

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 02 avril 2020

AVIS **de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,** **de l'environnement et du travail**

relatif à « la demande du Zooparc de Beauval concernant une demande de dérogation pour l'importation de primates dans le cadre d'un programme de sauvegarde »

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 3 janvier 2020 par la DGAL (SIV¹) pour la réalisation de l'expertise suivante : avis scientifique relatif à la demande du Zooparc de Beauval concernant une demande de dérogation pour l'importation de primates dans le cadre d'un programme de sauvegarde, ne permettant pas de répondre aux dispositions de l'arrêté du 19 juillet 2002² définissant les conditions sanitaires requises pour les primates importés à destination des établissements de présentation au public.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Le Zooparc de Beauval souhaite importer, depuis un établissement zoologique situé en Thaïlande, cinq primates (*Pygathrix nemaeus* ou langurs de Douc). Cette espèce est en danger, figurant à l'annexe I A de la Convention de Washington.

La Thaïlande est un pays tiers autorisé au titre de l'arrêté du 19 juillet 2002 (annexe 4), fixant les conditions sanitaires pour l'importation et le transit, sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outre-mer, des animaux vivants et de certains de leurs produits visés à l'article L. 236-1 du code rural. Cependant le parc d'origine ne peut attester du respect de l'intégralité des conditions requises aux points 3.a et 3.d du certificat sanitaire de cet arrêté.

Le Zooparc de Beauval, agréé au titre de l'annexe C de la directive 92/65/CEE, propose de mettre en place un protocole de substitution à l'attestation de ces garanties, afin de pouvoir importer les animaux. L'avis de l'Anses est demandé vis-à-vis de ce protocole de substitution.

¹ SIV^{EP} : Service d'inspection vétérinaire et phytosanitaire aux frontières

² Arrêté du 19 juillet 2002 fixant les conditions sanitaires pour l'importation et le transit, sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outre-mer, des animaux vivants et de certains de leurs produits visés à l'article L.236-1 du code rural.

L'avis de l'Anses est plus particulièrement demandé sur :

- 1. les protocoles et tests proposés, afin de s'assurer qu'ils apportent les garanties sanitaires requises quant à l'absence de possibilité de contamination humaine et animale, au regard de la dérogation sollicitée*
- 2. la mise en œuvre éventuelle de protocoles de dépistage et de quarantaine complémentaires, susceptibles d'apporter des garanties supplémentaires pour la réalisation d'un tel mouvement*
- 3. les risques sanitaires identifiés qui ne permettraient pas de procéder à une telle importation.*

Compte tenu du délai de réponse requis, les questions ont été restreintes et reformulées en accord avec la DGAL afin de s'en tenir à un avis relatif strictement à la demande de dérogation et au protocole proposé au regard des points 3.a et 3.d du certificat sanitaire. Ainsi, les questions 1 et 2 ont été reformulées comme suit et la question 3 (qui nécessite une caractérisation des dangers et une évaluation de risque pouvant faire l'objet d'une saisine ultérieure) a été supprimée.

- 1. Les protocoles et tests proposés permettent-ils d'apporter une garantie d'absence des maladies citées aux points 3.a (maladies de type Kungunya) et 3.d du certificat sanitaire (tuberculose), pour les animaux objets de la demande de dérogation ?*
- 2. Y a-t-il des protocoles de dépistage et/ou des quarantaines supplémentaires à demander, pour apporter une garantie d'absence des maladies citées aux points 3.a et 3.d du certificat sanitaire, pour les animaux objets de la demande de dérogation ?*

Des recherches ont été faites, à la fois à la DGAL et à l'Anses pour trouver la signification du terme « **maladies de type Kungunya** ». L'origine de cette insertion dans l'Arrêté du 19 juillet 2002 n'a pu être retrouvé. Néanmoins, des avis de l'Afssa avaient par deux fois³ souligné une incertitude sur l'identité du virus « kungunya » évoqué dans l'annexe 4 de l'arrêté du 19 juillet 2002, sans que ce terme ait été modifié. **Compte tenu de la situation sanitaire en Thaïlande, pour le traitement de cette saisine, le terme a été considéré par les experts comme correspondant au virus chikungunya.**

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

S'agissant de l'examen d'un protocole de dépistage préalable à l'importation de cinq primates depuis la Thaïlande, la saisine relève d'une expertise sans évaluation de risque, requérant des compétences de laboratoires spécialisés dans les maladies ciblées, à savoir le chikungunya et la tuberculose. L'expertise a donc été réalisée en interne, en nommant deux rapporteurs des laboratoires de l'Agence pour l'examen de ce protocole.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

Le vétérinaire responsable du Zooparc de Beauval a été auditionné par les deux rapporteurs, afin de recueillir des éléments d'information complémentaires, nécessaires à l'examen du protocole.

Les questions posées ont été les suivantes :

