

Maisons-Alfort, le 5 décembre 2008

Avis

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur le diagnostic de la morve

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

Rappel de la saisine

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie par courrier en date du 20 octobre 2008 par la Direction générale de l'alimentation (DGAI) d'une demande d'avis sur le diagnostic de la morve.

Cette saisine découle de l'introduction en France de chevaux importés depuis une zone du Brésil dans laquelle a été recensé un cas de morve, et donc susceptibles d'avoir été infectés par la bactérie *Burkholderia mallei* responsable de cette maladie.

Les questions posées sont les suivantes :

- préciser la valeur du diagnostic de la morve par la seule utilisation du test sérologique de la fixation du complément en remplacement du test à la malléine, cette question découlant de l'impossibilité de réaliser sur les chevaux les tests de malléination prévus par la réglementation (réactif biologique non disponible) ;

et dans la mesure où le test de la fixation du complément serait reconnu comme utilisable sans être associé au test à la malléine :

- déterminer et définir les situations de suspicion nécessitant une confirmation par un test de laboratoire discriminant, notamment pour ce qui est des suspicions cliniques et des suspicions non cliniques (lien épidémiologique avec un animal atteint ou avec une zone reconnue infectée de morve, résultats d'analyses autres que la fixation du complément permettant de suspecter l'infection par la morve) en indiquant la définition d'un animal suspect de morve ;

- définir le statut des équidés en fonction des conditions de suspicion et des résultats du test, en indiquant notamment la définition d'un équidé atteint de morve ;

- recommander des mesures de gestion vis-à-vis des équidés suspects de morve et des équidés reconnus atteints de morve ;

- recommander des mesures de gestion vis-à-vis de l'établissement (locaux et équidés présents avant le diagnostic) dans lequel l'animal reconnu atteint a été identifié, en précisant les modalités d'assainissement et de surveillance (mesures et durée de ces mesures) auxquelles il doit être soumis.

Avis du Comité d'experts spécialisé « Santé animale »

Le Comité d'experts spécialisé « Santé animale » (CES SA), réuni le 12 novembre 2008, formule l'avis suivant :

« Contexte et questions posées »

La morve^{1;2} est une maladie contagieuse affectant essentiellement, dans les conditions naturelles, les équidés (ânes, mulets et chevaux). Elle est signalée aussi parfois chez le chameau et la chèvre. Elle est transmissible à l'Homme et due à la bactérie Burkholderia mallei. Les bovins, ovins et porcins sont résistants.

Elle peut évoluer chez les équidés sous forme :

- *aiguë (notamment chez l'âne, très sensible, et le mulet, chez lesquels l'incubation est courte et la mort rapide en quelques jours à quelques semaines) ;*
- *chronique (forme habituelle chez le cheval) ;*
- *ou occulte (portage inapparent) qui persiste plusieurs années (présence de lésions pulmonaires minimales sans répercussion sur l'état général).*

Dans la forme chronique, les symptômes peuvent être d'apparition tardive et n'être ainsi observés qu'après plusieurs semaines voire plusieurs mois. La symptomatologie peut être assez fruste et la maladie passer inaperçue.

Les animaux atteints des formes occultes chroniques ou sub-cliniques constituent de dangereuses sources d'infection, et pourraient représenter jusqu'à 90 % des cas d'infection.

Dans les formes cliniques, l'incubation varie, chez les équidés, d'une à deux semaines à parfois plusieurs mois. Aux fins d'application des dispositions énoncées dans le Code sanitaire pour les animaux terrestres de l'OIE, la période maximale d'incubation est fixée à six mois. Régulièrement mortelle dans ses formes cliniques, la maladie se traduit par une fièvre élevée et par le développement de nodules puis d'ulcères à localisation cutanée et respiratoire, accompagnés de lymphangite et d'adénite loco-régionale (« chancres », « cordes », et « glandes »).

Les formes respiratoires se manifestent par une tuméfaction des naseaux avec jetage jaune et collant (et infectieux), dyspnée et pneumonie.

Dans la forme cutanée ou « farcin », les lésions peuvent s'ulcérer, laissant s'écouler un pus huileux infectieux.

Les lésions profondes rencontrées chez les équidés traduisent notamment l'atteinte septico-pyohémique (abcès, adénites) et sont associées à la présence régulière des « pseudotubercules morveux » dans les poumons. L'évolution est lente, avec température irrégulière, aboutissant au bout de quelques mois à la cachexie et la mort.

La présence d'arthrite, synovite et orchite est également à prendre en compte.

La morve peut aussi affecter les carnivores domestiques l'ours, le loup et les félinés de ménagerie après consommation de viande d'équidés malades³.

Chez l'Homme, il s'agit d'une zoonose particulièrement grave (atteinte septico-pyohémique) transmise par contact direct avec les animaux malades ou à partir de matériels infectés. Dans les cas aigus non traités, la mortalité peut atteindre 95 % dans les trois semaines.

Autrefois largement répandue dans le monde, cette maladie constituait en Europe l'un des fléaux majeurs des effectifs équins civils ou militaires. Elle a été éradiquée de nombreux pays

¹ Dvorack G.D., Spickler A.R. (2008). Glanders. JAVMA, 223, 570-577.

² La morve, In : Les zoonoses infectieuses, septembre 2006, E.N.V. françaises, Maladies Contagieuses, 141.

