



AGENCE FRANÇAISE  
DE SÉCURITÉ SANITAIRE  
DES ALIMENTS

Maisons-Alfort, le 17 mars 2010

## AVIS

### de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation d'un protocole de sauvegarde de la génétique d'un élevage infecté de tuberculose

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

#### RAPPEL DE LA SAISINE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 4 février 2010 par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) d'une demande d'évaluation d'un protocole de sauvegarde de la génétique d'un élevage infecté de tuberculose.

#### CONTEXTE

A la suite de la confirmation d'un foyer de tuberculose bovine dans un élevage sélectionneur de race charolaise de très haute valeur génétique, le Laboratoire national de contrôle des reproducteurs (LNCR) a élaboré, à la demande de la DGAI, un protocole ayant pour objectif de sauvegarder le patrimoine génétique de cet élevage avant son abattage total.

L'Afssa est saisie d'une demande d'avis sur la pertinence du protocole proposé, notamment quant à sa capacité de prévenir par la suite une résurgence du foyer de tuberculose bovine.

#### METHODE D'EXPERTISE

L'expertise collective a été réalisée par le Comité d'experts spécialisé « Santé animale » (CES SA) réuni le 10 mars 2010, sur la base d'un rapport initial préparé par deux rapporteurs, membres du CES SA.

L'expertise s'est appuyée sur :

- des documents fournis par la DGAI :
  - saisine datée du 04 février 2010 ;
  - protocole de sauvegarde de la génétique d'un élevage charolais, avant abattage pour cause de tuberculose bovine (« Protocole sanitaire\_tuberculose.v2 »/LNCR, 13, rue Jouët, 94704, Maisons-Alfort) ;
- des documents fournis par le LNCR :
  - Manual of the International Embryo Transfer Society, *A procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures*, 3<sup>rd</sup> Edition, D.A. Stringfellow & S.M. Seidel Eds., IETS, USA ;
  - des sources bibliographiques citées en fin d'avis ;

27-31, avenue  
du Général Leclerc  
94701  
Maisons-Alfort cedex  
Tel 01 49 77 13 50  
Fax 01 49 77 26 13  
www.afssa.fr

REPUBLIQUE  
FRANÇAISE

- des chapitres 4.5. « Collecte et traitement de la semence de bovins, de petits ruminants et de verrats », 4.7. « Collecte et manipulation des embryons du bétail et d'équidés collectés *in vivo* », 4.8. « Collecte et manipulation des ovocytes/embryons du bétail et d'équidés produits *in vitro* » et 11.7. « Tuberculose bovine », de l'OIE Terrestrial Animal Health Code, Edition 2009. [http://www.oie.int/fr/normes/mcode/fr\\_sommaire.htm](http://www.oie.int/fr/normes/mcode/fr_sommaire.htm) ;
- des avis de l'Afssa suivants:
  - avis 2007-SA-0351 relatif à une demande d'appui scientifique et technique en vue de l'évaluation d'un protocole interféron gamma mis en œuvre en Dordogne ;
  - avis 2008-SA-0154 relatif à une demande d'appui scientifique relatif aux conditions de suivi des cheptels abattus partiellement dans le cadre de la tuberculose en vue de leur requalification compte-tenu des qualités intrinsèques des tests ;
  - avis 2009-SA-0280 relatif aux mesures visant à renforcer la lutte contre la tuberculose bovine en Côte-d'Or.

## ARGUMENTAIRE

L'argumentaire de l'Afssa est fondé sur l'avis du Comité d'experts spécialisé « Santé animale » dont les éléments sont présentés ci-dessous :

### « 1 Réalité du risque »

*Mycobacterium bovis*, seul agent de tuberculose bovine rencontré actuellement en France chez les bovins, est considéré, tant par l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) que par la Société internationale de transfert embryonnaire (IETS), comme :

- *potentiellement transmissible par le sperme d'animal infecté (Roumy, 1966 ; Wentink et al., 2000 ; Cousins, 2001). Bien que possible, cette transmission semble rare à très rare (François, 1958) et n'est réellement importante, semble-t-il, que dans la phase terminale de l'infection ;*
- *classé en catégorie 4 de la classification du code de l'OIE et du manuel de l'IETS, qui correspond aux agents pathogènes pour lesquels des études ont été réalisées ou sont en cours, indiquant :*
  - *qu'aucune conclusion ne peut encore être tirée quant au niveau de risque de transmission, ou*
  - *que le risque de transmission par transfert d'embryons pourrait ne pas être négligeable, même si les embryons sont correctement manipulés entre la collecte et la transplantation, comme indiqué dans le manuel de l'IETS.*