³ Rapport complémentaire à l'Avis en urgence 2002-SA-0085 et Avis 2011-SA-0341

- Point 3.a du certificat sanitaire :
 - Comment traduisez-vous l'exigence relative à la prévention des maladies « de type Kungunya » ? Sur quelle(s) maladies faites-vous porter les tests ?
 - Quelle assurance avez-vous concernant le certificat sanitaire pour les autres fièvres hémorragiques simiennes ?
 - Quelles seront les conditions de quarantaine et de transport des animaux ? Notamment vis-à-vis d'éventuelles piqûres de moustique ?
 - Quels sont les laboratoires qui seront en charge de réaliser les tests moléculaires et sérologiques prévus dans le protocole proposé ? De quelle certification (ou autre reconnaissance) disposent-ils ?
- Point 3.d du certificat sanitaire :
 - préciser le contexte du statut non indemne de tuberculose dans le parc thaïlandais Khao Kheow Open Zoo : quel espèce animale a été affectée, quel type de bacille tuberculeux a été identifié, quel est le niveau de risque de transmission de l'infection aux langurs de Douc ;
 - préciser quelle tuberculine et quel protocole d'intradermo tuberculination va être effectué ;
 - préciser les tests PCR et ELISA qui seront pratiqués, quel est le laboratoire qui réalisera les analyses ? De quelle reconnaissance dispose-t-il pour la réalisation de ces tests chez les primates (non humains, voire humains) ?
 - quelle est la situation de la rage dans le Parc thaïlandais Khao Kheow Open Zoo ? A cette question, qui n'est pas traitée dans la suite du document, il a été répondu que le Parc est indemne de rage et qu'il dispose d'une garantie d'absence de cas de rage dans un rayon de 5km autour de l'établissement. Le vétérinaire responsable du Zooparc de Beauval a indiqué lors de son audition que les animaux subiront les tests requis par l'Arrêté du 19 juillet 2002 (Annexe 4).

Suite à cette audition, les experts ont posé des questions complémentaires à propos du cas de tuberculose survenu dans le parc en Thaïlande sur un tapir malais :

- Combien de cas de tuberculose ?
- Quelle origine ? Introduction d'un animal infecté ? Transmission par des soigneurs ?
- Quel bacille : *M. tuberculosis* ou *M. bovis* ?
- Historique des différents cas ?
- Lorsqu'un cas est dépisté chez un tapir, les soigneurs sont-ils mis sous surveillance et dépistés ?
- Les soigneurs des tapirs peuvent-ils être en contact avec les singes ?
- Plan du parc zoologique indiquant notamment la position du lieu de détention des tapirs et celui des singes.

L'expertise des rapporteurs tient compte des éléments contenus dans la saisine (Annexe 2), des réponses apportées lors de l'audition et de la bibliographie figurant en fin du présent Avis.

3. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

3.1. Point 3.a du certificat sanitaire : infection à chikungunya

Les 5 animaux devant être importés sont tous nés en captivité entre 2008 et 2015 au Dusit Zoological Park à Bangkok (Province de Bangkok) et sont hébergés, pour la plupart depuis un an, au Khao Kheow Open Zoo dans la province de Chonburi. Ils ont bénéficié d'un suivi vétérinaire depuis leur naissance.

Cadre de la saisine : Le point 3a du certificat sanitaire selon l'arrêté du 19 juillet 2002 qui porte sur les « fièvres hémorragiques simiennes (FHS) ». La saisine ne concerne que « la maladie à virus Kungunya » puisque les autres FHS mentionnées dans l'arrêté (Fièvre de Crimée-Congo, fièvre

jaune, fièvre de Mayaro, maladie à virus Ebola, maladie de Marburg) ne circulent pas en Thaïlande, ce que le certificat sanitaire pourra mentionner.

Dans ce rapport et après consultation de plusieurs experts virologues et primatologues, « la maladie à virus Kungunya » a été assimilée au chikungunya. En effet il s'agit certainement d'une erreur de retranscription dans l'arrêté car il n'existe pas à la connaissance des experts d'autres « virus de type Kungunya ».

3.1.1. Introduction et données sur le chikungunya

- Le virus et sa transmission à l'homme

Le virus chikungunya (CHIKV) est un arbovirus (virus transmis par les arthropodes) dont les vecteurs sont des moustiques femelles du genre *Aedes* et principalement *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* (le moustique tigre). Ces moustiques sont susceptibles de piquer pendant la journée, bien que leur activité maximale se situe surtout tôt le matin et en fin d'après-midi. Les deux espèces piquent à l'extérieur, mais *Ae. aegypti* le fait aussi volontiers à l'intérieur des bâtiments.

La transmission du virus s'effectue d'Homme à Homme par l'intermédiaire du moustique. Lors d'une piqûre d'une personne infectée en phase virémique, le moustique prélève le virus dans le sang de cette personne. Le virus se multiplie dans le moustique pendant une dizaine de jours environ, appelée phase "extrinsèque". A l'issue de cette phase extrinsèque, ce moustique peut, à l'occasion d'une autre piqûre, transmettre le virus et infecter une nouvelle personne.

Une personne infectée est "contaminante" pour les moustiques pendant la phase virémique de l'infection, c'est-à-dire au moment où le virus est présent dans son sang, environ 1 à 2 jours avant le début des symptômes et jusqu'à 7 jours après.

Le virus peut, de manière beaucoup plus rare, être transmis par la transfusion sanguine ou la greffe (d'organes ou de cellules) ou à la suite d'un accident d'exposition à du sang provenant d'un patient virémique (piqûre avec une aiguille, projection de sang). Quelques cas de transmission materno-foetale (2^{ème} trimestre de grossesse) et périnatale ont également été rapportés.

- Le virus et les primates non-humains (PNH)

Les primates non-humains (PNH) sont également sensibles à l'infection puisqu'en Afrique, le virus est maintenu au sein d'un cycle forestier faisant intervenir des primates et des moustiques sylvatiques (*Ae. luteocephalus*, *Ae. furcifer* ou *Ae. taylori*) (Horwood et al. 2015).

De nombreuses espèces de PNH sont sensibles à l'infection par le CHIKV. A la connaissance des experts, il n'existe pas de données spécifiques sur les *Pygathrix nemaeus* mais l'infection a été rapportée en Thaïlande sur des PNH du genre *Macaca* (*M. fascicularis*, *M. nemestrin* et *M. nemestrina leonine*) et du genre *Presbytis* (*P. melalophos* et *P. obscura*) (Valentine et al. 2019). Les genres *Pygathrix* et *Presbytis* sont très proches dans la même sous famille, *Colobinae*. Les trois genres (*Pygathrix*, *Presbytis* et *Macaca*) appartiennent à la même famille, *Cercopithecidae*.