³ Cas par exemple signalés en 1973 en Italie sur des lions ayant consommé de la viande chevaline importée, et en 1986 sur des lions du zoo d'Istanbul en Turquie.

par des mesures associant la détection réglementaire et l'élimination des animaux infectés, et des mesures de restriction à l'importation. Les derniers foyers français datent de 1965. Des foyers sporadiques étaient encore décrits ces dernières années dans quelques pays d'Afrique, du Proche et du Moyen-Orient, d'Asie ou d'Amérique du sud, notamment au Brésil⁴. L'augmentation progressive du nombre de foyers observés dans ces zones, ces dernières années, conduit certains scientifiques^{5,18} à considérer que cette maladie est ré-émergente .

Le Brésil a notifié le 5 septembre 2008 à l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) un cas de morve sur un équidé dans la zone de Sao-Paulo, située dans la région BR-1 autorisée à exporter dans l'Union Européenne (UE). Les exportations d'équidés depuis cette région ont été immédiatement interrompues. Toutefois, compte tenu de la présence éventuelle de la maladie dans la zone BR-1 avant sa notification et malgré le dépistage de cette maladie avant exportation, les équidés importés de cette zone avant le 5 septembre, peuvent présenter un risque d'infection par la morve, cette maladie étant considérée comme contagieuse sous la dénomination « Morve chez les équidés » (art. D.223-21 du Code rural). Afin de garantir leur état sanitaire, les services vétérinaires ont procédé :

- au contrôle des équidés importés du Brésil depuis le 1^{er} mars 2008, compte tenu de la durée maximale d'incubation fixée à six mois par l'OIE ;
- à la diffusion d'un message d'information à la filière équine, en vue de renforcer la vigilance des détenteurs d'équidés et le signalement précoce d'éventuels symptômes de morve en particulier, sur les équidés en provenance du Brésil ou ayant été en contact avec ces équidés.

L'encadrement légal de la morve repose en France sur les articles L223-23⁶, R223-58 et suivants⁷ du code rural qui définissent, entre autres, les équidés atteints de morve et les

⁴ Trois cas ont été déclarés en 1998 en Turquie et la maladie était encore ces dernières années signalée au Pakistan et en Mongolie (302 cas en 1997). Des foyers ont été décrits en Erythrée en 2006, en Inde en 2007 et en Iran en 2007 et 2008. Des cas ont été diagnostiqués sur des équidés importés dans les Emirats Arabes Unis en 2004. Au Brésil, 10 cas ont été décrits en 1999, 66 en 2000 et 39 en 2007.

⁵ Wittig MB, Wohlsein P, Hagen RM et al. (2006). Glanders - a comprehensive review. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 113, 323-330.

⁶ Article L223-23 : « Dans le cas de morve dûment constatée, les équidés doivent être abattus par ordre du maire. »

⁷ Articles R223-58 à 62 :

Article R223-58 : « L'animal reconnu atteint de la morve, est abattu sur place, ou dans un établissement chargé du service public de l'équarrissage, en présence des services vétérinaires qui font l'autopsie et en dressent le procès-verbal. »

Art. R. 223-59 : « L'animal suspect, c'est-à-dire celui qui, sans avoir été au contact d'un animal reconnu morveux, présente un signe clinique pouvant faire soupçonner l'existence de la morve, est soumis à l'épreuve de la malléine.

Si cette épreuve révèle l'existence de la maladie, l'animal est abattu, dans les conditions de l'article R. 223-58.

Si le résultat de l'épreuve est négatif, l'animal est laissé à la libre disposition de son propriétaire.

Si le résultat de l'épreuve est douteux, l'animal est maintenu séquestré pour être soumis à une nouvelle épreuve après un délai qui ne pourra excéder six semaines. »

Art. R. 223-60. –« Lorsque l'existence de la morve a été constatée, le préfet prend un arrêté portant déclaration d'infection des locaux précédemment occupés par l'animal reconnu morveux.

Cette mesure entraîne notamment l'application des dispositions suivantes :

1° Il est interdit d'introduire dans les locaux infectés des animaux sains susceptibles de contracter la morve ;

2° Les animaux contaminés sont placés sous la surveillance du vétérinaire sanitaire pendant un délai de six mois, à compter du dernier cas constaté ;

Pendant la durée de cette surveillance, le vétérinaire sanitaire les visite au moins deux fois par mois ;

3° Il est interdit d'exposer les animaux contaminés dans des concours publics, de les mettre en vente ou de les vendre ; le propriétaire ne peut s'en dessaisir que sous contrôle des services vétérinaires. »

Art. R. 223-61. – « La déclaration d'infection n'est levée par le préfet qu'après la disparition de la maladie et l'exécution de toutes les prescriptions relatives à la désinfection. »

Art. R. 223-62. – « Les chevaux, ânes et mulets qui servent aux marchands forains, aux nomades, ou

mesures de gestion de l'exploitation infectée. La détermination réglementaire du caractère « atteint » d'un animal est fondée sur l'utilisation du test à la malléine. Or, la malléine n'est disponible actuellement, ni en France, ni dans aucun autre Etat membre de l'UE. Elle n'est plus commercialisée, qu'en Turquie (CVCRI, Etlik, Ankara).

Les méthodes de diagnostic recommandées par l'OIE aux fins d'application du code sanitaire de l'OIE (« Prescribed tests for OIE listed diseases »), sont l'épreuve de malléination (ou test à la malléine) et l'épreuve sérologique de fixation du complément (FC) (http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_1.1.3.htm).

