure est l'exigence d'une démonstration scientifique expliquant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte en utilisant d'autres espèces que celles appartenant à l'ordre des primates. Par ailleurs, l'utilisation des grands singes (gorilles, chimpanzés et orangs-outans) est interdite sauf dérogation spécifique faisant l'objet d'une approbation de la Commission européenne. Si la protection particulière des PNH est une bonne chose du fait de leur proximité phylogénétique avec l'Homme, il convient toutefois de s'interroger sur le fait que les PNH ne sont pas les seules espèces animales capables de ressentir le stress, la douleur et la souffrance, et d'une façon plus générale de ressentir des émotions. La protection particulière des PNH conduit-elle à une protection moindre des autres espèces animales? Même si ce n'était pas l'intention de la directive 2010/63/UE et des textes réglementaires français qui en sont issus, il apparaît que cela en est une conséquence indirecte.

Conclusion

Ainsi, en reconnaissant la souffrance animale, cette nouvelle réglementation apparaît comme un progrès pour la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques tant au niveau des normes de soins et d'hébergement renforcées qu'au niveau de l'évaluation éthique obligatoire des projets mis en œuvre par les scientifiques français. Il convient néanmoins de préciser que face à un accroissement des coûts et des contraintes administratives, il faut s'interroger sur la place qu'auront l'Europe et la France dans un contexte de mondialisation de plus en plus importante de la recherche. En effet, certains pays se positionnent comme des alternatives possibles à la réalisation de projets de recherche en Europe, et notamment de projets de recherche sur les PNH, ce qui conduit non seulement à une délocalisation de la recherche mais également à une moindre protection des animaux dans des pays où la réglementation



Focus

dans ce domaine n'est pas aussi avancée qu'en Europe. En outre, si les animaux demeurent des modèles indispensables à la recherche fondamentale et appliquée, il n'en demeure pas moins que ces dernières années le développement de méthodes alternatives à l'expérimentation animale a beaucoup progressé. Donnons pour preuve la mise en place en 2007 de la plate-forme nationale pour le développement des méthodes alternatives en expérimentation animale (FRANCOPA, <http://www.francopa.fr/>), elle-même membre de la plate-forme européenne ECOPA (<http://www.ecopa.eu/>).

Références bibliographiques

Arrêté, 2013a. Arrêté du 1^{er} février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles. NOR: *AGRG1238753A*

Arrêté, 2013b. Arrêté du 1^{er} février 2013 fixant les conditions de fourniture de certaines espèces animales utilisées à des fins scientifiques aux établissements utilisateurs agréés. NOR: *AGRG1238724A*

Arrêté, 2013c. Arrêté du 1^{er} février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques. NOR: *AGRG1238729A*

Arrêté, 2013d. Arrêté du 1^{er} février 2013 relatif à la délivrance et à l'utilisation de médicaments employés par les établissements agréés en tant qu'utilisateurs d'animaux à des fins scientifiques. NOR: *AGRG1240332A*

Arrêté, 2013e. Arrêté du 1^{er} février 2013 relatif à l'évaluation éthique et à l'autorisation des projets impliquant l'utilisation d'animaux dans des procédures expérimentales. NOR: *AGRG1238767A*

Décret, 2013. Décret n°2013-118 du 1^{er} février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. NOR: *AGRG1231951D*

Directive, 2010. Directive 2010/63/UE of the european parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes

Directive, 1986. Council directive of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (86/609/EEC).

Evans J. 2002. Rapport sur la directive 86/609 relative à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques (2001/2259(INI)). 13 pages.

<http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?pubRef=-//EP//NONSGML+REPORT+A5-2002-0387+0+DOC+PDF+V0//FR>

Russel WMS, Burch RL. 1959. The principles of humane experimental technique. Johns Hopkins University, United States. Voir édition en ligne:

http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc



Point de vue

Le séquençage complet des génomes, un investissement rationnel pour le développement d'outils de diagnostic et d'épidémiologie : l'exemple de la métrite contagieuse équine

Sandrine Petry (sandrine.petry@anses.fr)

Anses, Laboratoire de pathologie équine de Dozulé, Goustranville, France

Le nombre de génomes complets disponibles augmente de jour en jour avec la réduction continue des coûts et des délais de séquençage. De nombreux laboratoires, aussi bien publics que privés, participent à cet effort qui révolutionne la recherche fondamentale et tous les domaines en lien avec un processus biologique. Il est d'ailleurs à parier que dans un futur proche, le séquençage des génomes sera un outil de routine pour les laboratoires de diagnostic et de référence en microbiologie.

Introduction

La génomique a connu d'importantes révolutions technologiques depuis la publication des premières méthodes de séquençage de l'ADN et du premier génome du bactériophage Φ X174 en 1977. Nous parlons aujourd'hui de séquencer le génome d'un individu en quelques heures pour 1 000 dollars alors que le premier génome humain complet a été obtenu en 2003 après 13 ans de travail pour un coût d'environ 2,7 milliards de dollars. Rien que dans le monde bactérien, près de 4 000 génomes complets sont maintenant disponibles et quatre fois plus sont incomplets ou en cours de séquençage et ce, moins de 20 ans après le séquençage du premier génome d'un organisme vivant (*Haemophilus influenzae*, génome de 1,83 Mb). Cet essor vertigineux est motivé par la volonté de connaître, traiter et prédire les pathologies, d'innover dans les domaines des biotechnologies, de l'environnement, de l'agronomie..., mais aussi par un aspect plus fondamental lié à la connaissance de la vie et à la compréhension de son évolution.

La métrite contagieuse équine (MCE) en quelques mots

La MCE constitue un problème économique en filière équine (élevage, exportation, vente). Cette infection bactérienne, sexuellement transmissible et contagieuse est apparue fin des années 1970 dans plusieurs régions du globe concernées par des mouvements importants de chevaux. Aujourd'hui, elle est toujours mondialement répartie mais son dépistage obligatoire limite les foyers à quelques cas. Elle se traduit cliniquement par une inflammation de l'endomètre des juments généralement accompagnée d'une infertilité temporaire. En absence de traitement, les animaux (mâles et femelles) peuvent rester porteurs de l'agent pathogène durant plusieurs années. Les échecs de traitement semblent fréquents bien que les souches ne sont apparemment pas résistantes aux antibiotiques employés. D'abord classé dans le genre *Haemophilus*, l'agent causal de la MCE a finalement été reclassé en 1985 dans un nouveau genre bactérien nommé *Taylorella*, aujourd'hui constitué de deux espèces : *T. equigenitalis* dont la présence entraîne la déclaration d'un cas de MCE, et *T. asinigenitalis*,

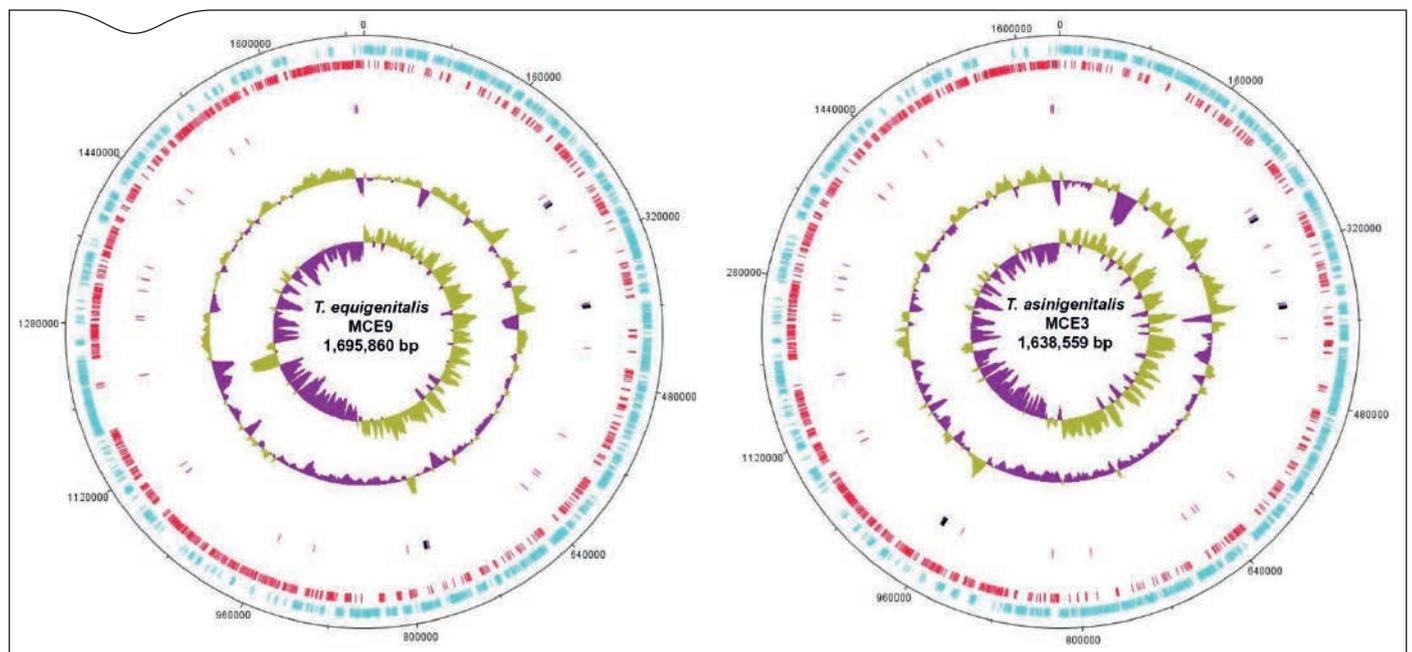


Figure 1. Cartes génétiques des génomes de *T. equigenitalis* MCE9 et *T. asinigenitalis* MCE3.



Point de vue

considérée comme non pathogène malgré la présence de signes cliniques de métrite après des infections expérimentales intra-utérines chez plusieurs juments. Malgré la croissance lente du genre *Taylorella* sur les milieux de culture actuels par rapport à la flore commensale du tractus génital, le diagnostic officiel de la MCE repose sur l'isolement et l'identification biochimique de l'agent pathogène; de plus, la confirmation de l'espèce par PCR est techniquement nécessaire puisque *T. equigenitalis* et *T. asinigenitalis* sont phénotypiquement très comparables.

Le laboratoire national de référence (LNR) et les activités européennes de référence (dans le cadre du laboratoire de référence de l'Union européenne pour les maladies équine) pour la MCE sont hébergés par l'unité Bactériologie et Parasitologie du laboratoire de pathologie équine de Dozulé de l'Anses.