- Situation épidémiologique en France

La première épidémie due au CHIKV a été décrite sur le continent africain, en Tanzanie en 1952. L'infection par le CHIKV a depuis continué à évoluer sur un mode endémo-épidémique pour arriver à une aire de distribution qui s'étend actuellement à toute l'Afrique sub-saharienne et à l'Asie du Sud-Est.

Compte tenu de l'augmentation de l'aire de distribution d'*Ae. albopictus*, le chikungunya a également fait son apparition en Europe en 2007, touchant plusieurs centaines de

personnes durant le mois de septembre dans le Nord-Est de l'Italie. Le risque que le CHIKV se propage en Europe du sud est très surveillé par les autorités de santé. Ainsi, il existe en France depuis 2006 un plan anti-dissémination du chikungunya qui inclut une surveillance entomologique et une surveillance épidémiologique des cas d'infections (Déclaration obligatoire des cas confirmés de chikungunya) (Site de Santé publique France).

En France métropolitaine les premiers cas de contamination autochtones sont apparus en 2010 suivis de deux autres épisodes de transmission (Franke et al, 2019) :

- 2 cas en septembre 2010 dans le Var
- 12 cas en août 2014 dans l'Hérault
- 17 cas en août 2017 dans le Var

Dans les trois épisodes les cas autochtones provenaient de cas importés.

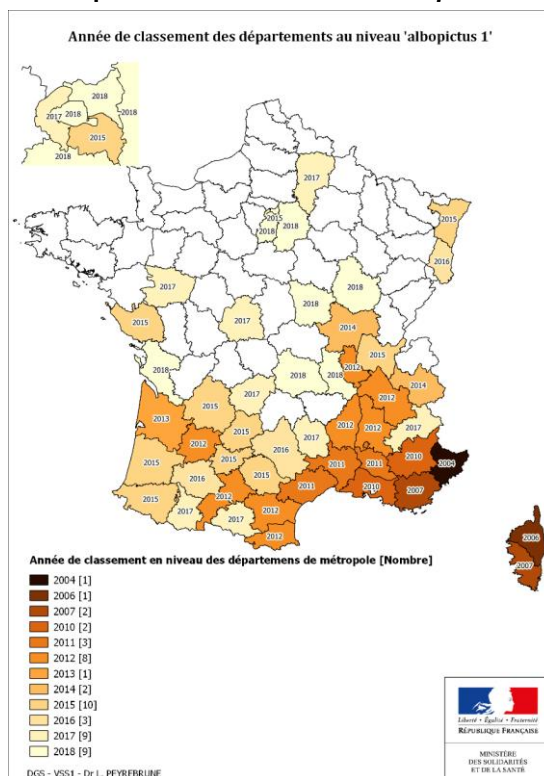
La surveillance de l'aire de distribution d'*Ae. Albopictus* en France est donc particulièrement importante pour pouvoir agir et enrayer rapidement le cycle de transmission du chikungunya à partir d'un cas importé.

- *Le moustique tigre (Ae. albopictus) en France métropolitaine* (Site solidarites-sante.gouv.fr)

Aedes albopictus est considéré comme l'espèce de moustique la plus invasive au monde. Il est originaire d'Asie du sud-est, d'où il a diffusé d'est en ouest à la faveur du transport marchand. En Europe, il a d'abord été isolé en Albanie en 1979 puis en Italie depuis 1990. Il est implanté dans le sud de la France depuis 2004 et s'étend progressivement depuis.

Au 1er janvier 2019, *Ae. albopictus* était implanté dans 51 départements métropolitains : Ain, Aisne, Alpes-de-Haute-Provence, Alpes-Maritimes, Ardèche, Ariège, Aude, Aveyron, Bas-Rhin, Bouches-du-Rhône, Charente-Maritime, Corrèze, Corse-du-Sud, Haute-Corse, Côte d'Or, Dordogne, Drôme, Gard, Gers, Gironde, Hautes-Alpes, Haute-Garonne, Hautes-Pyrénées, Haut-Rhin, Hérault, Indre, Isère, Landes, Loire, Lot, Lot-et-Garonne, Lozère, Maine-et-Loire, Nièvre, Puy-de-Dôme, Pyrénées-Atlantiques, Pyrénées-Orientales, Rhône, Saône-et-Loire, Savoie, Tarn, Tarn-et-Garonne, Var, Vaucluse, Vendée, Paris, Essonne, Hauts-de-Seine, Seine-Saint-Denis, Seine et Marne, Val-de-Marne (figure 1).

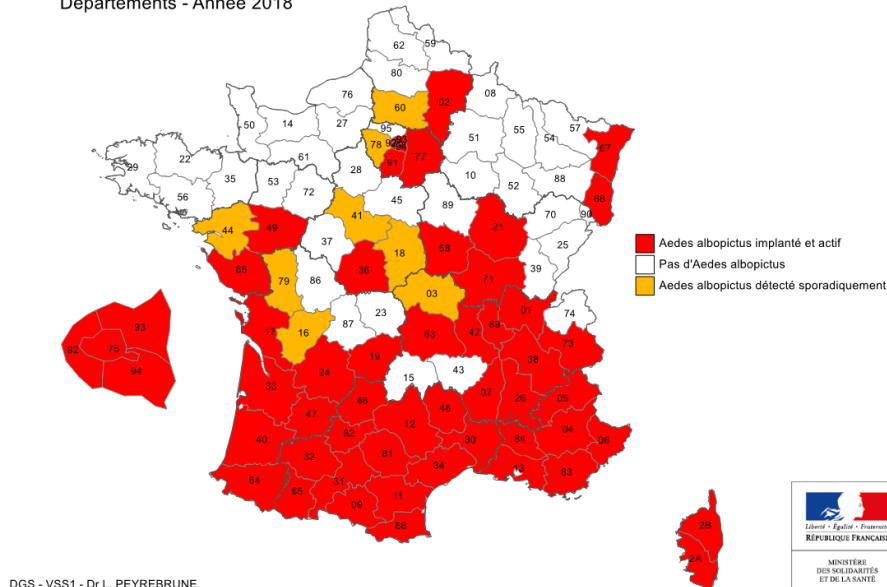
Figure 1 : Départements et année d'implantation du vecteur *Ae. albopictus* en France métropolitaine



Le Zoo de Beauval est situé à St Aignan dans le Loir et Cher (41) qui est un département dans lequel le moustique tigre n'est pas durablement implanté, mais où il a cependant déjà été détecté (figure 2).