Selon la « fiche maladie » du centre collaborateur de l'OIE de l'Iowa State University aux USA⁸, et le manuel de l'OIE :

- l'épreuve de malléination, au moyen de malléine PPD (fraction protéique hydrosoluble de *B. mallei* traitée par la chaleur) peut être mise en œuvre de trois façons différentes :
 - o par injection intra-palpébrale, qui entraîne, chez les animaux infectés, un gonflement oedémateux marqué de la paupière, voire un exsudat purulent au niveau du canthus (interne), en un à deux jours. C'est la méthode la plus fiable et la plus spécifique, qui est le plus souvent préférée aux deux suivantes ;
 - o par instillation conjonctivale de quelques gouttes de malléine (PPD), laquelle induit, chez les animaux infectés, une conjonctivite, un épaississement des paupières et parfois un gonflement de la face, voire un exsudat au niveau du canthus. La réaction peut également survenir sur l'œil opposé ;
 - o par injection sous-cutanée (non-oculaire), laquelle provoque dans les 24 heures, chez les animaux infectés, un gonflement douloureux, aux bords surélevés au point d'injection.

Les trois modes d'administration entraînent également de la fièvre chez les animaux infectés. Le test sous-cutané pouvant interférer avec un dépistage sérologique ultérieur, les deux premiers modes d'administration sont généralement préférés. L'épreuve de malléination peut induire des résultats douteux chez les animaux infectés, en phase aiguë ou dans les stades avancés de la forme chronique.

- l'épreuve sérologique de fixation du complément (FC), comme toutes les autres épreuves sérologiques actuellement disponibles, ne permet pas la distinction entre anticorps dus à *B. mallei* de ceux dus à *B. pseudomallei* (agent de la mélioïdose). On notera qu'aucune méthode standardisée de FC n'est actuellement préconisée par l'OIE, et qu'il n'existe, notamment, aucun sérum international de référence, permettant le titrage de l'antigène et/ou l'étalonnage de la technique utilisée. La FC est considérée par le manuel OIE comme un test moins sensible mais pour autant utilisable dans 90-95 % des cas pour le diagnostic de la morve des équidés. Sa spécificité fait l'objet de controverses⁹.

Dans le cadre de la gestion actuelle des chevaux importés du Brésil, le premier contrôle est uniquement fondé sur la fixation du complément, mais il convient de déterminer la valeur à accorder à ce test et de modifier les règles de gestion en conséquence.

Plusieurs questions ont donc été émises dans ce cadre par le pétitionnaire. Ce sont ces questions qui ont été analysées et qui ont servi de base aux réflexions des rapporteurs.

qui sont employés au halage, peuvent être visités sur la voie publique, par les services vétérinaires. »

⁸ Anonyme (2007). Glanders. Diseases Factsheets, The Center for Food Security & Public Health, Institute for International Cooperation in Animal Biologics, Iowa State University, Ames, Iowa, USA (last updated: August 31, 2007). <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/glanders.pdf>

Méthode d'expertise

L'expertise collective a été réalisée sur la base d'un rapport initial rédigé par deux rapporteurs qui a été présenté, discuté en séance et validé par moyens télématiques par le Comité d'experts spécialisé « Santé animale », réuni le 12 novembre 2008.

Elle a été conduite sur la base :

- des documents suivants :
 - étude des documents fournis par le demandeur :
 - lettre du demandeur en date du 20 octobre 2008 ;
 - procédure de contrôle d'équidés importés du Brésil en date du 10 octobre 2008 ;
 - étude de publications scientifiques et de la réglementation française (code rural) citées dans cet avis ;
 - code sanitaire pour les animaux terrestres de l'OIE, Edition 2008 : chapitre 12.11 (Morve)
http://www.oie.int/fr/normes/mcode/fr_chapitre_1.12.11.htm ;
 - manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres de l'OIE, Edition 2008, Chapitre 2.5.11 (Glanders)
http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.05.11_GLANDERS.pdf ;
- des échanges téléphoniques et télématiques avec la DGAI et le LNR ;
- de la discussion entre les experts du CES SA et les rapporteurs.

Argumentaire

Question 1 : Quelle est la valeur du diagnostic de la morve par la seule utilisation du test sérologique de la fixation du complément en remplacement du test à la malléine ?

Divers tests sérologiques sont utilisables pour diagnostiquer la morve chez les équidés, incluant des tests de FC, des ELISA^{9;10;11}, des épreuves d'hémagglutination indirecte¹², de contre immunoélectrophorèse¹³, d'agglutination sur lame au rose bengale¹⁴ et d'immunofluorescence indirecte¹⁵ ou des immunoblots¹⁶.

⁹ Verma R.D., Sharma J.K., Venkateswaran K.S., Batra H. (1990) Development of an avidin-biotin dot enzyme-linked immunosorbent assay and its comparison with other serological tests for diagnosis of glanders in equines. *Vet Microbiol.*, **25**, 77-85.

¹⁰ Katz J.B., Dewald R., Nicholson J.M., (2000). Procedurally similar competitive immunoassay systems for the serodiagnosis of *Babesia equi*, *Babesia caballi*, *Trypanosoma equiperdum*, and *Burkholderia mallei* infection in horses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **12**, 46-50.

¹¹ Neubauer H., Sprague L.D., Zacharia R., Tomaso H., Al Dahouk S., Wernery R., Wernery U., Scholz H.C. (2005). Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses: state-of-the-art and perspectives. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* **52**, 201-205.

¹² Zhang W.D., Lu Z.B. (1983) Application of an indirect haemagglutination test for the diagnosis of glanders and melioidosis. *Chinese J. Vet. Med.*, **9**, 8-9.

¹³ Jana A.M., Gupta V.K., Pandya R., Verma R.D., Rao K.M. (1982) Rapid diagnosis of glanders in equines by counter-immuno-electrophoresis. *Indian Vet. J.*, **59**, 5-9.

¹⁴ Naureen A., Saqib M., Muhammad G., Hussain M.H., Asi M.N. (2007). Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test, and some conventional serological tests for diagnosis of equine glanders. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **19**, 362-367.