Le séquençage complet des génomes au service de la référence, l'exemple de la MCE

Pour un laboratoire de référence dont le rôle est de développer des outils plus fiables de détection/caractérisation des agents pathogènes ainsi que des nouvelles méthodes de typage, le manque d'information génétique peut être un facteur très limitant. L'éloignement génomique du genre *Taylorella* par rapport à des genres bactériens théoriquement proches (exemple de *Bordetella* et *Haemophilus*) et l'absence de données de séquences en dehors des opérons ribosomiques en est un bon exemple. Pour y remédier, nous avons entrepris le séquençage *de novo* des génomes des deux espèces du genre *Taylorella* en collaboration avec l'unité Micalis UMR1319 de l'Inra (Jouy-en-Josas, France); deux technologies de séquençage haut débit ont été combinées : la technologie 454 (Margulies *et al.*, 2005), que nous avons couplé à une lecture « paired-end » (Fullwood *et al.*, 2013) pour faciliter l'assemblage des deux génomes, et la technologie Solexa/illumina (Bentley *et al.*, 2008). Les deux génomes ont ensuite été annotés et comparés (Hébert *et al.*, 2011; Hébert *et al.*, 2012; **Figure 1**). La disponibilité des séquences génétiques facilite grandement le développement d'outils de diagnostic moléculaire. Pour améliorer la fiabilité du dépistage de la MCE, nous collaborons actuellement à la mise au point d'une PCR multiplexe en temps réel qui s'affranchira des ADN ribosomiques 16S pour gagner en spécificité. La connaissance de la séquence des génomes profite aussi au développement d'outils de diagnostic bactériologique ou sérologique. Par exemple, la reconstruction *in silico* des voies métaboliques du genre *Taylorella* nous permet d'appréhender ses besoins nutritionnels et d'envisager le développement d'un milieu de culture plus performant pour augmenter la sensibilité du diagnostic officiel de la MCE. La mise au point de ce milieu de culture a débuté en janvier 2013 en collaboration avec la société AES chemunex (bioMérieux industry, France).

Plusieurs outils d'épidémiologie moléculaire sont disponibles et pertinents en fonction du pathogène et de leur utilisation (Sabat *et al.*, 2013). Pour le genre *Taylorella*, notre choix s'est porté sur la MLST (*MultiLocus Sequence Typing*), qui, en plus d'être robuste, simple d'exécution et portable, est une méthode de référence pour la surveillance épidémiologique globale d'une infection et l'étude de l'évolution des populations bactériennes. À partir des génomes annotés de *T. equigenitalis* et *T. asinigenitalis*, nous avons donc sélectionné plusieurs gènes communs aux deux espèces du genre *Taylorella* dont les produits assurent les fonctions indispensables à la survie des

cellules. Sept d'entre eux ont été validés chez 113 *T. equigenitalis* et 50 *T. asinigenitalis* provenant de six pays sur une période de 35 ans. À terme, cet outil d'épidémiologie moléculaire sera transféré aux LNRs de l'Union européenne pour la MCE afin de réaliser un état des lieux des souches du genre *Taylorella* circulantes en Europe ainsi que des études rétrospectives en fonction des collections bactériennes disponibles. Les données de MLST (épidémiologie des souches et séquences d'ADN des sept marqueurs MLST) seront mutualisées et en libre accès sur une base spécifique du genre *Taylorella* (<http://pubmlst.org/taylorella/>) hébergée par le Département de zoologie de l'Université d'Oxford (Jolley and Maiden, 2010).

En parallèle du développement d'outils de diagnostic et d'épidémiologie moléculaire, les laboratoires de référence mènent des recherches approfondies pour accroître les connaissances fondamentales sur la biologie et le pouvoir infectieux des agents pathogènes, en interaction avec leur hôte et l'environnement. La connaissance de la séquence complète des génomes facilite grandement la programmation de cette recherche au long court. La comparaison des génomes annotés de *T. equigenitalis* et de *T. asinigenitalis* nous a, par exemple, permis de lister les potentiels facteurs de colonisation et de virulence communs au genre *Taylorella* et spécifiques de chacune des deux espèces. En perspective, et pour avoir une vision plus fine de la diversité génomique du genre *Taylorella*, nous nous apprêtons à séquencer les génomes d'une dizaine de souches en collaboration avec la plateforme génomique/transcriptomique de l'Anses (unité Génétique Virale et Biosécurité - laboratoire de Ploufragan-Plouzané).

Utilisation du séquençage complet des génomes en routine

L'utilisation du séquençage complet des génomes en routine a récemment fait l'objet de plusieurs articles et revues avec, entre autres, une étude pilote réalisée chez *Staphylococcus aureus* et *Clostridium difficile* (Eyre *et al.*, 2012). Tous s'accordent à dire que la réduction continue des coûts et des délais de séquençage représente un changement radical dans les capacités des laboratoires de diagnostic et de référence en microbiologie. Les applications les plus évidentes sont l'identification de microorganismes (notamment s'ils sont non cultivables, à culture difficile ou hautement pathogènes) et le génotypage de souches avec une résolution optimale en « temps réel ». L'épidémie de *Escherichia coli* entérohémorragique O104:H4 en Allemagne en 2011 (Mellmann *et al.*, 2011) et la récente identification de l'agent étiologique de la maladie de Theiler (Chandriani *et al.*, 2013) pour laquelle les techniques classiques d'identification avaient échouées depuis près d'un siècle, illustrent parfaitement ces applications. Les données de séquençage des génomes et les nouvelles technologies de séquençage peuvent aussi être utilisées pour analyser spécifiquement certains gènes cibles (par exemple des gènes de résistance aux antibiotiques) et ainsi réduire les coûts de préparation, d'analyse et de stockage des données.

Il est cependant à préciser que, même si les contraintes techniques et les coûts liés à la génération des données de séquences ne sont plus réellement des facteurs limitants, comme illustré par l'apparition de matériels de séquençage « presse-bouton », il semble difficile d'envisager la généralisation de l'utilisation du séquençage complet des génomes comme méthode de diagnostic et d'épidémiologie à court terme. En effet, plusieurs avancées technologiques



Point de vue

restent à réaliser pour faciliter l'analyse des données à l'aide de logiciels d'interprétation automatique utilisables par des microbiologistes non bio-informaticiens et pour mutualiser ces données à l'aide d'interfaces communes suffisamment conviviales et performantes pour permettre l'incrémentation de données et leur comparaison avec celles existantes. Ce dernier point implique que les formats et logiciels issus des différentes plateformes de séquençage soient homogénéisés et les infrastructures informatiques adaptées pour le stockage et le transport de telles quantités de données générées. En conclusion, bien qu'il soit peu probable que le séquençage complet des génomes se substitue totalement aux méthodes de diagnostic et d'épidémiologie actuelles, il s'agit d'une méthode d'avenir pour les laboratoires de référence ouvrant des possibilités bien supérieures à celles actuelles.

Remerciements

Je tiens à remercier Marie-France Breuil, Fabien Duquesne et Laurent Hébert pour leur implication quotidienne à la référence et à la recherche sur la MCE, le service administratif et financier du laboratoire de pathologie équine de Dozulé ainsi que son Directeur, Claire Laugier. Je remercie également L. Hébert pour son implication active et ses conseils dans la relecture de cet article.

Liste des financeurs de la recherche sur la MCE présentée dans cet article : Anses, Conseil régional de Basse-Normandie, FEDER, Institut français du cheval et de l'équitation, Union européenne.

Références bibliographiques

Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, Hall KP, Evers DJ, Barnes CL, Bignell HR, Boutell JM, Bryant J, Carter RJ, Keira Cheetham R, Cox AJ, Ellis DJ, Flatbush MR, Gormley NA, Humphray SJ, Irving LJ, Karbelashvili MS, Kirk SM, Li H, Liu X, Maisinger KS, Murray LJ, Obradovic B, Ost T, Parkinson ML, Pratt MR, Rasolonjatovo IM, Reed MT, Rigatti R, Rodighiero C, Ross MT, Sabot A, Sankar SV, Scally A, Schroth GP, Smith ME, Smith VP, Spiridou A, Torrance PE, Tzonev SS, Vermaas EH, Walter K, Wu X, Zhang L, Alam MD, Anastasi C, Aniebo IC, Bailey DM, Bancarz IR, Banerjee S, Barbour SG, Baybayan PA, Benoit VA, Benson KF, Bevis C, Black PJ, Boodhun A, Brennan JS, Bridgman JA, Brown RC, Brown AA, Buermann DH, Bundu AA, Burrows JC, Carter NP, Castillo N, Chiara E, Catenazzi M, Chang S, Neil Cooley R, Crake NR, Dada OO, Diakoumakos KD, Dominguez-Fernandez B, Earnshaw DJ, Egbujor UC, Elmore DW, Etchin SS, Ewan MR, Fedurco M, Fraser LJ, Fuentes Fajardo KV, Scott Furey W, George D, Gietzen KJ, Goddard CP, Golda GS, Granieri PA, Green DE, Gustafson DL, Hansen NF, Harnish K, Haudenschild CD, Heyer NI, Hims MM, Ho JT, Horgan AM, Hoschler K, Hurwitz S, Ivanov DV, Johnson MQ, James T, Huw Jones TA, Kang GD, Kerelska TH, Kersey AD, Khrebtukova I, Kindwall AP, Kingsbury Z, Kokko-Gonzales PI, Kumar A, Laurent MA, Lawley CT, Lee SE, Lee X, Liao AK, Loch JA, Lok M, Luo S, Mammen RM, Martin JW, McCauley PG, McNitt P, Mehta P, Moon KW, Mullens JW, Newington T, Ning Z, Ling Ng B, Novo SM, O'Neill MJ, Osborne MA, Osnowski A, Ostadan O, Paraschos LL, Pickering L, Pike AC, Pike AC, Chris Pinkard D, Pliskin DP, Podhasky J, Quijano VJ, Raczky C, Rae VH, Rawlings SR, Chiva Rodriguez A, Roe PM, Rogers J, Rogert Bacigalupo MC, Romanov N, Romieu A, Roth RK, Rourke NJ, Ruediger ST, Rusman E, Sanches-Kuiper RM, Schenker MR, Seoane JM, Shaw RJ, Shiver MK, Short SW, Sizto NL, Sluis JP, Smith MA, Ernest Sohna Sohna J, Spence EJ, Stevens K, Sutton N, Szajkowski L, Tregidgo CL, Turcatti G, Vandevondele S, Verhovskiy Y, Virk SM, Wakelin S, Walcott GC, Wang J, Worsley GJ, Yan J, Yau L, Zuerlein M, Rogers J, Mullikin JC, Hurler ME, McCooke NJ, West JS, Oaks FL, Lundberg PL, Klenerman D, Durbin R, Smith AJ. 2008. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 456(7218): 53-9.

Chandriani S, Skewes-Cox P, Zhong W, Ganem DE, Divers TJ, Van Blaricum AJ, Tennant BC, Kistler AL. 2013. Identification of a previously undescribed divergent virus from the Flaviviridae family in an outbreak of equine serum hepatitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(15): 1407-1415.