*Cependant, Bielanski et al. (1999) n'ont pas été en mesure d'isoler M. bovis à partir de 56 embryons ou ovules non fécondés et de 29 ovocytes, prélevés sur 12 génisses infectées expérimentalement par M. bovis, sans signe clinique mais présentant toutes des lésions évocatrices des nœuds lymphatiques thoraciques. Les auteurs concluaient alors que le risque de transmission de M. bovis via le transfert d'embryons apparaissait improbable à partir d'animaux sans signe clinique ni lésion de l'appareil génital.*

*Le code de l'OIE, comme le manuel de l'IETS, prévoient explicitement que la récolte de matériel génétique bovin ne peut s'envisager qu'à partir d'animaux appartenant à un effectif officiellement indemne de tuberculose bovine ou n'étant pas éliminés dans le cadre de l'assainissement d'un foyer confirmé, ce qui est néanmoins le cas pour le cheptel considéré.*

## 2 Rappel du protocole proposé

Le protocole présenté, qui prend en compte les recommandations de l'IETS en matière de prévention des risques sanitaires, prévoit en conséquence, à la fois :

- l'utilisation des biotechnologies de la reproduction, collecte et congélation de sperme pour les mâles et production et congélation des embryons pour les femelles ;
- les contrôles sanitaires associés suivants destinés à s'assurer de l'absence d'infection des animaux donneurs, bien que ces animaux appartiennent à un cheptel infecté de tuberculose bovine :

- Exigences à satisfaire en vue de la collecte et de la conservation du sperme des mâles sélectionnés :

Ce premier chapitre du protocole prévoit de garantir l'absence d'infection des mâles donneurs de sperme par la mise en œuvre successive :

- ✓ d'une intradermo-tuberculination comparative (IDC) et d'un test de dosage de l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) associés à un examen clinique général et de l'appareil génital 7 à 10 jours avant la collecte de sperme ;
- ✓ du même examen clinique le jour de la collecte et d'un examen biologique et sanitaire de la semence aux trois étapes de préparation (sperme pur, semence diluée, semence congelée) ;
- ✓ d'une analyse par PCR spécifique du groupe tuberculosis (PCR) sur sperme pur ;
- ✓ d'une inspection post mortem des animaux donneurs avec élimination du sperme des animaux à lésions évocatrices et analyse systématique par PCR des nœuds lymphatiques pulmonaires.

- Exigences à satisfaire en vue de la collecte ou de la production et de la conservation d'embryons produits in vivo ou fécondés in vitro :

Ce second chapitre du protocole prévoit de garantir l'absence d'infection des femelles donneuses d'embryons ou d'ovocytes par la mise en œuvre successive :

- ✓ d'une intradermo-tuberculination comparative (IDC) et d'un test de dosage de l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) associés à un examen clinique général et de l'appareil génital 7 à 10 jours avant la collecte des embryons ou des ovocytes,
- ✓ pour les embryons produits in vivo :
  - du même examen clinique le jour de la collecte ;
  - d'une analyse par PCR spécifique du groupe tuberculosis (PCR) sur le liquide de collecte et sur les ovules non fécondés et/ou les embryons dégénérés ;
  - d'une inspection post mortem des animaux donneurs avec élimination des embryons issus d'animaux à lésions évocatrices et analyse systématique par PCR des nœuds lymphatiques pulmonaires,
- ✓ pour les embryons produits in vitro :
  - d'une inspection post mortem des animaux donneurs avec recherche systématique par PCR sur les nœuds lymphatiques pulmonaires ;
  - d'une analyse systématique par PCR sur un échantillon du liquide folliculaire et sur les ovules non fécondés et/ou les embryons dégénérés.

Le sperme utilisé proviendra soit des mâles contrôlés selon le protocole ci-dessus, soit d'un centre de collecte agréé.

L'ensemble des semences et embryons conservés ne seront utilisables pour des inséminations, productions d'embryons in vivo et/ou fécondations in vitro qu'au sein de l'élevage concerné, sur des femelles sélectionnées avant abattage ou sur des femelles de repeuplement après assainissement.