¹⁵ Ma C.L., Fan S.M., Wang X., Jian L, Fang S.Q. (1986). Diagnosis of glanders in horses by the indirect fluorescent antibody (IFA) technique. *Chin. J. Vet. Sci. Technol.*, **9**, 3-5. (cité in Verma R.D. *et al.*, 1990)

¹⁶ Katz J.B., Chieves L.P., Hennager S.G., Nicholson J.M., Fisher T.A., Byers P.E. (1999). Serodiagnosis of equine piroplasmiasis, dourine, and glanders using an arrayed immunoblotting method. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **11**, 292-294.

Bien que non inclus dans la liste des tests prescrits par l'OIE, plusieurs tests ELISA (ELISA ou Dot-ELISA) ont été développés et sont utilisés pour contrôler les animaux dans le cadre des échanges internationaux d'équidés¹⁷. Le choix et la purification des antigènes (LPS ou polysaccharide capsulaire) devraient permettre à terme de disposer de tests ELISA suffisamment spécifiques et sensibles, applicables pour contrôler les équidés soumis aux échanges internationaux¹¹.

La technique de FC appliquée au diagnostic et au dépistage de la morve chez les chevaux est décrite dans le manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres de l'OIE (en partie seulement, car le nombre d'unités CH₅₀ de complément peut être de 4 ou 5, la concentration des hématies de 2 ou 3 %, et le nombre d'unités hémolytiques 100 % de l'hémolysine n'est pas précisé. De plus, aucune souche n'est spécifiquement recommandée pour la préparation de l'antigène et, comme précisé plus haut, aucune méthode de standardisation de l'antigène n'est proposée et aucun sérum étalon international n'existe).

La FC a été souvent, par le passé, préférée au test cutané à la malléine en phase d'éradication de la morve, à cause de sa capacité à détecter les porteurs cliniquement inapparents et les chevaux chroniquement infectés¹¹. Sa sensibilité a été évaluée à au moins 97 %. Un certain nombre de faux positifs était en revanche parfois rapporté.

Les résultats de la FC sont d'ailleurs sujets à variabilité dans la mesure où l'antigène est constitué d'extraits protéiques à chaud de corps bactériens obtenus par culture et inactivés par la chaleur. L'âge de la culture, l'origine et même la virulence de la souche choisie, ainsi que les modalités de préparation des antigènes peuvent influencer sur les qualités de ces derniers.

La proportion élevée des sérums susceptibles de présenter un pouvoir anti-complémentaire ne facilite pas son emploi chez les ânes, mules et mullets. Les anticorps sont détectables en général une semaine⁹ après l'infection des animaux et persistent plusieurs mois. Comme indiqué plus haut, les animaux ayant été contrôlés par le test cutané à la malléine peuvent présenter une positivité transitoire en FC (ainsi qu'à d'autres tests sérologiques) durant au moins six semaines.

Une étude pakistanaise récente¹⁴ fait état de comparaisons de divers tests sérologiques (notamment la FC) entre eux et avec la malléination, en référence avec la culture bactérienne. Sur les 110 animaux indemnes de morve testés, aucun n'a été trouvé positif ni par la malléination ni par la FC. Sur 70 animaux infectés (confirmation par isolement de *B. mallei*), seuls 6 (8,6 %) n'ont pas été détectés par la FC, contre 17 (24,3 %) par la malléination. Dans cette étude, les mêmes recherches ont été conduites sur 96 sujets potentiellement infectés (contact avec des chevaux infectés) et là encore, la FC a détecté un peu plus d'animaux positifs que la malléination (17 contre 16). La concordance (test kappa) entre la FC et la culture en regroupant les animaux reconnus infectés et indemnes (180 animaux) était de 0,927, et par rapport à la malléination de 0,861. En regroupant les animaux contacts et indemnes (206 sujets), la valeur du test kappa entre FC et malléination était égale à 0,966.

Une étude comparable, réalisée précédemment en Inde¹³, avait révélé des résultats similaires en termes de spécificité lorsque malléination et FC étaient évaluées sur des animaux indemnes (112 chevaux et 42 mules). Sur 20 animaux infectés testés, 9 (45 %) étaient positifs au test cutané, contre 20 (100 %) en FC. Enfin sur un lot de 38 chevaux exposés, deux (5,26 %) étaient positifs à la malléination et deux en FC (avec des résultats discordants pour deux sujets).

Ces études confirment les observations rapportées par de nombreux auteurs concluant à une sensibilité supérieure de la FC comparée à celle de la malléination.

¹⁷ Anonyme (2007). Glanders. Diseases Factsheets, The Center for Food Security & Public Health, Institute for International Cooperation in Animal Biologics, Iowa State University, Ames, Iowa, USA (last updated: August 31, 2007). <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/glanders.pdf>

La spécificité de la FC est donc vraisemblablement proche de 100%, mais les études précédemment présentées ne concernent que quelques centaines de sujets recrutés en zone enzootique.

La question se pose de la valeur prédictive positive de ce test, initialement développé pour des programmes d'éradication, lorsqu'ils sont prescrits non plus en région d'enzootie, mais en zone indemne. Des résultats faussement positifs sont en effet fréquemment rapportés¹¹. Les réactions sérologiques croisées sont majoritairement rencontrées dans les zones infectées par *Burkholderia pseudomallei*, l'agent de la mélioïdose (ou pseudo-morve) ; mais ni les tests sérologiques, ni les tests cutanés à la malléine, ne permettent de distinguer les réactions induites par *B. pseudomallei* de celles induites par *B. mallei*. Dans certaines zones géographiques, les animaux peuvent être également contaminés par *Burkholderia thailandensis*, une bactérie non pathogène également responsable de fausses réactions sérologiques positives. De faibles titres sérologiques rencontrés fréquemment chez des chevaux sains⁷ reflètent certainement l'existence d'antigènes bactériens communs à d'autres espèces bactériennes (complexe *Burkholderia cepacia*¹¹ par exemple). Néanmoins, au LNR, depuis trois ans au moins, aucun résultat positif n'a été observé en FC sur plusieurs centaines de chevaux vivant en France (zone indemne de *B. mallei*, *B. thailandensis* et *B. pseudomallei*) et contrôlés avant exportation.