Eyre DW, Golubchik T, Gordon NC, Bowden R, Piazza P, Batty EM, Ip CL, Wilson DJ, Didelot X, O'Connor L, Lay R, Buck D, Kearns AM, Shaw A, Paul J, Wilcox MH, Donnelly PJ, Peto TE, Walker AS, Crook DW. 2012. A pilot study of rapid benchtop sequencing of *Staphylococcus aureus* and *Clostridium difficile* for outbreak detection and surveillance. *BMJ Open*. 2012, 2(3): e001124.

Fullwood MJ, Lee J, Lin L, Li G, Huss M, Ng P, Sung WK, Shenolikar S. 2011. Next-generation sequencing of apoptotic DNA breakpoints reveals association with actively transcribed genes and gene translocations. *PLoS One*, 6(11): e26054.

Hébert L, Moumen B, Duquesne F, Breuil MF, Laugier C, Batto JM, Renault P, Petry S. 2011. Genome sequence of *Taylorella equigenitalis* MCE9, the causative agent of contagious equine metritis. *Journal of Bacteriology*, 193(7): 1785.

Hébert L, Moumen B, Pons N, Duquesne F, Breuil MF, Goux D, Batto JM, Laugier C, Renault P, Petry S. 2012. Genomic characterization of the *Taylorella* genus. *PLoS One*, 7(1): e29953.

Jolley KA., Maiden MC. 2010. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC bioinformatics*, 11, 595.

Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM. 2005. Genome sequencing in open microfabricated high density picoliter reactors. *Nature*, 437(7057): 376-80.

Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, Prior K, Szczepanowski R, Ji Y, Zhang W, McLaughlin SF, Henkhaus JK, Leopold B, Bielaszewska M, Prager R, Brzoska PM, Moore RL, Guenther S, Rothberg JM, Karch H. 2011. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One*, 6(7): e22751

Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, van Dijk Jm, Laurent F, Grundmann H, Friedrich AW, on behalf of the ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). 2013. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Eurosurveillance*, 18(4): 20380.



Actualités

Journée de la référence : une centaine de personnes réunies

Barbara Gouget (barbara.gouget@anses.fr)

Anses, Direction scientifique des laboratoires, Maisons-Alfort, France

Récemment, l'Anses organisait - conjointement avec le Service commun des laboratoires des ministères chargés de l'Économie et du Budget - une journée d'échanges réunissant les responsables des laboratoires intervenant dans les plans de surveillance et de contrôle mis en place par les autorités sanitaires dans les domaines de la santé animale, végétale ainsi qu'en matière de sécurité sanitaire des aliments. Objectif : mieux répondre aux attentes de ces laboratoires agréés et de ce fait consolider les réseaux de surveillance.

Notre alimentation résulte souvent d'une chaîne complexe d'actions, incluant des productions végétales et animales, des procédés de transformation, de conservation et de distribution. Divers types de micro-organismes et de substances chimiques peuvent, ainsi, se retrouver dans les aliments et doivent de ce fait être surveillés.

La sécurité sanitaire des aliments s'appuie sur une logique de responsabilisation de tous les acteurs de la chaîne alimentaire, de la « fourche à la fourchette » : chacun doit mettre en place un plan de maîtrise des risques visant à prévenir les contaminations microbiologiques et chimiques. Ce plan s'accompagne d'autocontrôles, c'est-à-dire d'analyses réalisées régulièrement par les industriels et les distributeurs sur des échantillons prélevés tant sur des matières en entrée que sur des produits en sortie, pour être alerté de façon précoce en cas de contamination.

L'actualité récente témoigne de la nécessité d'accompagner ce dispositif réglementaire de plans de contrôle et de surveillance réalisés par les pouvoirs publics eux-mêmes, en toute indépendance de tout intérêt particulier. Il est, par ailleurs, nécessaire d'adapter en permanence ces dispositifs pour prendre en compte l'évolution des connaissances et faire face à l'émergence de nouveaux contaminants en s'appuyant sur les technologies les plus récentes telles que le séquençage à haut débit, les outils de génomique, de protéomique et de spectrométrie de masse.

Un dispositif de surveillance dédié

Ainsi, pour certains pathogènes (virus, bactéries, parasites) ou contaminants chimiques d'importance majeure, les autorités sanitaires se dotent d'un dispositif de surveillance, s'appuyant sur un réseau de laboratoires fiables pour réaliser les analyses officielles. Pour chaque pathogène ou contaminant réglementé à surveiller, des laboratoires agréés pour la réalisation des analyses sont désignés par les autorités sanitaires.

Les programmes de surveillance concernent notamment les principaux micro-organismes transmis par les aliments, tels que les bactéries pathogènes des genres *Salmonella*, *Listeria*, ou *Campylobacter*, et certaines substances toxiques pouvant être incriminées dans les aliments (biotoxines marines, mycotoxines, métaux lourds...). Des plans de contrôle et de surveillance sont aussi mis en place pour traquer les agents responsables des principales maladies animales (rage, fièvre aphteuse, influenza aviaire...) et végétales (OGM interdits en Europe, plantes invasives...).

Pour chaque danger ciblé réglementé, un laboratoire dit « de référence » est désigné. Il est le garant de la fiabilité des analyses effectuées par l'ensemble des laboratoires agréés. L'Anses assume ainsi 68 mandats de référence nationaux, neuf mandats européens, et une vingtaine de mandats internationaux.

Comment travaille un laboratoire de référence ?

Son mandat peut être national (LNR) - il fédère alors un réseau de laboratoires départementaux -, européen (LR-UE) - il est alors chargé de coordonner un réseau de laboratoires nationaux de référence - ou international (Centre collaborateur OMS, OIE ou FAO¹). Selon le pathogène ou contaminant recherché et le niveau de circulation de l'agent ciblé, le nombre de laboratoires agréés à encadrer peut varier de quelques-uns à près d'une centaine. Afin de s'assurer de la fiabilité des analyses effectuées par le réseau de laboratoires qu'il fédère, le laboratoire de référence organise des formations sur les nouvelles méthodes d'analyse qu'il développe et réalise des essais interlaboratoires d'aptitude (EILA) qui permettent de tester l'efficacité des analyses officielles.

Une journée d'échanges fructueux

Récemment, l'Agence organisait conjointement avec le Service commun des laboratoires - un service scientifique et de contrôle des directions de la consommation, de la concurrence et de la répression des fraudes et des douanes - une journée d'échanges réunissant les responsables des laboratoires nationaux de référence français intervenant dans le champ de compétence de l'Agence, et les représentants des laboratoires agréés rattachés à ces laboratoires.

L'objectif de cette journée était d'identifier des pistes de travail entre les laboratoires de référence pour mieux répondre aux attentes des laboratoires périphériques agréés. Plus d'une centaine de participants étaient ainsi réunis à Maisons-Alfort le 27 mars. Les présentations et les discussions se sont concentrées autour de quatre thèmes :

- Du développement au transfert de méthodes,
- Matériaux de référence, contrôle de réactifs,
- Les essais interlaboratoires d'aptitude,
- Quels échanges scientifiques et techniques entre les laboratoires agréés et le laboratoire national de référence ?

Ces échanges ont permis de partager une vision commune des enjeux ; de mieux cerner les questionnements et les attentes des laboratoires agréés. Ils permettront d'optimiser les procédures de travail et de ce fait de consolider les réseaux de surveillance. L'Agence envisage de rendre ce rendez-vous régulier et de le reproduire tous les deux ans.

Cette réunion rejoint la priorité que s'est fixée l'Anses sur le renforcement des moyens de contrôle et de détection mis à disposition des pouvoirs publics par ses laboratoires de référence. Elle fait suite à la création en 2011 d'un collège de la référence réunissant les responsables des LNR de l'Agence, élargi en 2012 à tous les LNR français.

1. Organisation mondiale de la santé, Organisation mondiale de la santé animale et Organisme des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture



Actualités

Conférence scientifique annuelle 2013 de Med Vet Net

André Jestin (andre.jestin@anses.fr)

Anses, Direction scientifique des laboratoires, Maisons-Alfort, France

La dernière conférence scientifique annuelle de Med Vet Net sur le thème « Une seule santé, une seule médecine : partageons les défis du combat contre les zoonoses » s'est tenue les 24 et 25 juin 2013 à Copenhague au Danemark; elle était organisée par l'université technique du Danemark, à Lyngby (Danemark). MedVetNet 2013 s'adresse aux chercheurs en santé humaine et animale qui travaillent sur l'exploration, les implications et l'éradication des zoonoses alimentaires en se fondant sur l'approche de la santé unique. Une grande partie du travail effectué selon cette approche est de nature pluridisciplinaire

incluant divers secteurs, et ses implications dépassent la simple étude et l'élimination des zoonoses. L'objectif de la conférence était de présenter un vaste éventail de disciplines intégrant l'approche de la santé unique et des interventions destinées à tisser des liens entre ces disciplines pour faciliter le développement économique dans une région touchée par une zoonose. <http://www.medvetnet2013.eu/fileadmin/filer/David/MedVetNet2013/MVN2013Flyer02.pdf>

Bref compte-rendu du 2^e atelier de l'OEPP destiné aux responsables de laboratoire de diagnostic phytosanitaire

Françoise Petter (petter@eppo.int) et Madeleine McMullen

Secrétariat de l'OEPP, Paris, France

L'OEPP est une organisation intergouvernementale en charge de la coopération européenne en matière de protection des végétaux dans la région Europe et Méditerranée (une présentation détaillée de l'OEPP a été publiée dans le dernier numéro d'EuroReference, consultable sur <http://www.ansespro.fr/euroreference/>). Depuis 1998, l'OEPP a mis en place un programme de travail dans le domaine du diagnostic afin d'harmoniser les procédures au sein de la région OEPP. Parmi les différentes activités déployées dans le cadre de ce programme, l'OEPP organise des conférences et des ateliers.

Depuis 2011, des ateliers destinés aux responsables de laboratoire de diagnostic phytosanitaire sont ainsi organisés afin de promouvoir les échanges de vues sur certaines questions stratégiques relatives aux diagnostics. La deuxième édition de ces ateliers s'est tenue à Hammamet (Tunisie) du 5 au 7 septembre 2013. Le thème de l'atelier, « Laboratoires de diagnostic phytosanitaire : vers des laboratoires nationaux et régionaux de référence », a été choisi sur la base de propositions formulées par les responsables de laboratoire.