Figure 2 : niveaux de classement des départements vis-à-vis d'*Ae. Albopictus*.

Niveau de classement "albopictus" des départements de France métropolitaine
Départements - Année 2018



- Situation épidémiologique en Thaïlande

Comme les autres pays d'Asie du Sud-Est, la Thaïlande fait partie de l'aire de distribution du CHIKV. La première épidémie de chikungunya rapportée en Thaïlande date de 1958 (Chansaenroj J. et al 2020). Elle a ensuite été suivie d'épisodes réguliers tels qu'en 2008 et

2009 avec plus de 45000 personnes atteintes dans le sud de la Thaïlande et en 2013 dans le nord de la Thaïlande. Depuis cette date une centaine de cas symptomatiques sont reportés annuellement même si ce nombre est certainement très sous-estimé. La dernière grosse épidémie date d'octobre 2018 et s'est prolongée sur toute l'année 2019 principalement dans le sud du pays. Alors que 17 cas avait été officiellement rapporté en 2017 les autorités sanitaires thaïlandaises ont dénombré un total de 3580 cas en 2018 (18 provinces sur les 76 touchées) et de 11484 cas en 2019 (56 provinces sur 76 touchées) (Site Siam Actu).

Aucun décès n'a été notifié.

- Les signes cliniques

Il est extrêmement difficile de trouver des données précises sur l'évolution de l'infection chez les PNH, mais des expériences les utilisant comme modèle animal confirment qu'ils réagissent de manière assez proche de l'Homme.

Chez l'Homme, l'infection par le CHIKV est asymptomatique dans 5 à 40% des cas selon les études.

En langue Makondée, Chikungunya signifie « l'homme qui marche courbé », ce qui évoque la posture adoptée par les malades en raison d'intenses douleurs articulaires (site de l'Institut Pasteur). L'infection à CHIKV entraîne en effet, après une période d'incubation de 2 à 15 jours maximum (4 à 7 en moyenne) après la pique du moustique, l'apparition d'une fièvre élevée (supérieure à 38,5°C), accompagnée de maux de tête, de douleurs musculaires et articulaires, qui peuvent être très invalidantes, touchant principalement les extrémités des membres (poignets, chevilles, phalanges) mais aussi les genoux et, plus rarement, les hanches ou les épaules. Une éruption cutanée sur le tronc et les membres peut également apparaître.

L'évolution est le plus souvent favorable au bout d'une dizaine de jours, sans séquelle, mais les signes articulaires peuvent perdurer sur plusieurs semaines voire plusieurs mois chez quelques patients.

Il ne semble pas que l'infection par le CHIKV soit la cause directe des quelques cas mortels rapportés lors des épidémies.

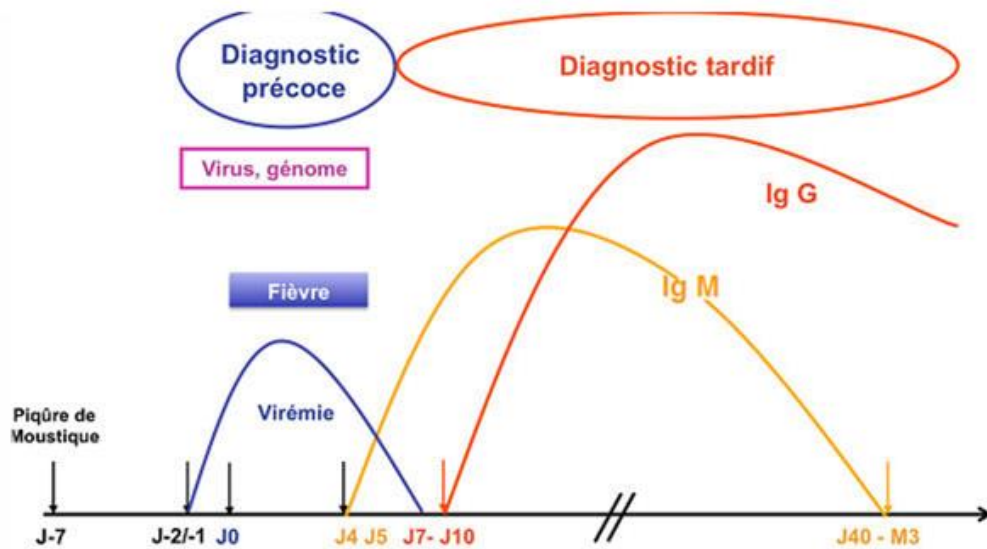
Il n'y a pas de traitement curatif contre le virus. Aucun vaccin n'a été finalisé.

Toute personne ayant déjà été infectée est *a priori* immunisée durablement contre le virus.

- Le diagnostic

Le diagnostic de l'infection par le CHIKV est réalisé par des techniques qui peuvent être directes (détection du virus par culture ou de son génome par RT-PCR) ou indirectes (détection d'anticorps par sérologie). Le schéma ci-dessous (figure 3) indique la cinétique d'apparition de la virémie, de la production des IgM et des IgG avec des temps moyens à partir de la pique du moustique.