### **3 Analyse du protocole**

Selon le LNCR, « le manuel des procédures recommandées par le manuel IETS est cité en référence dans tous les textes internationaux. Le principe est que, pour s'affranchir des risques sanitaires associés au transfert d'embryons, il est nécessaire de suivre les règles de l'IETS (décrites précisément dans un des chapitres du manuel). La base est de manipuler les embryons en pratiquant un « lavage des embryons » selon un protocole précis (10 lavages successifs en réalisant une dilution de 1/100 à chaque fois). En respectant ce protocole, les embryons lavés sont débarrassés des contaminants (qui peuvent être des [agents] pathogènes), même si ces derniers sont présents à des concentrations élevées dans le liquide de collecte de départ. C'est une règle générale, bien qu'il existe quelques exceptions (BoHV-1 et Mycoplasma spp. qui s'adsorbent sur l'embryon). Lorsque des contrôles de qualité sont effectués, la règle est de travailler :

- (1) sur les liquides de collecte ;
- (2) sur les liquides de lavage (il est préconisé de mélanger les trois derniers bains) ;
- (3) sur les embryons dégénérés ou non fécondés.

Par rapport aux risques de contamination, il existe une différence fondamentale entre les embryons produits *in vivo* (*in vivo-derived embryos* en anglais) et les embryons produits *in vitro* (*in vitro-produced embryos*), liée à la structure de la zone pellucide (ZP). Cette dernière est en effet différente dans sa structure biochimique chez l'embryon produit *in vitro*, car [sa synthèse] n'est pas encore terminée (l'ovocyte est récupéré dans le follicule avant sa maturation). En revanche, lorsqu'on collecte des embryons *in vivo*, c'est l'ovule (ZP terminée) qui est naturellement sorti du follicule, puis qui a été fécondé dans l'oviducte, l'embryon étant récupéré à J7 (après insémination artificielle). Cette différence de structure de la ZP a une incidence sur la capacité d'adsorption des agents pathogènes. Ainsi, on peut considérer que l'embryon *in vivo* est assez peu sensible aux contaminations (hormis quelques exceptions citées ci-dessus), et que le lavage permet de s'en affranchir assez facilement. En revanche, cette structure particulière de la ZP de l'embryon produit *in vitro* fait qu'un beaucoup plus grand nombre d'agents se fixent sur l'embryon produit *in vitro* et qu'il est beaucoup plus difficile de s'en séparer. »

Concernant la mise en œuvre d'une intradermo-tuberculination comparative (IDC) et d'un test de dosage de l'IFN- $\gamma$  associés à un examen clinique général et de l'appareil génital 7 à 10 jours avant la collecte du matériel génétique chez les animaux mâles et femelles

- Les valeurs intrinsèques des tests tuberculiques intradermiques (intradermo-tuberculination simple, ou IDS, et IDC) et IFN- $\gamma$  utilisables pour la sélection des animaux sont présentés dans le tableau 1.

**Tableau 1 : Estimation des caractéristiques des tests de diagnostic de la tuberculose bovine (avis Afssa 2007-SA-0351)**

	<b>Sensibilité (%)*</b>	<b>Spécificité (%)</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	88,4 [80,9 -100]	96,6 [87,7-99,2]
<b>IDS</b>	80-91	75,5-96,8
<b>IDC</b>	55,1-93,5	88,8-100

- Des résultats discordants étant régulièrement observés entre les tests intradermiques, d'une part, et le test IFN- $\gamma$ , d'autre part, l'association des deux types de tests en parallèle doit conduire à une augmentation de la sensibilité et donc limiter le nombre d'animaux infectés à réponse négative et sélectionnés pour les dons ultérieurs.
- En revanche, la sensibilité de l'IDS étant généralement supérieure à celle de l'IDC, la sensibilité de son association au test IFN- $\gamma$  sera très certainement supérieure à l'association IDC/IFN- $\gamma$  proposée dans le protocole.

*Concernant l'inspection post mortem des animaux donneurs, avec élimination des animaux à lésions évocatrices et analyse systématique par PCR sur les nœuds lymphatiques pulmonaires*  
Dans son avis 2008-SA-154 portant sur les conditions requises pour les abattages partiels en tuberculose bovine, l'Afssa recommandait, pour le contrôle post mortem, un double contrôle systématique par culture et PCR des lésions évocatrices ou, en cas d'absence de lésion visible, des nœuds lymphatiques trachéo-bronchiques, médiastinaux et rétro-pharyngiens. En effet, la prise en compte des trois groupes de nœuds lymphatiques en lieu et place d'un seul groupe devrait conférer à l'examen proposé une sensibilité supérieure.