L'atelier a débuté par la présentation, par différents laboratoires, de l'expérience de chacun avec les laboratoires de référence. Une présentation du Laboratoire de référence de l'Union européenne (LR-UE) pour la santé des abeilles a eu lieu, de même qu'une présentation de la révision du Règlement (CE) n° 882/2004 de la Direction générale de la santé et de la protection des consommateurs (DG SANCO) de la Commission européenne. La portée de ce règlement s'étendra aux secteurs de la santé végétale et du matériel de reproduction des végétaux (semences incluses) pour qu'un réseau de laboratoires nationaux de référence et de LR-UE puisse également être mis en place dans le domaine de la santé des végétaux.

En plus des présentations plénières, trois sous-groupes ont été constitués pour discuter des thèmes suivants :

- Accréditation : quels sont les besoins des laboratoires ?
- Organisation d'essais interlaboratoires d'aptitude (EILA) et d'analyses de performances : quels défis ?
- Rôles des laboratoires nationaux de référence (LNR)
- Matériaux de référence
- Périmètre d'intervention possible des laboratoires régionaux de référence

Chaque groupe a ensuite présenté un rapport en séance plénière. Très animées, les discussions en sous-groupes ont permis d'identifier plusieurs recommandations.

Le résumé des principales conclusions et recommandations de cet atelier peut être téléchargé à l'adresse suivante : http://archives.eppo.int/MEETINGS/2013_conferences/labs_tunisia.htm



Actualités

Préparation d'un corpus législatif européen sur les contrôles officiels : des animaux et des végétaux plus sains et une filière agroalimentaire plus sûre

Françoise Kremer (francoise.kremer@agriculture.gouv.fr)

Bureau des laboratoires et de la coordination des contrôles officiels, SCAS- SDPRAT

Direction générale de l'alimentation (DGAL) Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt, Paris, France

La Commission européenne vient d'adopter, le 6 mai 2013, un ensemble de quatre propositions de règlements visant à moderniser, simplifier et renforcer le corpus réglementaire relatif aux contrôles officiels portant non seulement sur l'ensemble de la chaîne alimentaire, mais aussi sur la santé animale, la santé des végétaux et le matériel de reproduction végétale (semences et plants). Ces quatre règlements remplaceront près de 70 textes.

Les règles d'organisation et de qualité des contrôles de l'actuel règlement (CE) n° 882/2004 dit « contrôles officiels », seront adaptées à ces trois secteurs qui n'étaient pas couverts par le règlement actuel, et font l'objet d'améliorations. Le règlement 882/2004 avait été adopté dans le cadre plus restreint du règlement 178/2002 (« loi alimentaire ») et du « Paquet Hygiène ».

Le travail législatif au Parlement européen et au Conseil européen débute dès la fin mai, mais selon la Commission, les nouvelles dispositions n'entreront vraisemblablement pas en vigueur avant 2016.

Les dispositions sur les méthodes d'analyses et les laboratoires officiels figurent au chapitre IV, de l'article 33 à 41. Les conditions de désignation en tant que laboratoire officiel s'appuient toujours sur l'accréditation mais intègrent des exceptions et la possibilité de désignation temporaire lors de changement dans les méthodes ou de situation de crise.

Les articles sur les laboratoires et centres de références sont regroupés au titre III, de l'article 91 à 99 de la proposition « contrôles officiels ». Le principe de création d'un réseau de référence entre les laboratoires de référence de l'Union européenne et les laboratoires nationaux de référence est maintenu et étendu à la santé des végétaux.

http://europa.eu/rapid/press-release_IP-13-400_fr.htm

ou

http://ec.europa.eu/dgs/health_consumer/animal-plant-health-package



Réseaux

Étude de deux ans portant sur les résultats d'essais inter-laboratoires de diagnostic de la rage (test d'immunofluorescence, test d'inoculation à une culture cellulaire pour le diagnostic de rage, test d'inoculation à la souris, techniques de PCR) : point de départ pour l'harmonisation des méthodes

Emmanuelle Robardet (emmanuelle.robardet@anses.fr), Evelyne Picard-Meyer, Alexandre Servat, Florence Cliquet

Anses, Centre collaborateur de l'OMS (recherche et management) pour la lutte contre les zoonoses, Laboratoire de référence de l'OIE pour la rage, Laboratoire de référence de l'UE pour la rage, Laboratoire de la rage et de la faune sauvage de Nancy, Malzéville, France

Deux essais inter-laboratoires portant sur les techniques de diagnostic de la rage ont été menés en 2009-2010 par le laboratoire de référence de l'Union européenne (LR-UE) pour la rage. Les résultats ont montré que les laboratoires avaient obtenu le pourcentage le plus élevé de résultats concordants avec les techniques de PCR (90,5 %), l'immunofluorescence (87,1 %), suivies par le test d'inoculation à une culture cellulaire pour le diagnostic de rage (70,0 %) et le test d'inoculation à la souris (35,0 %) en 2009 et l'immunofluorescence (85,0 %) et les techniques de PCR (80,6 %) suivies du test d'inoculation à une culture cellulaire pour le diagnostic de rage (77,3 %) en 2010. Indépendamment de l'année, les techniques moléculaires sont les techniques qui ont présenté le pourcentage le plus faible de résultats faux négatifs, alors que le test d'inoculation à une culture cellulaire pour le diagnostic de rage et le test d'inoculation à la souris (uniquement réalisé en 2009 pour ce dernier) sont les techniques qui ont obtenu le pourcentage le plus faible de résultats faux positifs. Au vu des résultats obtenus par les laboratoires participants, la technique d'immunofluorescence standard de référence présente une meilleure spécificité que la RT-PCR, avec 1,6 % de faux positifs en 2009 et 5,8 % en 2010, et une meilleure sensibilité que le test d'inoculation à une culture cellulaire pour le diagnostic de rage, avec 1,6 % de faux négatifs en 2009 et en 2010. Que ce soit avec les techniques de biologie moléculaire ou avec les tests d'immunofluorescence, les résultats faux négatifs n'ont été observés que sur des souches provenant de chauves-souris, soulignant le besoin d'améliorer plus particulièrement la qualité pour ces souches-là. L'analyse des questionnaires techniques et des procédures fournis par les laboratoires participants a fait ressortir la variabilité des méthodes employées, susceptible d'entraîner des incohérences entre les résultats. En 2009, l'impact du nombre de personnes interprétant les lames d'immunofluorescence a été souligné, et reconnu comme un facteur important influant sur les résultats des laboratoires. Cette constatation confirme qu'il est nécessaire de confier cette opération à deux personnes indépendantes, dans le cadre d'un diagnostic de routine de la rage. De tels résultats soulignent le besoin pour les laboratoires de diagnostic de la rage d'améliorer l'harmonisation des procédures. Pour faciliter ce travail, une première étape consiste à émettre des recommandations relatives aux techniques de référence les plus courantes, à savoir l'immunofluorescence et le test d'inoculation à une culture cellulaire pour le diagnostic de rage. Ces recommandations ont été élaborées sur la base des recommandations internationales de l'OIE et de l'OMS ainsi que d'une actualisation des connaissances relatives aux facteurs critiques connus pour avoir un impact sur les résultats.

Introduction

La rage est une maladie infectieuse neurotropicque et mortelle provoquée par un rhabdovirus du genre *Lyssavirus*. Cette maladie représente un problème important de santé publique dans de nombreux pays dans le monde, étant responsable de 55 000 cas estimés de décès humains par an, principalement des enfants en Asie et en Afrique (OMS, 2005). Étant donné que le diagnostic clinique de la rage animale n'est pas fiable, ce diagnostic est obtenu au moyen de recherches post-mortem en laboratoire sur des tissus cérébraux. Ces recherches consistent généralement à examiner les animaux ayant mordu une personne ou ayant potentiellement contaminé des humains, mais aussi à évaluer la situation épidémiologique des pays infectés dans le cadre de la surveillance de la rage dans la faune sauvage. Par exemple, en Europe, 63 218 animaux ont été examinés en 2012, révélant 4 893 cas positifs (Source: données de *Rabies Bulletin Europe* <http://www.who-rabies-bulletin.org/>).

Même si plusieurs méthodes ont été publiées pour le diagnostic post-mortem, trois techniques de référence sont

couramment utilisées et actuellement recommandées tant par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS, 1996; OMS, 2005) que par l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE, 2011). La première technique est le test d'immunofluorescence (*Fluorescent Antibody Test* ou FAT) qui détecte les antigènes viraux au moyen d'anticorps antirabiques fluorescents spécifiques (Dean *et al.*, 1996). Cette technique est considérée comme la norme de référence et permet d'identifier directement et rapidement le virus à moindre coût. Les deux autres techniques impliquent d'isoler le virus en vue de détecter l'infectiosité des particules: le test d'inoculation à une culture cellulaire pour le diagnostic de rage (*Rabies Tissue Culture Infection Test* ou RTCIT) est une technique *in vitro* qui utilise une culture cellulaire (Webster and Casey, 1996) alors que le test d'inoculation à la souris (*Mouse Inoculation Test* ou MIT) est une technique *in vivo* qui a recours à une inoculation intracérébrale du virus chez des souris sensibles (Koprowski, 1996). Cependant, pour des motifs éthiques et financiers ainsi que pour des raisons de rapidité, il est préférable d'utiliser la technique *in vitro* (OIE, 2011). Au cours des trois dernières décennies, de nombreux



Réseaux

outils moléculaires ont été mis au point et utilisés (Fooks *et al.*, 2009; Dacheux *et al.*, 2010). Il existe donc un nombre important de tests moléculaires disponibles pour compléter le diagnostic classique de la rage. Un diagnostic fiable de la rage est une condition préalable à la collecte, l'analyse, la comparaison et l'interprétation systématique et continue des données sur la rage et à la diffusion de ces informations (Cliquet *et al.*, 2010). Ce diagnostic est aussi une condition indispensable en médecine humaine pour l'administration d'un traitement préventif en temps et en heure après une exposition (OMS, 2005; OMS, 2010). Pour atteindre cet objectif, il est nécessaire de mettre en place un système d'harmonisation adéquat. Cette harmonisation passe notamment par la comparaison des résultats des laboratoires et des méthodes utilisées. C'est à ces fins que le LR-UE pour la rage a préparé un essai inter-laboratoire annuel portant sur les techniques de diagnostic de la rage au titre de la directive européenne (règlement (CE) N° 737/2008 de la Commission). Le présent article présente les données des deux premiers essais inter-laboratoires annuels complets (FAT, RTCIT, MIT et PCR) et les recommandations consécutives élaborées pour améliorer l'harmonisation des techniques de référence.