Figure 3 : Cinétique du virus et des anticorps de type IgM et IgG au cours d'une infection par le virus du chikungunya (site de Santé Publique France)



- Le protocole proposé par le Zooparc de Beauval

Le but du certificat sanitaire qui doit être délivré selon l'arrêté du 19 juillet 2002 est de s'assurer qu'aucun animal n'entrant sur le territoire français n'est porteur des virus des fièvres hémorragiques simiennes : Ebola, Marburg, Fièvre de Crimée-Congo, Fièvre Jaune, Mayaro et Chikungunya. Si pour les 5 premiers virus l'absence de circulation en Thaïlande doit permettre de garantir par le certificat un statut indemne pour les animaux, il n'en va pas de même pour le CHIKV.

En effet la récente épidémie qui a démarré en octobre 2018 et qui s'est amplifiée tout au long de l'année 2019 montre une circulation importante du virus dans le pays. Il a été précisé dans la saisine que « la zone d'origine où se trouvaient les animaux (Khao Kheow Open Zoo (province de Chonburi)) n'est pas une zone touchée par le virus ». L'absence de cas humains rapportés dans cette région, si toutefois elle est avérée, ne peut pas garantir que le virus ne circule pas.

L'objectif du protocole proposé par le Zooparc de Beauval est de s'assurer que les PNH importés ne sont pas infectés par le CHIKV et, surtout, qu'ils ne sont pas en phase virémique au moment de leur arrivée sur le territoire français.

Le protocole proposé est le suivant :

- 1- Tester les individus à l'entrée en quarantaine dans l'institution d'origine par ELISA dans un laboratoire officiel
- 2- Tester les individus en quarantaine dans l'institution d'origine 10 jours avant leur exportation par PCR dans un laboratoire officiel
- 3- Surveiller en quarantaine (comme déjà indiqué dans le certificat sanitaire) tout signe clinique
- 4- Protéger pendant la quarantaine les animaux contre le vecteur
- 5- Protéger les caisses de transport des animaux contre le vecteur
- 6- Transférer directement les primates directement sans interruption du point de contrôle à Roissy au Zooparc de Beauval
- 7- A leur arrivée, ces individus iront dans un enclos neuf, dans lequel ils seront les premiers animaux.

- Analyse du protocole et recommandations

Sachant que les animaux seront de toute façon placés en quarantaine pendant 40 jours avant le départ, comme le prévoit le certificat sanitaire, le point 1 du protocole est tout à fait justifié et intéressant. Un test sérologique (ELISA ou autre, IFA⁴ par exemple) permettra de mettre en évidence la présence d'IgG anti-CHIKV chez les animaux, signature d'une infection résolue.

- Si les animaux sont séropositifs, la situation sera assez simple puisqu'ils sont protégés contre une nouvelle infection et ne pourront de toute façon plus être virémiques à leur arrivée sur le territoire français. Ces animaux ne présentent donc aucun risque d'importer le virus en métropole.
- Si les animaux sont séronégatifs : soit ils n'ont jamais été infectés par le CHIKV soit les tests mis en place ne permettent pas de détecter des anticorps IgG simiens (problème de spécificité d'espèces). Compte tenu de la circulation du CHIKV en Thaïlande les experts n'ont aucun doute que les institutions agréées sont capables de produire un diagnostic humain de qualité, mais les techniques sérologiques nécessitent l'utilisation d'anticorps secondaires qui peuvent être spécifiques de l'espèce. Certains anticorps secondaires antihumain vont reconnaître des anticorps simiens d'autres non. Quoiqu'il en soit, une séronégativité entraînera des conditions de quarantaine plus strictes qui seront vraiment les meilleurs moyens de maîtriser le risque d'importer des animaux virémiques en métropole.

En effet cette quarantaine devra se faire dans des conditions empêchant strictement tout contact des animaux avec des moustiques, comme indiqué dans le point 4 du protocole proposé. Une attention particulière et des garanties d'efficacité devront être mises en place pour empêcher pendant cette période de 40 jours que les animaux soient piqués par des moustiques et potentiellement contaminés par CHIKV. Si les animaux sont piqués juste avant leur mise en quarantaine, la période d'incubation (jusqu'à 15 jours max) et la période virémique (jusqu'à 7 jours) sont largement couvertes par la quarantaine. Si les animaux ne sont pas piqués pendant 40 jours, il n'y a aucun risque qu'ils arrivent virémiques sur le territoire français.

Bien entendu le point 3 sur la surveillance clinique des animaux pendant la quarantaine devra être réalisé, mais compte tenu du pourcentage d'infection asymptomatique par CHIKV, il ne peut pas être considéré comme fiable pour le Chikungunya.

De même le point 2 qui préconise une recherche par RT-PCR du génome viral (marqueur de la phase virémique) est très intéressant mais ne peut pas être considéré comme suffisant. En effet si les mesures de quarantaine, notamment celles contre les vecteurs, ne sont pas suffisantes et laissent la possibilité aux animaux d'être infectés pendant cette période, il faudrait tester les animaux quasiment tous les trois jours pour être sûr de ne pas passer à côté de la phase virémique et, de toute façon, il resterait possible que les animaux voyagent alors qu'ils ne sont seulement qu'en phase d'incubation. De plus, un trop grand nombre de tests, donc de prélèvements, ne sont pas recommandés pour le bien-être animal et ne pourraient pas garantir une absence d'infection.

Les points 5 et 6, qui complètent l'isolement des animaux vis-à-vis des vecteurs dans les différentes phases du transport, sont particulièrement importants et doivent là aussi faire l'objet d'une attention et d'une logistique particulière.

⁴ IFA : Immunofluorescence assay

En conclusion, l'étape la plus importante pour garantir que les animaux importés ne sont pas infectés par le CHIKV et, surtout, qu'ils ne représentent pas un risque sanitaire en arrivant en phase virémique, est l'étape de quarantaine qui doit être réalisée en excluant tout contact avec des moustiques.