En tout état de cause, le test de FC n'apparaît pas, au travers des données disponibles, moins performant que le test cutané à la malléine. Il peut donc être préconisé en remplacement de la malléination. La FC est d'ailleurs, comme nous l'avons déjà mentionné, un test approuvé par l'OIE pour le contrôle des équidés dans le cadre des échanges internationaux.

Concernant des équidés importés d'une zone où un cas de morve a été identifié récemment, le risque qu'ils aient été exposés à l'infection par *B. mallei*, n'est pas nul, même s'il est probablement très limité. Pour tenir compte de ce risque et par précaution, il est souhaitable de considérer et donc de traiter, au plan de la gestion, tout résultat positif comme un vrai positif (animal réellement infecté). Il en va de même pour l'observation de lésions sur le cadavre ou de signes cliniques très évocateurs de la maladie.

Sans préjuger de l'ensemble des mesures proposées en page 11 de ce rapport concernant les équidés « éventuellement contaminés de morve », **toute suspicion clinique** devrait entraîner un contrôle sérologique et la mise en œuvre d'un diagnostic bactériologique par culture pour isolement et caractérisation de *B. mallei* à partir des exsudats (incluant les sécrétions respiratoires) ou des lésions après mort ou abattage de l'animal. **Toute suspicion nécropsique**, avec mise en évidence de lésions (macroscopiques et microscopiques) évocatrices, après mort ou abattage de l'animal, devrait conduire à la même démarche. Une recherche par PCR spécifique^{18; 19} peut être aussi envisagée, d'autant que dans les formes chroniques ou inapparentes, *B. mallei* est en faible quantité dans les lésions et difficile à isoler.

Une amélioration de la spécificité de la sérologie pourrait être vraisemblablement obtenue en développant des tests ELISA avec des antigènes purifiés plus spécifiques. Aussi, dans la suite du rapport, on considèrera d'une façon générale « les épreuves sérologiques agréées », étant entendu qu'aujourd'hui, seule la FC répond à cette définition, mais que dans un avenir plus ou moins proche, d'autres épreuves sérologiques, comme l'ELISA, pourraient être également retenues comme tests officiels.

Enfin, compte tenu de la rareté de la morve et des conséquences sanitaires et économiques de la déclaration d'un cas de morve des équidés, le CES SA recommande que :

¹⁸- Ulrich M.P., Norwood D.A., Christensen D.R., Ulrich R. L. (2006). Using real-time PCR to specifically detect *Burkholderia mallei*. J Med Microbiol., **55**,551-559.

¹⁹- Scholz H.C., Joseph M., Tomaso H., Al Dahouk S., Witte A., Kinne J., Hagen R.M., Wernery R., Wernery U., Neubauer H. (2006). Detection of the reemerging agent *Burkholderia mallei* in a recent outbreak of glanders in the United Arab Emirates by a newly developed fliP-based polymerase chain reaction assay. Diagn Microbiol Infect Dis., **54**,241-247.

- Les épreuves sérologiques agréées, la recherche de *B. mallei* par culture et la PCR spécifique soient mises en œuvre exclusivement au LNR (Afssa Maisons-Alfort) ;
- Le résultat d'une épreuve sérologique agréée soit considéré comme positif lorsque ce résultat est obtenu sur deux échantillons de sérum prélevés à un mois d'intervalle ;
- Tout sérum présentant une réaction positive à une épreuve sérologique agréée fasse l'objet d'une confirmation par le laboratoire de référence de l'OIE pour la morve (FLI, léna, Allemagne)²⁰.

Question 2 : Dans la mesure où le test de la fixation du complément est reconnu comme utilisable sans être associé au test à la malléine, déterminer et définir les situations de suspicion nécessitant une confirmation par un test de laboratoire discriminant, notamment pour ce qui est des suspicions cliniques et des suspicions non cliniques (lien épidémiologique avec un animal atteint ou avec une zone reconnue infectée de morve, résultats d'analyses autres que la fixation du complément permettant de suspecter l'infection par la morve) en indiquant la définition d'un animal suspect de morve

et

Question 3 : Comment définir le statut des équidés en fonction des conditions de suspicion et des résultats du test, en indiquant notamment la définition d'un équidé atteint de morve ?

Les définitions suivantes pourraient être adoptées concernant le statut des animaux et des établissements renfermant des équidés au regard de la morve :

- **Equidés**

- **« Equidé suspect de morve » :**
 - équidé qui exprime des signes cliniques évocateurs de morve des équidés ou, en cas de mort ou d'abattage, présente à l'autopsie un tableau nécropsique évocateur de morve des équidés ;
 - ou
 - équidé qui, en l'absence de symptômes, présente une réaction positive à « une épreuve sérologique et/ou allergique agréée » de diagnostic de la morve.
- **« Equidé infecté de morve » :**
 - équidé chez qui *Burkholderia mallei* a été isolée et identifiée ;
 - ou
 - équidé :
 - qui exprime des signes cliniques évocateurs de morve des équidés ou en cas de mort ou d'abattage, qui présente à l'autopsie un tableau nécropsique évocateur de morve des équidés
 - et
 - présente une réaction positive à « une épreuve sérologique, moléculaire et/ou allergique agréée » de diagnostic de la morve ;
 - ou
 - « équidé contaminé de morve » et :
 - qui exprime des signes cliniques évocateurs de morve des équidés ;
 - ou
 - qui, en cas de mort ou d'abattage, présente à l'autopsie un tableau nécropsique évocateur de morve des équidés
 - ou

²⁰- Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals (BFAV), Institute of Bacterial Infections and Zoonoses, Naumburger Str. 96a, 07743 Jena, ALLEMAGNE (Dr H. Neubauer).