Matériels et méthodes

Deux essais inter-laboratoires ont été organisés de 2009 à 2010. Deux panels de prélèvements différents ont été utilisés en 2009, alors qu'en 2010 on n'en a utilisé qu'un seul. En 2009, un panel concernait les techniques de diagnostic de référence (FAT, RTCIT et MIT) alors que l'autre ne concernait que les techniques de biologie moléculaire (RT-PCR, PCR en temps réel). Les deux panels comprenaient les mêmes lots de virus et ont été adressés le même jour à tous les laboratoires participants. En 2010, un seul panel de prélèvements se rapportait aux techniques de référence (FAT et RTCIT) et également aux

techniques de biologie moléculaire (l'essai circulaire sur le MIT a été organisé uniquement en 2009). Pour chaque étude, les laboratoires étaient tenus d'analyser le panel en utilisant leurs propres procédures en vigueur.

1. Laboratoires participants

Des laboratoires nationaux de référence (LNR) d'États membres de l'Union européenne et de pays tiers ont été invités à participer aux essais inter-laboratoires (**Figure 1**). En 2009, 32 laboratoires ont participé à l'essai inter-laboratoire sur le diagnostic de la rage pour les techniques de référence, notamment 21 LNR européens et 11 laboratoires de pays tiers. Trente-deux laboratoires ont exécuté le FAT, 20 ont exécuté le RTCIT et huit ont exécuté le MIT. Pour ce qui est de l'essai inter-laboratoire relatif aux techniques de PCR, 21 laboratoires y ont participé. Parmi ces participants se trouvaient 17 LNR européens et quatre laboratoires de pays tiers. En 2010, 42 laboratoires ont participé à l'essai inter-laboratoire, dont 24 LNR européens et 18 laboratoires de pays tiers. Quarante-quatre laboratoires ont effectué le FAT, 23 le RTCIT et 31 une technique de PCR.

2. Formation et composition des panels à tester

Chaque lot de virus a été produit par inoculation intracérébrale dans des animaux (souris, renards roux, chiens viverrins ou chiens, selon la souche) conformément aux consignes d'expérimentation sur les animaux fournies par le comité consultatif national d'éthique. Pour chaque lot de virus, les tissus cérébraux recueillis ont été mélangés afin de garantir une certaine homogénéité, répartis en tubes de 1 ml, puis lyophilisés. Les souches de virus de la rage (RABV) utilisées dans les essais inter-laboratoires étaient la souche GS7 (souche provenant de renards roux naturellement infectés en France), celles des chiens viverrins (souche de chiens viverrins de

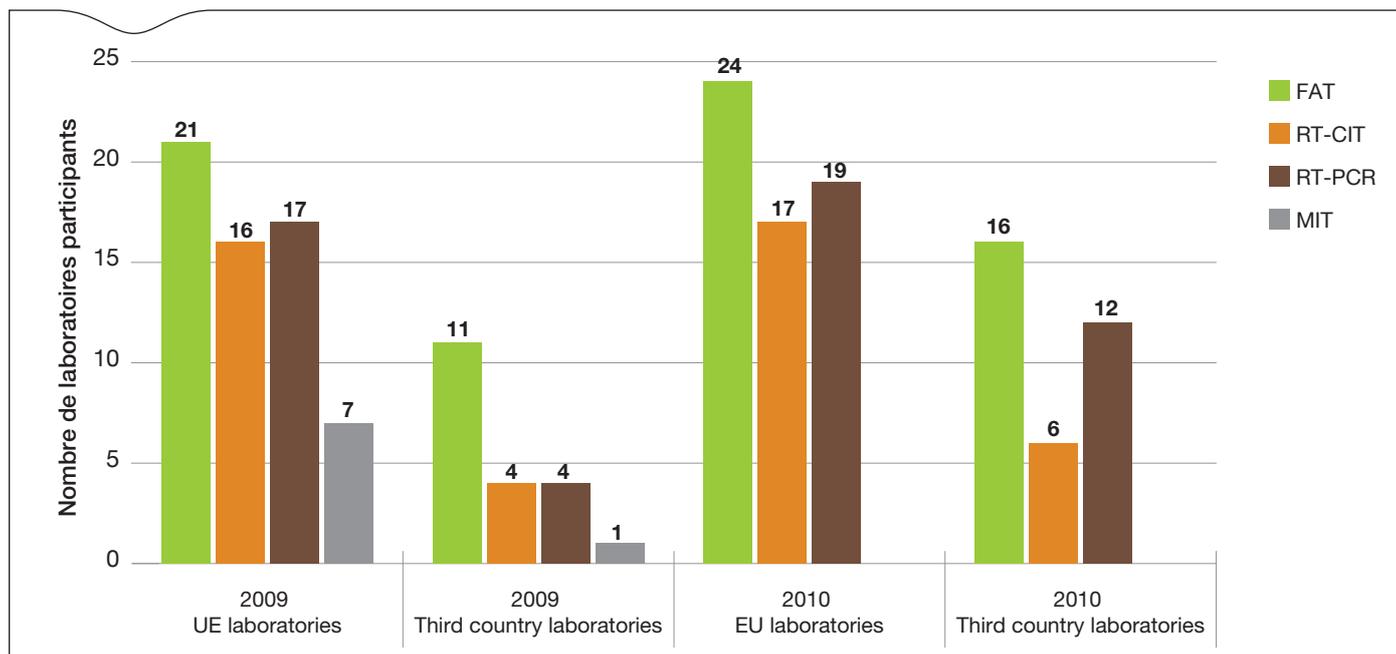


Figure 1. Nombre de laboratoires issus d'États membres de l'UE et de pays non membres de l'UE ayant participé aux essais inter-laboratoires de diagnostic de la rage en 2009 et 2010.



Réseaux

Pologne), des chiens Ariana (race de chien de Tunisie), EBLV-1b (souche de *Lyssavirus* de type 1, sous-type b prélevée sur la chauve-souris européenne provenant de France) et EBLV-2 (souche de *Lyssavirus* de type 2 prélevée sur la chauve-souris européenne provenant du Royaume-Uni), ABLV (souche de *Lyssavirus* prélevée sur la chauve-souris australienne) et des prélèvements négatifs (cerveau de renard roux négatif).

Le panel pour l'essai inter-laboratoire sur les techniques de diagnostic de référence comprenait huit prélèvements codés aléatoirement en aveugle (GS7, EBLV-1b, EBLV-2, Ariana, Ariana weak (prélèvement Ariana dilué donnant un signal de fluorescence faible en immunofluorescence), chien viverrin, 2 négatifs), tandis que le panel pour l'essai inter-laboratoire sur les techniques de PCR comprenait sept prélèvements codés en aveugle (GS7, EBLV-1b, EBLV-2, Ariana, chien viverrin, 2 négatifs). Le panel utilisé dans l'essai inter-laboratoire de 2010 comprenait sept prélèvements codés en aveugle (GS7, EBLV-1a (souche de *Lyssavirus* de type 1, sous-type a prélevée sur la chauve-souris européenne provenant de France), EBLV-2, ABLV, 3 négatifs).

3. Contrôle et stabilité des panels

En 2009, la stabilité des deux panels à tester a été évaluée par analyse après dix jours à température ambiante. En 2010, la stabilité du panel a été évaluée en examinant les prélèvements après sept et 14 jours à température ambiante. Dans ces conditions et pour tous les panels, tous les prélèvements positifs sont restés positifs et tous les prélèvements négatifs sont restés négatifs pour les tests FAT, RTCIT et RT-PCR (données non communiquées). Chaque lot de virus utilisé dans les essais a été vérifié par RT-PCR et typé avant et après l'essai inter-laboratoire.

4. Conditions d'expédition des panels

Les panels de 2009 et 2010 ont été expédiés à température ambiante et pris en charge par un transporteur international agréé, dans des conditions conformes aux recommandations UN2814, à la réglementation de l'association internationale du transport aérien (IATA) et à l'accord européen relatif au transport international des marchandises dangereuses par route (ADR,

2009). Tous les panels, sauf un, ont été réceptionnés dans un laps de temps pour lequel la stabilité était garantie. Étant donné que tous les résultats reçus concordaient, les données du panel réceptionné après le délai de stabilité garantie ont malgré cela été incluses elles aussi dans la présente étude. Les deux années, il a été recommandé aux laboratoires d'entreposer le panel à 4 °C dès réception, jusqu'à réalisation de l'analyse.

5. Questionnaire technique

En 2009, un questionnaire technique relatif à chaque étape de la procédure des méthodes à l'étude a été adressé aux laboratoires participants en même temps que les panels. En 2010, les procédures techniques originales des laboratoires participants ont été demandées. L'analyse des questionnaires techniques et les procédures techniques pour le FAT et le RTCIT ont été examinées afin de repérer et de délibérer sur les légères variantes susceptibles d'avoir un impact sur les résultats.

Résultats

Le **Tableau 1** présente les résultats généraux de l'essai pour 2009 et 2010 en fonction des différentes techniques utilisées.

1. Résultats du test d'immunofluorescence (FAT)

En 2009, quatre laboratoires (12,9 %) ont produit des résultats discordants, à savoir un résultat faux positif (1,6 % des prélèvements négatifs) et trois résultats faux négatifs (1,6 % des prélèvements positifs). Tous les laboratoires ont renvoyé des résultats satisfaisants pour les souches RABV (GS7, Ariana, Ariana weak, chien viverrin). Deux faux négatifs ont été trouvés pour EBLV-1 (6,5 % des prélèvements EBLV-1) et un pour EBLV-2 (3,2 % des prélèvements EBLV-2). En 2009, le test FAT a donc révélé des résultats faux négatifs uniquement dans les souches provenant de chauves-souris.