La sérologie en début de quarantaine, si elle est positive, permettra d'être plus serein, notamment si les conditions de quarantaine ne permettent pas de garantir une absence totale de contact entre les animaux et les moustiques.

Si la sérologie est négative, afin d'anticiper et de maîtriser au maximum le risque d'importation d'animaux virémiques (par exemple, pique de moustiques pendant la quarantaine et animaux ainsi infectés), les experts recommandent de placer les animaux à leur arrivée au Zooparc de Beauval dans un enclos intérieur fermé pendant 3 semaines, en mettant en place des mesures anti-moustiques dans cet enclos, de manière à éviter tout risque qu'un moustique ne prenne son repas sanguin sur un animal et ne pique ensuite un être humain.

3.2. Point 3.d du certificat sanitaire relatif à la Tuberculose

3.2.1. Tuberculose chez les primates dans les parcs zoologiques

La tuberculose (TB) simienne est une des plus importantes maladies bactériennes chez les primates non humains (PNH), due à la nature ubiquitaire et insidieuse de l'infection et à son habilité à se propager rapidement (Buschmitz *et al.* 2009). Chez les PNH, elle est principalement provoquée par *Mycobacterium tuberculosis* – agent majeur de la tuberculose humaine - mais également par *Mycobacterium bovis* – agent majeur de la tuberculose bovine -. Bien qu'elle se manifeste usuellement comme une maladie respiratoire, la tuberculose peut se disséminer dans n'importe quel organe et provoquer une infection systémique. Les foyers de tuberculose chez des populations de PNH en captivité ont été décrits de longue date, aussi bien chez les animaux destinés à l'expérimentation que chez ceux de parcs zoologiques. En effet, les PNH sont très réceptifs et sensibles à l'infection tuberculeuse, tout bacille du complexe de *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) confondu. Bien qu'une réduction de l'incidence de la TB chez les PNH en captivité a été constatée au cours des cinquante dernières années, cette infection reste un sérieux problème pour la santé des PNH et pour leurs soigneurs. Les signes cliniques de TB peuvent être présents et variables pendant des semaines, voire des mois (Buschmitz *et al.* 2009). La TB du singe est un danger non seulement pour les autres singes au sein de la colonie mais également pour l'Homme. En effet, il s'agit d'une anthroponose : l'animal se contamine principalement à partir de l'Homme mais des cas de transmission retour à l'Homme ont également été rapportés (Buschmitz *et al.* 2009).

3.2.2. Risque de contamination tuberculeuse chez les langurs au Khao Kheow Open Zoo :

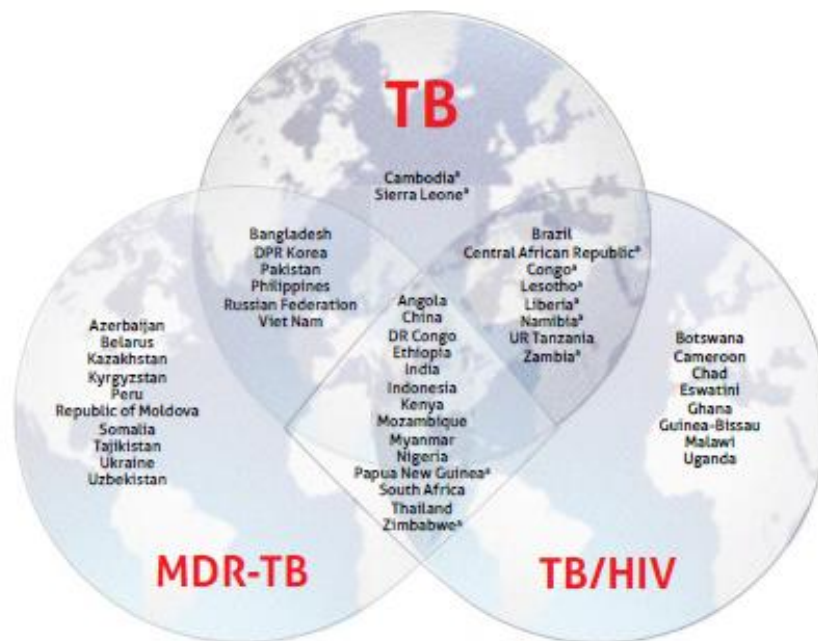
- Infection contractée à partir de l'homme

La tuberculose est une cause de mortalité majeure dans le monde et la plus mortelle parmi les maladies dues à un agent infectieux. En 2018, la tuberculose humaine a causé 10 millions de nouveaux cas dans le monde et 1,2 million de morts⁵. La tuberculose est endémique en Thaïlande, où par ailleurs une forte proportion de cas sont des patients infectés par le HIV⁶ et où les souches de *M. tuberculosis* sont multirésistantes aux antibiotiques (MDR-TB). En 2018, avec 153 nouveaux cas / 100 000 habitants, la Thaïlande est un de 14 pays du monde où la tuberculose est considérée de gravité majeure (figure 4).

⁵ https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/

⁶ Virus de l'immunodéficience humaine

Figure 4 : Les trois listes de pays à forte charge de morbidité pour la TB, TB/HIV et MDR-TB définies par l'OMS pour la période 2016-2020 et leurs zones de chevauchement



* Indicates countries that are included in the list of 30 high TB burden countries on the basis of the severity of their TB burden (i.e. TB incident cases per 100 000 population per year), as opposed to the top 20, which are included on the basis of their absolute number of incident cases per year. Also see Table 2.4.