- qui présente une réaction positive à « une épreuve sérologique, moléculaire et/ou allergique agréée » de diagnostic de la morve.

NB : le terme « infecté » est préféré au terme « atteint » car il est désormais couramment utilisé dans les textes réglementaires en santé animale où le terme « atteint » a quasiment disparu. Le terme « atteint » caractérise davantage l'infection accompagnée de signes cliniques ou de lésions évocatrices, alors que le terme « infecté » est plus général. Il caractérise les animaux ayant contracté l'infection ce qui n'implique pas nécessairement de manifestations cliniques ou lésionnelles.

- « **Équidé contaminé de morve** » : équidé appartenant à un établissement comprenant au moins un « équidé infecté de morve ».
- « **Équidé éventuellement contaminé de morve** » : équidé
 - appartenant à un établissement comprenant au moins un « **équidé suspect de morve** » ;
 - ou
 - importé en France à partir d'une zone (ou ayant transité dans une zone) où a été déclaré un « **équidé infecté de morve** » depuis moins de six mois après le départ de l'animal de cette zone ;
 - ou
 - ayant séjourné dans un établissement où un « **équidé infecté de morve** » a lui-même séjourné dans les six mois ayant précédé son identification comme équidé infecté.
- **Etablissements**
 - « **Etablissement infecté de morve** » : établissement comprenant au moins un « **équidé infecté de morve** » (établissement sous APDI).
 - « **Etablissement suspect de morve** » : établissement comprenant au moins un « **équidé suspect de morve** » (établissement sous APMS).

Question 4 : Quelles mesures de gestion recommander vis-à-vis des équidés suspects de morve et des équidés reconnus atteints de morve ?

et

Question 5 : Quelles mesures de gestion recommander vis-à-vis de l'établissement (locaux et équidés présents avant le diagnostic) dans lequel l'animal reconnu atteint a été identifié, en précisant les modalités d'assainissement et de surveillance (mesures et durée de ces mesures) auxquelles il doit être soumis ?

Outre les mesures déjà prévues par le code rural, le CES SA préconise les mesures suivantes :

Tout « établissement suspect de morve » doit être mis sous APMS avec la mise en place des mesures suivantes :

1. visite, recensement et contrôle de l'identification des équidés et des animaux d'autres espèces sensibles présents dans l'établissement ;
2. enquête épidémiologique destinée à identifier tous les animaux sensibles ayant pu être en contact avec le ou les équidé(s) suspect(s) dans les six mois précédant l'identification de l'animal suspect ;
3. isolement et séquestration du (ou des) « **équidé(s) suspect(s) de morve** » ;
4. isolement et séquestration de tous les équidés des animaux d'autres espèces sensibles présents dans l'établissement ;
5. interdiction de laisser entrer dans l'exploitation des équidés ou des animaux d'autres espèces sensibles, sauf dérogation accordée par le directeur départemental des services vétérinaires ;

6. interdiction de laisser sortir de l'exploitation des équidés ou des animaux d'autres espèces sensibles, sauf dérogation accordée par le directeur départemental des services vétérinaires pour leur transport direct, sans rupture de charge, soit vers un abattoir agréé, soit vers un équarrissage. Le transport hors de l'établissement doit être réalisé sous couvert d'un laissez-passer sanitaire (LPS) ;
7. de plus :
 - tout « **équidé suspect de morve** » doit faire l'objet d'investigations diagnostiques, reposant sur la mise en œuvre d'« épreuves sérologique, moléculaire et/ou allergique agréées » et/ou, le cas échéant, sur la recherche de *B. mallei* par culture, permettant de confirmer ou d'infirmer l'infection morveuse ;
 - les « **équidés éventuellement contaminés** » doivent faire l'objet, tant que la suspicion n'est pas levée :
 - o d'une recherche sérologique mensuelle de morve par fixation du complément, celle-ci devant être initiée dans les meilleurs délais ;
 - o d'une surveillance clinique mensuelle (telle que prévue au Code rural) ciblée sur le tableau clinique spécifique et non-spécifique de la morve des équidés (fièvre accompagnée de signes cutanés et/ou respiratoires évocateurs) débutée (initiée) dans les meilleurs délais ;
 - o d'une surveillance nécropsique ciblée sur le tableau lésionnel spécifique et non-spécifique de la morve des équidés en cas de mort ou d'abattage.

Ce dispositif est levé dès lors que la suspicion de morve a été levée.