En 2010, six laboratoires (15,0 %) ont produit des résultats discordants pour le FAT. Sept tests (5,8 %) ont été identifiés en tant que résultats faux positifs et 3 tests (1,9 %) ont fourni des résultats faux négatifs. Des faux négatifs ont été identifiés pour la souche EBLV-1a (2,5 %), la souche EBLV-2 (2,5 %) et la souche ABLV (25,0 %). Aucun résultat faux négatif n'a

Tableau 1. Résultats des essais inter-laboratoires de 2009 et 2010

	2009		2010	
	nb discordants/ total	% discordants et intervalle de confiance	nb discordants/ total	% discordants et intervalle de confiance
FAT				
Nombre de laboratoires	4/31	12,9 [4,2-30,8]	6/40	15 [6,2-30,5]
Prélèvements négatifs	1/62	1,6 [0,1-9,8]	7/120	5,8 [2,6-12,1]
Prélèvements positifs	3/186	1,6 [0,5-5,1]	3/160	1,9 [0,5-5,8]
GS7	0/31	0 [0,0-13,7]	0/40	0 [0,0-10,9]
Ariana	0/31	0 [0,0-13,7]	–	–
Ariana (weak)	0/31	0 [0,0-13,7]	–	–
Chien viverrin	0/31	0 [0,0-13,7]	–	–
EBLV-1a	–	–	1/40	2,5 [1,3-14,7]
EBLV-1b	2/31	6,5 [1,1-22,8]	–	–
EBLV-2	1/31	3,2 [0,2-18,5]	1/40	2,5 [1,3-14,7]
ABLV	–	–	1/40	2,5 [1,3-14,7]



Réseaux

Tableau 1. Résultats des essais inter-laboratoires de 2009 et 2010 (suite)

	2009		2010	
	nb discordants/ total	% discordants et intervalle de confiance	nb discordants/ total	% discordants et intervalle de confiance
RTCIT				
Nombre de laboratoires	4/16	30 [8,3-52,3]	5/22	22,7 [8,7-45,8]
Prélèvements négatifs	0/40	0 [0,0-10,9]	3/66	4,6 [1,2-13,6]
Prélèvements positifs	6/96	6,3 [2,6-13,6]	7/88	8 [3,5-16,2]
GS7	0/16	0 [0,0-24,1]	0/22	0 [0,0-18,5]
Ariana	2/16	12,5 [2,2-39,6]	–	–
Ariana (weak)	0/16	0 [0,0-24,1]	–	–
Chien viverrin	1/16	6,3 [0,3-32,3]	–	–
EBLV-1a	–	–	3/22	13,6 [3,6-36,0]
EBLV-1b	0/16	0 [0,0-24,1]	–	–
EBLV-2	3/16	18,8 [5,0-46,3]	1/22	4,5 [0,2-24,9]
ABLV	–	–	3/22	13,6 [3,6-36,0]
MIT				
Nombre de laboratoires	6/8	75 [35,6-95,5]		
Prélèvements négatifs	0/16	0 [0,0-24,1]		
Prélèvements positifs	11/48	22,9 [12,5-37,7]		
GS7	1/8	12,5 [0,7-53,32]		
Ariana	2/8	25 [4,45-64,4]		
Ariana (weak)	0/8	0 [0,0-40,3]		
Chien viverrin	1/8	12,5 [0,7-53,3]		
EBLV-1b	1/8	12,5 [0,7-53,3]		
EBLV-2	6/8	75 [35,6-95,5]		
RT-PCR				
Nombre de laboratoires	2/21	9,5 [1,7-31,8]	6/31	19,4 [8,2-38,1]
Prélèvements négatifs	3/42	7,1 [1,9-20,6]	8/93	8,6 [4,1-16,7]
Prélèvements positifs	0/101	0 [0,0-4,6]	1/120	0,8 [0,0-5,2]
GS7	0/21	0 [0,0-20,0]	0/31	0 [0,0-13,7]
Ariana	0/21	0 [0,0-20,0]	–	–
Chien viverrin	0/21	0 [0,0-20,0]	–	–
EBLV-1a	–	–	0/31	0 [0,0-13,7]
EBLV-1b	0/20	0 [0,0-20,0]	–	–
EBLV-2	0/18	0 [0,0-21,9]	1/31	3 [0,2-18,5]
ABLV	–	–	0/27	0 [0,0-15,5]

été observé avec la souche RABV. Comme en 2009, les résultats faux négatifs ont uniquement été trouvés dans les souches provenant de chauves-souris. En ce qui concerne l'analyse des procédures, il a été trouvé qu'un facteur avait une influence importante sur les résultats en 2009 (cette analyse est décrite en détail dans le rapport sur l'essai inter-laboratoire de diagnostic de la rage réalisé en 2009 (Robardet, 2010). En général, chaque lame est examinée par deux personnes (67 % des laboratoires), alors que 22 % des laboratoires font

examiner les lames par trois personnes et 11 % par une seule personne. Le nombre de laboratoires présentant des résultats discordants (deux laboratoires sur trois avec une personne, un sur 17 avec deux personnes, deux sur sept avec trois personnes) pouvait grandement varier en fonction du nombre de personnes examinant les lames ($p\chi^2$ [correction de Yates] = 0,03), les laboratoires ayant deux examinateurs étant ceux qui ont rapporté le pourcentage le plus faible de résultats discordants.



Réseaux

2. Résultats du test d'inoculation à une culture cellulaire pour le diagnostic de rage (RTCIT)

En 2009, quatre laboratoires (30,0 %) ont produit des résultats discordants, avec six résultats faux négatifs (6,3 % des prélèvements positifs). Trois d'entre eux concernaient la souche EBLV-2 (représentant 18,8 % des tests pour cette souche), deux concernaient les prélèvements de la souche Ariana (12,5 % des prélèvements de la souche Ariana) et le dernier a été identifié dans la souche de chien viverrin (6,3 % de la souche de chien viverrin). Au vu de ces résultats, le pourcentage de faux résultats dans l'essai inter-laboratoire varie en fonction des souches, le pourcentage le plus élevé de faux résultats concernant la souche EBLV-2, puis la souche Ariana et ensuite la souche de chien viverrin.

En 2010, l'analyse des résultats de laboratoire a révélé que cinq laboratoires (22,7 %) avaient obtenu des résultats discordants. Ils ont produit trois résultats faux positifs (4,6 % des prélèvements négatifs) et sept résultats faux négatifs (8,0 % des prélèvements positifs). Une analyse plus approfondie a confirmé que les résultats faux négatifs se limitaient aux souches EBLV-1a provenant de chauves-souris (13,6 % des

prélèvements d'EBLV-1), EBLV-2 (4,5 % des prélèvements d'EBLV-2) et ABLV (13,6 % des prélèvements d'ABLV) provenant des chauves-souris.

3. Résultats du test d'inoculation à la souris (MIT)

Ce test a été réalisé en 2009 uniquement, et a inclus huit participants volontaires. Six laboratoires (75,0 %) ont présenté des résultats discordants, avec 11 résultats faux négatifs (22,9 % des tests sur des prélèvements positifs). Un faux négatif a été rapporté pour la souche EBLV-1b (12,5 %) et six résultats faux négatifs pour la souche EBLV-2 représentant 75,0 % des tests sur cette souche. Un résultat faux négatif a été décelé pour la souche GS7 (12,5 %), deux résultats faux négatifs ont été identifiés avec les prélèvements Ariana (25,0 % des tests sur la souche Ariana) et un résultat faux négatif pour la souche du chien viverrin (25,0 % des tests sur la souche de chien viverrin). En résumé, le pourcentage plus élevé de faux résultats a été obtenu avec la souche EBLV-2, puis avec la souche Ariana et les souches GS7 et EBLV-1b du chien viverrin.

Tableau 2. Recommandations du LR-UE relatives au FAT

Les « recommandations fortes » sont jugées irrévocables, car il a déjà été démontré que le fait de les modifier a une influence importante sur les résultats. Les « recommandations » ne sont pas obligatoires, mais certaines modifications peuvent éventuellement avoir une influence sur les résultats, Elles doivent donc être respectées afin de maximiser l'harmonisation européenne. La colonne « Au libre choix du laboratoire » signale des modifications acceptables pour lesquelles aucune influence importante sur les résultats n'a été démontrée.

Étape de la procédure	Recommandation forte	Recommandation	Au libre choix du laboratoire
1. Partie du cerveau	Tronc cérébral et cervelet ou hippocampe (deux répétitions par prélèvement)		
2. Préparation des lames	Méthode d'impression/de frottis		
3. Séchage avant fixation		15 à 30 min à température ambiante	
4. Fixation	Acétone, -20 °C, 30 min	Lames témoins et lames avec prélèvements placées dans des bacs de rinçage différents	
5. Séchage avant coloration		15 à 30 min à température ambiante	
6. Coloration	Respect strict des recommandations du fabricant 37 °C, 30 min, pièce humide		Ajout de bleu d'Evans au conjugué
7. Lavage	Lames témoins et avec prélèvements placées dans des bacs de rinçage différents	Immersion pendant 2 x 5 min dans du PBS	
8. Préparation	Préparation dans un tampon de pH ≥ 8,5 Une concentration élevée de glycérol peut estomper la coloration		
9. Lecture	Lire les lames dans les 2 heures qui suivent la préparation 2 examinateurs formés indépendants	Grossissement final de 200 à 400	
10. Témoins	Inclure des témoins positifs et négatifs des espèces virales cibles à chaque session		



Réseaux

4. Résultats de la PCR

Des résultats discordants ont été décelés dans deux laboratoires (9,5 %) avec trois résultats faux positifs (7,1 % des tests sur les prélèvements négatifs). Aucun résultat faux négatif n'a été retourné pour les souches EBLV-1b, EBLV-2, GS7, Ariana et de chien viverrin. En 2010, des résultats discordants ont été identifiés dans six laboratoires (19,4 %). Les résultats discordants ont inclus huit faux positifs (8,6 % des prélèvements négatifs) et un résultat faux négatif (0,8 % des prélèvements positifs). Les résultats faux positifs et faux négatifs provenaient de différents laboratoires participants. Le seul résultat faux négatif a été observé avec la souche EBLV-2 (3 % d'EBLV-2).

Discussion

1. Test d'immunofluorescence (FAT)

87 % et 85 % des laboratoires participant à l'essai sur le FAT ont présenté des résultats satisfaisants en 2009 et 2010 respectivement. Même si la rage terrestre (provoquée par le virus de la rage RABV classique) est la maladie la plus couramment étudiée, la rage de la chauve-souris est aussi diagnostiquée de plus en plus souvent. Cette situation souligne le besoin d'inclure de telles souches dans le processus d'évaluation de la qualité du diagnostic. L'étude montre que la détection des souches RABV n'a produit aucune erreur, tandis que toutes les souches provenant de chauves-souris (EBLV-1, EBLV-2 et ABLV) avaient fourni des résultats faux négatifs. Étant donné que l'infection par RABV est responsable de la majorité des

Tableau 3. Recommandations du LR-UE relatives au RTCIT

	Recommandation forte	Recommandation	Au libre choix du laboratoire
1. Matériel	Microplaque ou Labtek		
2. Culture cellulaire	Lignée cellulaire : Neuroblastome		E-MEM, Milieu d'Eagle modifié par Dulbecco (D-MEM), Milieu essentiel minimum de Glasgow (G-MEM)
	Milieu : Milieu essentiel minimum d'Eagle (EMEM) sans acides aminés essentiels + 10 % de FBS (sérum de veau fœtal) + antibiotiques		
	La trypsination doit être effectuée lorsque la monocouche cellulaire atteint une confluence de 80 %		
3. Préparation de l'inoculum	Préparation à 10 %		Étape de givrage/dégivrage
	Milieu de broyage : culture cellulaire + antibiotique		
	Centrifugation à basse température		
4. Inoculation (microplaque)	Monocouche confluence de 80 %		Volume de milieu et de l'inoculum
4. Inoculation (Labtek)	Monocouche confluence de 80 %	50 µl d'inoculum et 400 µl de milieu par puits (10 ⁵ cellules /mL)	
5. Incubation	De 48 h à 96 h, 36 °C ± 2, 5 % de CO ₂		
	Changer le milieu après 72 h		
6. Lavage	PBS	Immersion 2x	
7. Fixation	Acétone 100 % (Labtek), acétone 80 % (microplaque)		
8. Séchage		15 à 30 min à température ambiante	
9. Coloration	Respect strict des recommandations du fabricant		Utilisation de bleu d'Evan
	37 °C, 30 min		
10. Lavage	PBS	Immersion 2x pour la microplaque, Immersion 2x 5 min pour Labtek	
11. Lecture	2 examinateurs formés indépendants	Grossissement général de 200 à 400	
12. Témoins	Inclure des témoins positifs et négatifs des espèces virales cibles à chaque session		