- Historique de la situation de la tuberculose dans le parc

Le parc zoologique Khao Kheow Open Zoo n'est pas indemne de tuberculose du fait de la confirmation d'un cas de tuberculose chez un tapir malais en octobre 2019. Il s'agirait du seul cas de tuberculose diagnostiqué au Khao Kheow Open Zoo depuis les 10 dernières années. En 2017, lors d'un contrôle par intradermotuberculation (IDT), ce tapir malais, arrivé dans la collection il y avait 19 ans, avait présenté un résultat positif au test et avait été placé en quarantaine dans l'hôpital vétérinaire du zoo jusqu'à son décès. L'intradermotuberculation est le test de référence pour le dépistage de la TB chez l'animal. Les tests de confirmation de l'infection ont été un iELISA (pas d'information sur ce test) au National Institute of Animal Health, suivi d'un test MAPIA (multi-antigen print immunoassay) pratiqué par la NSTDA (National Science and Technology Development Agency) au sein de la Tuberculosis Research Team du National Center for Genetic Engineering and Biotechnology et des test PCR (voir plus loin) sur tissus au Mahidol University.

Chez les tapirs dans les parcs zoologiques, deux types d'agents tuberculeux ont pu être identifiés ces dernières années. D'une part *Mycobacterium pinnipedii*, l'agent de la tuberculose des pinnipèdes (Moser *et al*, 2008 ; Jurczynski *et al* 2011) et *Mycobacterium tuberculosis*, transmise par l'Homme (Murakami *et al*, 2012).

- Dans le premier cas, l'infection se serait probablement produite originellement par voie aérogène, entre des pinnipèdes et des tapirs, dont les enclos étaient très proches (Moser *et al*, 2008). Une fois l'infection installée dans cette espèce animale, elle a pu continuer à diffuser au sein de l'espèce, par échanges d'animaux entre parcs zoologiques européens.
- Dans le deuxième cas, l'infection a été transmise par l'Homme à l'animal, la souche de *M. tuberculosis* retrouvée chez le tapir étant la souche de TB humaine de génotype local (ville de Sao Paulo) (Murakami *et al*, 2012).

S'agissant du cas du Khao Kheow Open Zoo, les responsables du parc zoologique ont conclu que l'origine de l'infection était humaine, compte tenu des résultats de l'analyse PCR. Or ces tests peuvent distinguer *M. bovis* du reste des membres du MTBC, mais ils ne permettent pas d'être plus précis. La confirmation de l'espèce de bacille tuberculeux n'est donc pas certaine. En principe ce tapir n'a pas croisé d'autres congénères potentiellement porteurs de *M. pinnipedii* des parcs zoologiques européens.

- Contamination éventuelle des langurs du parc

- Contamination par le tapir malais infecté : le zoo a une superficie de 800 hectares. Environ 2 km séparent l'enclos des langurs de celui des Tapirs et 2,5 km séparent l'enclos des langurs et l'hôpital vétérinaire. La distance de contagion du bacille de la TB par voie aérogène est de 1 mètre. En outre, il faut une exposition répétée pour que la transmission du bacille soit efficace. La plupart des langurs sont arrivés du zoo de Bangkok (Dusit zoo) il y a 1 an, dans le cadre d'un programme de rénovation du zoo de Bangkok. Néanmoins les experts ne disposent pas de l'information précise pour les 5 candidats au transfert vers Beauval.

Par ailleurs, toute la zone de quarantaine dans laquelle se situait le tapir a été désinfectée selon un protocole à base de Virkon-S. Il apparaît peu probable que les langurs aient été contaminés par le tapir infecté

Contamination par le personnel du parc zoologique : bien que tous les employés du zoo soient suivis annuellement pour la tuberculose, étant donné la forte prévalence de la maladie humaine en Thaïlande et la faible valeur prédictive positive des tests de dépistage de la tuberculose humaine, ainsi que la forte suspicion de contamination d'origine humaine du tapir malais, il ne peut pas être exclu que d'autres animaux du parc, dont les langurs, aient été exposés à la tuberculose humaine. Selon les informations obtenues, les soigneurs des langurs et ceux des tapirs sont des personnes différentes, mais cela n'exclut pas que d'autres personnels du parc soient porteurs de TB.

- Le dépistage et le diagnostic

- a) Des tests indirects :

- L'intradermotuberculation intrapalpébrale

L'intradermotuberculation (IDT) est le test principal utilisé pour la prévention et le contrôle de la tuberculose chez les PNH. Il est considéré comme la méthode de référence pour le dépistage et le diagnostic des PNH (Lerche *et al.* 2008).

Deux types de tuberculine sont utilisés chez les PNH : la « Mammalian Old Tuberculin » (mOT) d'une part, réactif composé de nombreux antigènes mycobactériens, connu pour être sensible mais peu spécifique, et les Purified Protein Derivate (PPD) d'autre part, qui contiennent une fraction précipitée de cultures de mycobactéries filtrées, comprenant un mélange d'antigènes. La PPD (qui est une PPD B, produite par une culture de *Mycobacterium bovis*, dénommée Bovituber) est moins sensible mais plus spécifique que la mOT.

Aux Etats Unis, la seule tuberculine approuvée par l'USDA est la « Mammalian Old Tuberculin ». Dès lors, c'est la seule qui figure dans les différentes lignes directrices pour les USA, notamment dans le cadre de dépistage en quarantaine.

Toutes les publications décrivant des tests de dépistage ante-mortem de la tuberculose chez les macaques utilisent exclusivement ce type de tuberculine mOT.

Un guide, élaboré par la European Primate Veterinary Association Working Group on Tuberculosis, suggère d'utiliser la tuberculine mOT dans un contexte de forte suspicion tuberculeuse, afin de détecter les animaux infectés (Bushnitz *et al.* 2009).

Enfin, une troisième tuberculine existe, la TuberTest. Il s'agit du réactif utilisé pour dépister la tuberculose par intradermotuberculation chez l'homme. Cette tuberculine n'est pas utilisée chez les PNH car elle a de mauvais résultats en terme de sensibilité chez ces espèces.