Tout « établissement infecté de morve » doit être mis sous APDI avec la mise en place des mesures suivantes :

1. visite, recensement et contrôle de l'identification des équidés et des animaux d'autres espèces sensibles présents dans l'établissement ;
2. enquête épidémiologique destinée à identifier tous les animaux sensibles ayant pu être en contact avec les équidés suspects dans les 6 mois précédant l'identification de l'infection ;
3. isolement et séquestration du (ou des) « **équidé(s) infecté(s) de morve** » ;
4. isolement et séquestration de tous les équidés des animaux d'autres espèces sensibles présents dans l'établissement ;
5. interdiction de laisser entrer dans l'exploitation des équidés ou des animaux d'autres espèces sensibles, sauf dérogation accordée par le directeur départemental des services vétérinaires ;
6. interdiction de laisser sortir de l'exploitation des équidés ou des animaux d'autres espèces sensibles, sauf dérogation accordée par le directeur départemental des services vétérinaires pour leur transport direct, sans rupture de charge, soit vers un abattoir agréé, soit vers un équarrissage. Le transport hors de l'établissement doit être réalisé sous couvert d'un laissez-passer sanitaire (LPS) ;
7. de plus :
 - tout « **équidé infecté de morve** » doit être abattu sans délai avec destruction du cadavre à l'équarrissage. Le traitement antibiotique d'un « **équidé infecté de morve** » est interdit ;
 - les « **équidés contaminés de morve** » doivent faire l'objet, durant les six mois suivant l'élimination du dernier « **équidé infecté de morve** » de l'établissement infecté, d'une surveillance clinique et sérologique mensuelle (ainsi que d'une surveillance nécropsique).

Dans ce cas, et de manière à prévenir toute extension de l'infection, tout « **équidé contaminé de morve** » et présentant des signes cliniques ou nécropsiques évocateurs ou une réaction positive à un test sérologique, allergique ou moléculaire agréé doit être considéré comme « **équidé infecté de morve** ».

L'apparition d'un nouveau cas d'« **équidé infecté de morve** » dans un établissement infecté doit entraîner la prolongation de la surveillance clinique, nécropsique et sérologique de six mois.

Les locaux et matériels doivent être nettoyés et désinfectés, sachant que la transmission est habituellement indirecte chez les équidés, la voie de pénétration étant principalement digestive ou tégumentaire. Cette désinfection doit avoir lieu, si possible, après l'élimination de tout animal infecté et, dans tous les cas, après élimination du dernier animal infecté.

Le risque pour la santé publique doit être pris en compte et faire l'objet de recommandations auprès des personnes exposées.

Ce dispositif est levé dès lors qu'aucun « **équidé suspect de morve** » ou « **équidé infecté de morve** » n'a été identifié au terme d'une période de surveillance de six mois après l'élimination du dernier « **équidé infecté de morve** » de l'établissement.

Enfin, les « **équidés éventuellement contaminés de morve** » parce que :

- importés en France à partir d'une zone (ou ayant transité dans une zone) où a été déclaré un « **équidé infecté de morve** » depuis moins de six mois après le départ de l'animal de cette zone,
- ou ayant séjourné dans un établissement où un « **équidé infecté de morve** » a séjourné dans les six mois ayant précédé son identification comme équidé infecté,

doivent faire l'objet durant :

- les six mois suivant leur départ de la zone infectée initiale, dans le premier cas,
- ou durant les six mois suivant le départ de l'animal ultérieurement déclaré infecté de l'établissement où ils sont hébergés, dans le second cas :
 1. d'un isolement ;
 2. d'une recherche sérologique mensuelle de morve par sérologie agréée, celle-ci devant être effectuée dans les meilleurs délais jusqu'au terme durant la période de surveillance ;
 3. d'une surveillance clinique mensuelle ciblée sur le tableau clinique spécifique et non-spécifique de la morve des équidés (fièvre accompagnée de signes cutanés et / ou respiratoires évocateurs) durant la période de surveillance ;
 4. d'une surveillance nécropsique ciblée sur le tableau lésionnel spécifique et non-spécifique de la morve des équidés en cas de mort ou d'abattage durant la période de surveillance.

Ce dispositif est levé dès lors qu'aucun « **équidé suspect de morve** » ou « **équidé infecté de morve** » n'a été identifié au terme de la période de surveillance.

L'ensemble de ces définitions et mesures de gestion sont résumées dans le tableau en annexe.

Conclusion et recommandations

Considérant l'importation en France de chevaux d'une Région du Brésil déclarée infectée de morve le 5 septembre 2008 ;

Considérant le grave risque de santé publique que constituerait l'apparition d'un cas de morve des équidés sur le territoire national ;

Considérant la gravité de la morve chez les équidés en terme de santé animale ;

Considérant que la France, comme l'ensemble de l'Union Européenne et la plupart des Etats membres de l'OIE, est indemne de morve des équidés de très longue date ;

Considérant que l'OIE a établi la période d'incubation de la morve des équidés à un maximum de six mois ;

Considérant que les deux seules méthodes de diagnostic de la morve prescrites par l'OIE pour les échanges internationaux sont l'épreuve de malléination et l'épreuve de fixation du complément ;

Considérant l'indisponibilité de la malléine sur le territoire de l'Union Européenne et l'absence d'autorisation de mise sur le marché sur ce territoire de la seule malléine commercialisée connue (malléine produite en Turquie) ;

Considérant les bonnes valeurs intrinsèques (sensibilité et spécificité) de l'épreuve sérologique de fixation du complément pour le diagnostic de la morve,

le CES SA estime que :

- l'épreuve sérologique de fixation du complément constitue actuellement un test au moins aussi performant que l'épreuve de malléination pour le diagnostic de la morve des équidés ;
- concernant le statut, au regard de la morve, des animaux et des établissements renfermant des équidés, les définitions suivantes, dont le contenu est indiqué dans le rapport, pourraient être adoptées :
 - o « suspect de morve », « infecté de morve », « contaminé de morve » et « éventuellement contaminé de morve » pour les équidés ;
 - o « suspect de morve » et « infecté de morve » pour les établissements ;
- les « établissements infectés de morve » et « suspects de morve » devraient faire l'objet respectivement d'un APDI et d'un APMS, et être soumis aux mesures de gestion spécifiques proposées dans le rapport ;
- les « équidés éventuellement contaminés de morve » parce qu'importés en France à partir d'une zone (ou ayant transité dans une zone) où a été déclaré un « équidé infecté de morve » depuis moins de six mois après le départ de l'animal de cette zone ou ayant séjourné dans un établissement où un « équidé infecté de morve » a séjourné dans les six mois ayant précédé son identification comme équidé infecté, devraient faire l'objet d'une surveillance sérologique, clinique et nécropsique, dont le détail est indiqué dans le rapport, et destinée à établir leur statut au regard de l'infection morveuse.