Réseaux

décès chez l'homme, les résultats de cet essai ont révélé la grande performance des laboratoires, laissant transparaître un niveau de qualité supérieur de la prise en charge en santé publique de la rage classique. En revanche, les résultats provenant des souches de chauves-souris soulignent le fait que les laboratoires doivent faire des efforts pour améliorer la sensibilité de leurs méthodes de diagnostic pour ces souches. Étant donné que ces souches ne fournissent pas le même type de fluorescence que les souches RABV classiques, les résultats faux négatifs pourraient être dus aux difficultés pour identifier la fluorescence obtenue avec ces souches. L'analyse des questionnaires techniques réalisée à la lumière des résultats inter-laboratoires a indiqué que le nombre de personnes examinant les lames pourrait avoir un impact sensible sur la fiabilité des résultats du FAT. Il conviendrait que deux personnes examinent systématiquement et de manière indépendante toutes les lames et comparent ensuite leurs résultats pour éviter toute erreur d'interprétation. Si leurs résultats concordent, il conviendrait de les valider; dans le cas contraire, ce serait à une troisième personne (plus expérimentée) de trancher. Même si aucun autre facteur significatif n'a été identifié, en raison du faible nombre de résultats discordants, l'on sait que de petites variations potentielles dans la procédure peuvent affecter, et même de manière critique, la sensibilité et la spécificité du FAT. La zone du cerveau examinée (Bingham and van der Merwe, 2002), la durée et le type de fixation (Upcott and Markson, 1971), la nature du conjugué d'anticorps antirabique couplé au FITC (Robardet *et al.*, 2013), l'alcalinité du milieu de montage (Durham *et al.*, 1986; Pital and Janowitz, 1963), le pourcentage de glycérol (Rudd *et al.*, 2005) et le recours à des filtres de microscopie adéquats (Lewis *et al.*, 1973) font partie de ces facteurs. Le LR-UE a établi des recommandations relatives à tous ces paramètres (**Tableau 2**). Ces recommandations ont été élaborées après consultation des LNR à l'occasion de l'atelier sur la rage organisé par l'UE en 2010 et sont en phase avec d'autres recommandations internationales (OMS, 1996; OIE, 2011).

2. Test d'inoculation à une culture cellulaire pour le diagnostic de rage (RTCIT)

70 % et 77,3 % des laboratoires participants ont produit des résultats satisfaisants en 2009 et 2010 respectivement. Des résultats insatisfaisants ont été obtenus pour les souches (négatifs) EBLV-2, EBLV-1a, Ariana et chien viverrin, laissant à penser que les faux résultats obtenus étaient indépendants de l'espèce. Seule la souche RABV provenant du renard roux (GS7) n'a présenté aucun résultat discordant que ce soit en 2009 ou en 2010. Même s'il n'était pas significatif, le pourcentage de laboratoires obtenant de bons résultats était plus élevé en 2010 qu'en 2009, laissant entrevoir une légère augmentation de la qualité des résultats pour le RTCIT.

L'analyse du questionnaire technique a montré que différentes souches de cellules étaient couramment utilisées. Il est reconnu que les cellules de neuroblastome murin permettent d'obtenir de meilleurs résultats pour isoler les souches de virus sauvage (Rudd and Trimarchi, 1989; Webster and Casey, 1996) et qu'elles sont à privilégier pour obtenir un diagnostic correct. Chaque laboratoire doit aussi veiller à ce que le milieu utilisé au laboratoire soit adapté à la culture cellulaire, sachant que l'ajout de sérum au milieu de culture (sérum de veau fœtal, 10 %) peut améliorer la croissance. Si l'on considère la densité cellulaire, le nombre de cellules par puit, le volume des inoculums et

la durée de l'incubation, les étapes de culture du virus dans les cellules présentent de grandes variations. Quelle que soit la quantité utilisée, il est nécessaire de s'assurer que la monocouche de cellules atteint une confluence de 80 % au terme de l'incubation. Il est également préconisé de changer le milieu après les 24 premières heures lorsque l'incubation atteint 72 h (OIE, 2011). Des guides de référence ont défini une étape de fixation dans de l'acétone à 70-80 % pendant 30 minutes à température ambiante pour les tests sur microplaques (Webster and Casey, 1996) et dans de l'acétone à 100 % pendant 30 minutes à -20 °C pour les tests en chambres de verre Lab-Tek (Barrat *et al.*, 1988). Les conditions convenables pour l'étape de lecture sont les mêmes que celles de la technique du FAT. Le **Tableau 3** propose un résumé des recommandations du LR-UE. Ces recommandations ont également été élaborées après consultation des LNR à l'occasion de l'atelier sur la rage organisé par l'UE en 2010 et sont en phase avec d'autres recommandations internationales (OMS, 1996; OIE, 2011).

3. Test d'inoculation à la souris (MIT)

25 % des laboratoires participants ont présenté des résultats satisfaisants. 22,9 % de résultats faux négatifs ont été obtenus. L'essai inter-laboratoire pour le MIT a donc enregistré le pourcentage le plus élevé de résultats faux négatifs parmi les techniques étudiées. La sensibilité inter-laboratoire du MIT était faible, en raison principalement du nombre élevé de faux négatifs pour la souche EBLV-2. Afin d'éviter toute perte de sensibilité et de spécificité de cette technique, il convient de privilégier de jeunes souris de souche albinos suisse, en particulier des nouveau-nés de moins de trois jours dans la mesure du possible, étant donné que ce sont elles les plus sensibles au virus de la rage (Koprowski, 1996). Il faudrait soumettre les souris ayant été amenées au laboratoire à une étape d'adaptation de trois jours minimum, afin d'écartier les souris immatures suite à des conditions de transport difficiles avant de mener l'expérience (Koprowski, 1996). Il faut ajouter des agents antimicrobiens à la préparation de tissus cérébraux pour éviter toute mortalité non spécifique (streptomycine à 1560 UI/mL et pénicilline à 500 UI/mL) (Koprowski, 1996). Pour éviter les phénomènes d'interférence, il est aussi recommandé de préparer le tissu en suspension pour inoculation à 10 % (Koprowski, 1996). Pour éviter détresse et souffrance aux animaux, ainsi qu'une mortalité non spécifique, il convient de réaliser l'injection intracérébrale sous anesthésie. Il faut souligner que la moitié des laboratoires participants n'anesthésiaient pas les souris avant l'inoculation, ce qui n'est pas conforme à la réglementation éthique et aux efforts entrepris pour éviter la souffrance des animaux utilisés à des fins expérimentales et scientifiques (directive 89/609/CEE du Conseil européen, 1986). À chaque fois que cela est possible, l'isolement de virus en culture cellulaire doit remplacer le test d'inoculation à la souris (OMS, 2005; OIE, 2011).

4. Techniques de biologie moléculaire (RT-PCR: PCR en temps réel et RT-PCR classique)

90,5 % des laboratoires participants ont produit des résultats satisfaisants en 2009 et 80,5 % en 2010. Aucun prélèvement faux négatif n'a été enregistré pendant l'essai en 2009, tandis qu'il en a été détecté 0,83 % en 2010, à savoir un résultat faux négatif sur un prélèvement d'EBLV-2. Même s'il est statistiquement non significatif, le pourcentage de résultats faux positifs en 2009 (7,1 %) a été inférieur à celui de 2010 (8,6 %). Des résultats faux positifs ont été relevés dans un unique



Réseaux

laboratoire ayant recours à la fois à la technique de RT-PCR en deux étapes et de PCR en temps réel. La comparaison des questionnaires techniques a révélé de grandes variations dans les techniques et les protocoles. Chaque laboratoire utilisait ses propres réactifs validés, amorces et kits commerciaux pour l'extraction de l'ARN, pour la génération d'ADNc ou pour la RT-PCR à une étape. Même si les outils de biologie moléculaire ne sont pas actuellement recommandés pour le diagnostic post-mortem de routine, ils sont de plus en plus utilisés. Cependant, si elle n'est pas réalisée par un personnel bien formé dans le domaine de la biologie moléculaire, cette technique très sensible présente un fort risque de contamination et peut donc générer des résultats faux positifs, notamment pour la PCR nichée. L'essor considérable de ces techniques au cours des dernières décennies a produit une grande diversité de techniques de biologie moléculaire (hnRT-PCR, hnRT-PCR en une étape, PCR en temps réel). Les laboratoires doivent donc prendre soin de vérifier la validité de ces techniques très sensibles en se fiant aux directives internationales relatives à l'assurance qualité (OIE, 2011).

5. Comparaisons des techniques

Les comparaisons des différentes techniques démontrent que les techniques de RT-PCR produisaient le pourcentage le plus faible de résultats faux négatifs et étaient donc les plus sensibles, tandis que les techniques de RTCIT et MIT produisaient le pourcentage le plus faible de résultats faux positifs et étaient plus spécifiques. Inversement, le pourcentage de faux positifs de la technique de RT-PCR était le plus élevé parmi toutes les techniques utilisées, tandis que le pourcentage de faux négatifs était plus élevé pour les techniques de RTCIT et MIT. La grande sensibilité de la PCR, qui en fait un outil de recherche puissant, signifie qu'il faut faire très attention d'éviter de générer des résultats faux positifs. On a trouvé que le FAT était un bon compromis étant donné qu'il n'a généré que quelques résultats faux positifs et faux négatifs (uniquement dans les souches de chauves-souris). Chaque technique concerne des composants différents du virus (antigène viral dans le cas du FAT, infectiosité virale dans le cas du RTCIT et du MIT et ARN viral dans le cas de la RT-PCR) ce qui engendre des résultats différents en termes de spécificité et de sensibilité. Alors qu'il n'était pas possible de détecter la rage par un FAT ou un RTCIT en raison de la dégradation de l'antigène et de la perte de viabilité du virus, la RT-PCR s'est avérée apte à détecter l'ARN dans des prélèvements putréfiés (David *et al.*, 2002) ou dans des prélèvements examinés après un stockage prolongé (Lopes *et al.*, 2010). On peut donc avoir recours à la RT-PCR dans un éventail plus large de conditions, par exemple, un papier FAT® imprégné après 43 jours de stockage à température ambiante (Picard-Meyer *et al.*, 2007) alors qu'il n'est pas possible de réaliser un FAT ou un RTCIT dans de telles conditions.