*Concernant les analyses PCR et le test IFN- $\gamma$  proposés dans le protocole*

*Leurs spécifications techniques ne sont pas présentées. Il conviendrait que les protocoles techniques suivis (cible génique et mode d'extraction nucléique pour la PCR, antigènes utilisés et modalités d'interprétation pour le test IFN- $\gamma$ , notamment) répondent aux recommandations actuelles du Laboratoire national de référence (LNR) tuberculose pour en garantir un niveau de sensibilité optimal, tant pour la détection de *M. bovis* sur l'animal donneur que sur le matériel génétique prélevé et les liquides de lavages ou de collecte.*

*Moyennant la prise en compte de ces quelques recommandations, le protocole proposé maximise la probabilité de détection de l'infection tuberculeuse sur le matériel génétique devant être conservé pour une utilisation ultérieure sur le troupeau de renouvellement du cheptel abattu pour tuberculose.*

*Dans ce nouveau troupeau (issu de l'ancien), et compte tenu de l'importance des moyens utilisés pour limiter à l'extrême le risque de contamination par le matériel génétique, il conviendra de mettre en œuvre tous les contrôles de suivi nécessaires au dépistage précoce d'une éventuelle résurgence de tuberculose, de quelque nature qu'elle soit (environnement, introduction d'animaux...).*

#### **4 Conclusion et proposition d'avis du CES SA**

*Considérant le risque potentiel, quoique vraisemblablement minime, de transmission de *Mycobacterium bovis* par la semence et par les embryons produits in vivo ou in vitro, dès lors que le matériel génétique est prélevé sur un bovin infecté de tuberculose ;*

*Considérant que ce risque est d'autant plus faible que l'animal donneur ne présente ni signes cliniques, ni lésions thoraciques, abdominales ou génitales, évocatrices de tuberculose ;*

*Considérant la meilleure sensibilité de l'IDS par rapport à l'IDC ;*

*Considérant la meilleure sensibilité d'une PCR spécifique du groupe *M. tuberculosis* réalisée sur trois groupes de nœuds lymphatiques (trachéo-bronchiques, médiastinaux et rétro-pharyngiens) par rapport à celle réalisée sur un seul groupe de nœuds lymphatiques ;*

*le Comité d'experts spécialisé « Santé animale » émet un avis favorable quant à la pertinence du « protocole de sauvegarde de la génétique d'un élevage charolais, avant abattage pour cause de tuberculose bovine », présenté dans la saisine.*

*Il recommande néanmoins, pour réduire ce risque de minime à quasi nul :*

- d'utiliser l'IDS en place de l'IDC, pour la réalisation des contrôles ante mortem sur les animaux donneurs ;*
- de réaliser la recherche systématique de *M. bovis* par PCR spécifique sur les trois groupes de nœuds lymphatiques (trachéo-bronchiques, médiastinaux et rétro-pharyngiens) après abattage et inspection post mortem des animaux donneurs ;*
- de s'assurer auprès du LNR que les spécifications des tests PCR et interféron- $\gamma$  proposés sont de nature à leur conférer une sensibilité optimale. »*

**CONCLUSION**

Tels sont les éléments d'analyse que l'Afssa est en mesure de fournir en réponse à la saisine de la DGAI concernant une demande d'évaluation d'un protocole de sauvegarde de la génétique d'un élevage infecté de tuberculose.

**Le directeur général**

**Marc MORTUREUX**

**MOTS-CLES**

Tuberculose bovine, élevage, sauvegarde génétique, *Mycobacterium bovis*

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

Bielanski A, Hutchings D, Turcotte C (1999) Status of embryos and ova collected from superovulated heifers experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Theriogenology*, 51, 270.

OIE collaborating Centre for Diagnosis of Animal Diseases and Vaccine Evaluation in the Americas (2007) Bovine Tuberculosis Fact sheet, Last Updated: July 20, 2009, Institute for International Cooperation in Animal Biologics, Collaborating Veterinary Medicine, Iowa State University, 6 pp. [http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine\\_tuberculosis.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_tuberculosis.pdf).

Cousins DV (2001) *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*. 20, 1, 71–85.

Françis J (1958) Tuberculosis in animals and man (Ed. Cassel, Londres, GB).

Roumy B (1966) Une enzootie de tuberculose bovine transmise par insémination artificielle. *Rec. Med Vet*. CXLII. 729-741.

Van Soom A, Imberechts H, Delahaut P, Thiry E., Van Roy V, Walravens K, Roels S, Saegerman C (2008) Sanitary control in bovine embryo transfer: where practice meets science. Proceedings of the 24<sup>rd</sup> Scientific meeting of the EETA, Pau, France, September 12<sup>th</sup>-13<sup>th</sup> 2008, 95-117.

Wentink GH, Frankena K, Bosch JC, Vandehoek JED, van den Berg T (2000) Prevention of disease transmission by semen in cattle. *Livestock Production Science*, 62, 207–220.