Le CES SA recommande également que :

- la viande (et tout autre produit) des « **équidés éventuellement contaminés de morve** », des « **équidés contaminés de morve** », des « **équidés suspects de morve** » ne soit ni livrée à la consommation humaine, ni destinée à la préparation d'aliments pour animaux, et soit détruite, tant que tout risque de morve des équidés n'est pas définitivement écarté ;
- la viande (et tout autre produit) des animaux « **infectés de morve** » et des animaux à leur contact, ne soit ni livrée à la consommation humaine, ni destinée à la préparation d'aliments pour animaux, et soit détruite ;
- des recommandations de prévention des risques de contamination à l'homme soient faites sans délai auprès des personnes amenées à être au contact d'animaux ou de cadavres d'équidés « **éventuellement contaminés, contaminés, suspects ou infectés de morve** » et de leur environnement immédiat ;
- l'autopsie d'animaux « **éventuellement contaminés, contaminés, suspects ou infectés de morve** », l'expédition et le traitement des prélèvements destinés à la recherche bactériologique ou par PCR de *B. mallei* à partir de tels animaux soient effectués conformément à la réglementation en vigueur concernant les risques biologiques (et notamment l'arrêté du 16 juillet 2007 fixant les mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en oeuvre dans les laboratoires de recherche, d'enseignement, d'analyses, d'anatomie et cytologie pathologiques, les salles d'autopsie et les établissements industriels et agricoles où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes) ;
- les autorités de santé publique soient informées sans délai dès la survenue du cas d'un animal « **suspect de morve des équidés** » ou « **atteint de morve des équidés** ».

Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments

Tels sont les éléments d'analyse que l'Afssa est en mesure de fournir en réponse à la saisine de la Direction générale de l'alimentation concernant le diagnostic de morve.

La Directrice générale de l'Agence française
de sécurité sanitaire des aliments

Pascale BRIAND

Annexe

Statut de l'équidé	Raison	Statut correspondant de l'établissement	Mesures dans l'établissement
Suspect	<p>- équidé qui exprime des signes cliniques évocateurs de morve des équidés ou, en cas de mort ou d'abattage, présente à l'autopsie un tableau nécropsique évocateur de morve des équidés ;</p> <p>- équidé qui, en l'absence de symptômes, présente une réaction positive à « une épreuve sérologique et/ou allergique agréée » de diagnostic de la morve.</p>	Suspect	<p>APMS</p> <p>et</p> <p>Investigations diagnostiques destinées à confirmer ou à infirmer l'infection</p>
Infecté	<p>- équidé chez qui <i>Burkholderia mallei</i> a été isolée et identifiée ;</p> <p>- équidé qui exprime des signes cliniques évocateurs de morve des équidés ou qui présente à l'autopsie un tableau nécropsique évocateur de morve des équidés, et présente une réaction positive à « une épreuve sérologique, moléculaire et/ou allergique agréée » de diagnostic de la morve ;</p> <p>- « équidé contaminé de morve » et : <ul style="list-style-type: none"> o qui exprime des signes cliniques évocateurs de morve des équidés ou ; o qui, en cas de mort ou d'abattage, présente à l'autopsie un tableau nécropsique évocateur de morve des équidés ou ; o qui présente une réaction positive à « une épreuve sérologique, moléculaire et/ou allergique agréée » de diagnostic de la morve. </p>	Infecté	<p>APDI</p> <p>- Mesures de l'APMS</p> <p>et</p> <p>- Animaux infectés éliminés, abattus et détruits sans délai**</p> <p>- Animaux contaminés mis sous surveillance clinique et sérologique mensuelle et sous surveillance nécropsique, mises en œuvre sans délai et jusqu'à six mois après l'élimination du dernier animal infecté</p>
Contaminé	<p>- équidé appartenant à un « établissement infecté » et ne répondant pas à la définition d'un « équidé infecté ».</p>	Infecté	APDI
Eventuellement contaminé	<p>- équidé appartenant à un « établissement suspect » et ne répondant pas à la définition d'un animal suspect ;</p> <p>- équidé importé en France à partir d'une zone (ou ayant transité dans une zone) où a été déclaré un cas de morve des équidés depuis moins de six mois après le départ de l'animal de cette zone ;</p> <p>- équidé ayant séjourné dans un établissement où un « Equidé infecté de morve » a séjourné dans les six mois ayant précédé son identification comme équidé infecté.</p>	<p>Suspect</p> <p>Sous surveillance</p> <p>Sous surveillance</p>	<p>APMS</p> <p>Sous surveillance pendant six mois suivant le départ de la zone infectée initiale de l'équidé éventuellement contaminé.</p> <p>Sous surveillance durant les six mois suivant le départ de l'animal ultérieurement déclaré infecté de l'établissement où sont hébergés les équidés éventuellement contaminés.</p>

* Les épreuves sérologiques (fixation du complément), la recherche de *B. mallei* par culture et la PCR spécifique sont mises en œuvre exclusivement au LNR (Afssa Maisons-Alfort). Tout résultat positif en FC fait l'objet d'une vérification par le laboratoire de référence de l'OIE en Allemagne.

**Les animaux infectés font systématiquement l'objet d'une recherche de *B. mallei* par culture si cet agent n'a pas été au préalable isolé dans l'établissement.