6. Système d'harmonisation

Cette étude souligne dans un premier temps qu'il existe de nombreuses variantes de procédure d'un laboratoire à l'autre, même avec les techniques de référence décrites dans les manuels de l'OIE (2011) et de l'OMS (1996 et 2005). Étant donné qu'il suffit de modifier un tant soit peu une technique pour entraîner une diminution drastique de la sensibilité et de la spécificité d'un test (Rudd *et al.* 2005), tout changement, même mineur, doit s'accompagner d'une validation adéquate du test

qui en évalue l'impact sur les résultats (McElhinney *et al.*, 2008). Dans le but d'utiliser des méthodes comparables et efficaces, les instances internationales (OMS, OIE et la Commission européenne) recommandent de plus en plus d'avoir recours à des méthodologies de test normalisées. Sur le plan européen, la Commission européenne a confié au laboratoire de référence de l'Union européenne (LR-UE) la tâche d'harmoniser les techniques de diagnostic utilisées pour les maladies animales (Règlement (CE) N° 737/2008 de la Commission). Un tel système a été mis en place suite à une discussion consensuelle entre les LNR et le LR-UE à la lumière des techniques normalisées existantes. Les premières recommandations fondées sur les recommandations internationales de l'OIE et de l'OMS ainsi que sur l'actualisation des connaissances relatives aux facteurs critiques susceptibles d'avoir un impact sur les résultats ont été proposées au niveau européen pour améliorer la normalisation des techniques de référence les plus utilisées, à savoir le FAT et le RTCIT.

Remerciements

Ce travail a été financé par la Commission européenne et l'Anses. Nous tenons à remercier le personnel de l'Anses ayant participé à cette étude pour la réalisation du travail technique. Nous tenons aussi à remercier tous les laboratoires nationaux de référence qui ont pris part à cette étude.

Bibliographie

- ADR. (2009) European Agreement concerning the International Carriage of Dangerous Goods by Road, 146 pp. édition (ECE/TRANS/202, Vol. I and II), as amended by document ECE/TRANS/WP.15/199, annex 1. ed.
- Barrat, J., Barrat, M.J., Picard, M., Aubert, M.F.A., Gerard, Y., Patron, C., Ambert, J. and Quillou, B. (1988) Diagnostic de la rage sur culture cellulaire: Comparaison des résultats de l'inoculation au neuroblastome murin et de l'inoculation à la souris. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 11(3-4), 207-214.
- Bingham, J. and van der Merwe, M. (2002) Distribution of rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test. *Journal of Virological Methods* 101(1-2), 85-94.
- Cliquet, F., Freuling, C., Smreczak, M., Van der Poel, W.H.M., Horton, D., Fooks, A.R., Robardet, E., Picard-Meyer, E. and Müller, T. (2010) Development of harmonised schemes for monitoring and reporting of rabies in animals in the European Union. *Rabies Bulletin Europe* 34 (2), 7-8.
- Dacheux L.; Wacharapluesadee S.; Hemachudha T.; Meslin F.X., Buchy P.; Reynes J.M.; Bourhy H. (2010). More accurate insight into the incidence of human rabies in developing countries through validated laboratory techniques. *PLoS Negl. Trop. Dis* 4 (11), 5 p
- David, D., Jakobson, B., Rotenberg, D., Dveres, N., Davidson, I. and Stram, Y. (2002) Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. *Veterinary Microbiology* 87(2), 111-118.
- Dean, D., Ableseth, M.K. and Atanasiu, P. (1996) The fluorescent antibody test. In: F.X. Meslin, M.M. Kaplan and H. Koprowski (Eds), *Laboratory techniques in rabies*, pp. 88-95. Vol. Fourth edition. World Health Organization, Geneva.
- Durham, T.M., Smith, J.-S. and Reid, F.L. (1986) Stability of immunofluorescence reactions produced by polyclonal and monoclonal antibody conjugates for rabies virus. *Journal of Clinical Microbiology* 24(2), 301-303.
- European Commission. (2008) COMMISSION REGULATION (EC) N° 737/2008 of 28 July 2008 designating the Community Reference Laboratories for crustacean diseases, rabies and bovine tuberculosis, laying down additional responsibilities and tasks for the Community Reference Laboratories for rabies and bovine tuberculosis and amending Annex VII to Regulation (EC) N° 882/2004 of the European Parliament and of the Council.



Réseaux

Fooks, A.R., Johnson, N., Freuling, C.M., Wakeley, P.R., Banyard, A.C., McElhinney, L.M., Marston, D.A., Dastjerdi, A., Wright, E., Weiss, R.A. and Müller, T. (2009) Emerging technologies for the detection of rabies virus: Challenges and hopes in the 21st century. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3(9).

IATA. (2009) (International Air Transport Association) *Infectious Substances Shipping Guidelines*, 187 pp.

Koprowski, H. (1996) The mouse inoculation test, *Laboratory techniques in rabies*, pp. 476. Vol. Fourth edition. World Health Organization, Geneva.

Lewis, V.J., Thacker, W.L. and Engelman, H.M. (1973) Evaluation of the interference filter for use in rabies diagnosis by the fluorescent antibody test. *Journal of Applied Microbiology* 26(3), 429-430.

Lopes, M.C., Venditti, L.L.R. and Queiroz, L.H. (2010) Comparison between RT-PCR and the mouse inoculation test for detection of rabies virus in samples kept for long periods under different conditions. *Journal of Virological Methods* 164(1-2), 19-23.

McElhinney, L., Fooks, A.R. and Radford, A.D. (2008) Diagnostic tools for the detection of rabies virus. *EJCAP* 18(3), 224-230.

OIE. (2011) *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 7th ed, Paris.

Picard-Meyer, E., Barrat, J. and Cliquet, F. (2007) Use of filter paper (FTA®) technology for sampling, recovery and molecular characterisation of rabies viruses. *Journal of Virological Methods* 140(1-2), 174-182.

Pital, A. and Janowitz, S.L. (1963) Enhancement of staining intensity in the fluorescent antibody reaction. *J. Bacteriol.* 86, 888-889.

Robardet, E., Cliquet, F. (2010) Inter-laboratory trial 2009: Fluorescent antibody test (FAT), Rabies Tissue Culture Infection test (RTCIT), Mouse Inoculation Test (MIT). Report of the Community Reference Laboratory for Rabies, January 2010, 43p.

Robardet, E., Andrieu, S., Rasmussen, T.B., Dobrostana, M., Horton, D.L., Hostnik, P., Jaceviciene, I., Juhasz, T., Muller, T., Mutinelli, F., Servat, A., Smreczak, M., Vanek, E., Vazquez-Moron, S., Cliquet, F., Demerson, J.-M., Picard-Meyer, E., Moroz, D., Trotsenko, Z., Drozhzhe, Z., Biarnais, M. and Solodchuk, V. (2013) Comparative assay of fluorescent antibody test results among twelve European National Reference Laboratories using various anti-rabies conjugates. *Journal of Virological Methods*. 191, 88-94

Rudd, R.J., Smith, J.-S., Yager, P.A., Orciari, L.A. and Trimarchi, C.V. (2005) A need for standardized rabies-virus diagnostic procedures: Effect of cover-glass mountant on the reliability of antigen detection by the fluorescent antibody test. *Virus Research. Rabies in the Americas* 111(1), 83-88.

Rudd, R.J. and Trimarchi, C.V. (1989) Development and evaluation of an *in vitro* virus isolation procedure as a replacement for the mouse inoculation test in rabies diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* 27(11), 2522-2528.

Upcott, D.H. and Markson, L.M. (1971) Some aspects of fixation in the fluorescent antibody test for rabies. *Tropical Animal Health and Production* 3(2), 83-85.

Webster, W.A. and Casey, G.A. (1996) Virus Isolation in neuroblastoma cell culture, *Laboratory techniques in rabies*. Vol. Fourth Edition. World Health Organization. pp. 476.

WHO. (1996) *Laboratory techniques in rabies*, 4th edition ed, edited by F. Meslin, C. Kaplan and H. Koprowski. Geneva. 476 pp.

WHO. (2005) WHO Expert Consultation on rabies. World Health Organization technical report series. 931, 1-88.

WHO, (2010) *Rabies Pre and Post exposure Prophylaxis in Humans*. World Health Organization. 1-21



Agenda

Réunion scientifique annuelle 2013 d'Epizone

André Jestin (andre.jestin@anses.fr)

Anses, Direction scientifique des laboratoires, Maisons-Alfort, France

La 7^e réunion annuelle d'EPIZONE sur le thème « Rien n'est permanent, sauf le changement » se tiendra du 1^{er} au 4 octobre 2013 à Bruxelles, en Belgique ; elle est organisée par le CODA-CERVA. L'expression « Rien n'est permanent, sauf le changement » s'applique particulièrement aux épizooties virales et l'est d'autant plus en raison de la circulation internationale des animaux, des produits d'origine animale et des personnes, ainsi que de l'éventuelle introduction délibérée de pathogènes. De plus, la politique de non-vaccination et d'éradication appliquée par l'Union européenne est maintenue dans la plupart des cas afin de permettre les échanges sans restriction d'animaux et de

leurs produits dans le monde entier. Tous ces facteurs placent la surveillance au centre de la reconnaissance du statut des maladies et de leur impact ultérieur sur le commerce. Dans ce contexte, la détection précoce de maladies ayant un éventuel caractère épizootique est de la plus grande importance. L'accent sera mis sur les thèmes d'EPIZONE visant à améliorer la lutte contre les maladies par l'intégration et la participation collaborative de la recherche au niveau du diagnostic, des stratégies d'intervention, de l'évaluation des risques, de la surveillance et de l'épidémiologie.

Réalisation graphique et éditoriale

Directeur de la publication: Marc Mortureux

Rédacteur en chef: Paul Martin

Rédacteur en chef adjoint: Barbara Gouget

Comité de rédaction: Maria Laura Boschioli (France, Anses), Sabine Delannoy (France, Anses), Bertrand Lombard (France, Anses), Stefano Morabito (Italie, ISS), Françoise Petter (OEPP), Elisabeth Repérant (France, Anses), Christian Tricard (France, SCL), Thierry Van Den Berg (Belgique, Coda Cerva), Eric Verdon (France, Anses)

Merci à Pascale Parisot pour la relecture du numéro

Création/réalisation: Julien Vigneron, Céline Leterq, Fabrice Coutureau, Parimage

Crédits photos: Istituto Superiore di Sanità

ISSN 2110-5294



Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
27-31 avenue du général Leclerc
94701 Maisons-Alfort Cedex
www.anses.fr