- La sérologie

Des investigations récentes suggèrent que la détection sérologique d'anticorps, dirigés contre des antigènes spécifiques de mycobactéries, peut être utile pour le développement des méthodes immunodiagnostiques pour la tuberculose. Il y aurait une forte association entre la TB chez les PNH et la réponse humorale dirigée contre ESAT-6, une protéine spécifiquement secrétée par les bacilles virulents, métaboliquement actifs, qui appartiennent au MTBC. Quelques tests indirects ont été conçus pour détecter les anticorps dirigés contre ESAT-6 (Kanaujia *et al.* 2003 et 2004).

Le PrimaTB STATPAK® assay utilise l'ESAT-6 et le CFP-10, une autre protéine immunogénique, pour un test de diffusion latérale, qui a été développé pour le sérodiagnostic de la TB et commercialisé jusqu'en 2017. Ce test a été évalué en comparaison avec l'IDT palpébral chez un groupe de PNH, comportant des macaques cynomolgus, dont un certain nombre était infecté expérimentalement par *M. tuberculosis*. Le test a démontré une sensibilité (Se) (90 %) et une spécificité (Sp) (99 %) élevées (Lyashchenko *et al.* 2007). D'après cette étude, une combinaison de PrimaTB STAT-PAK® assay et de l'IDT peut maximiser la sensibilité diagnostique. Il est important de signaler que les prises de sang pour réaliser les tests ont été effectuées systématiquement 4 semaines après la réalisation de l'IDT, ce qui coïncide avec l'effet anamnésique-boost en sérologie, bien connu chez d'autres espèces animales, qui peut être mis en évidence 15 jours à partir d'un premier IDT (Casal *et al.* 2014). Il s'agit d'un test facile à utiliser avec du sérum ou du plasma notamment pour des institutions ayant des capacités réduites de laboratoire. Néanmoins il n'est plus produit depuis 2017 pour des raisons commerciales.

Le seul test sérologique disponible commercialement pour lequel il existe des données de la littérature est le TB-Plex assay (Luminex) de Charles Rivers (Ravindram *et al.* 2014), appelé aussi le multiplex fluometric immunoassay (MFIA). Ce test nécessite la technologie Luminex, multiplexe, coûteuse et difficile à standardiser. Il emploie 28 antigènes recombinants spécifiques du complexe de *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), y compris ESAT-6 et CFP-10. Des valeurs de spécificité variant de 87 à 95% et des estimations de sensibilité variant de 83 à 100% sont fournies par Charles Rivers. Toutefois, il s'agit de données non officiellement publiées, avec très peu de précisions sur les conditions expérimentales.

Un autre test sérologique multi-antigénique commercialisé est celui proposé par Intuitive Biosciences CSA, le Simian TB kits (AQ 1000 Image Capture and Analysis System). Ce test nécessite un système de capture et d'analyse d'images, le AQ 1000 Image Capture and Analysis System. Bien qu'il soit commercialisé pour l'utilisation chez les PNH, il n'existe pas des données publiées permettant d'évaluer la performance de ce test pour ces espèces.

Enfin, un test « iElisa » a été mentionné comme ayant été utilisé pour le diagnostic du cas index du tapir malais dans ce zoo, néanmoins aucun autre renseignement sur ce test n'a pu être obtenu à ce jour.

b) Des tests directs rapides

- La PCR

Pour mettre en évidence le bacille dans un lavage bronchoaléolaire l'animal doit être bacillifère, c.à.d. avoir un statut excréteur.

Chez l'Homme, l'excrétion du bacille est accompagnée de symptômes d'insuffisance respiratoire et/ou de lésions visibles par imagerie. Par ailleurs, étant donné que l'excrétion est intermittente, les prélèvements pour analyse sont faits sur 3 jours consécutifs pour avoir plus de chances de détecter le bacille. Pour le diagnostic antemortem de la tuberculose, la PCR peut également être réalisée sur des biopsies quand celles-ci sont praticables.

Le test PCR suggéré par le Zooparc de Beauval est celui proposé par l'Université Mahidol (Bangkok). Il s'agit d'un système utilisant une méthode d'extraction largement utilisée en santé publique, sur la base d'un kit commercial de Qiagen, le DNeasy® Blood & Tissue kit, suivi d'un système de détection par PCR, basée sur des publications anciennes d'une équipe colombienne (Rodriguez *et al.*, 1995; del Portillo *et al.* 1996). D'une part, la méthode d'extraction n'est pas tout à fait adaptée à la détection de mycobactéries, qui nécessite une étape supplémentaire de lyse mécanique par rapport à celle proposée par le protocole ; d'autre part, la détection PCR se base sur une méthode conventionnelle qui a été évaluée au LNR il y a vingt ans et qui s'avère d'une sensibilité moindre, en comparaison avec des méthodes de détection de PCR en temps réel, qui doivent être privilégiées aujourd'hui pour les diagnostics moléculaires.

c) D'autres tests

- Imagerie

En comparaison à d'autres espèces, les PNH développent rarement des lésions calcifiées. Ainsi, des radios de poumon peuvent être difficiles à interpréter et doivent idéalement être analysées par des radiologistes ou des pneumologues en médecine humaine pour une interprétation idoine. Il n'y a pas de lésions pathognomoniques, mais une hypertrophie des nœuds lymphatiques pulmonaires peut être un signe précoce, bien que non spécifique, d'une mycobactériose pulmonaire. Des tubercules plus grands ou d'autres cavitations peuvent être identifiés par radiographie pulmonaire. Des radiographies abdominales peuvent aider à identifier une splénomégalie ou une lympho-adénopathie mésentérique tuberculeuse. La tomographie (computed tomography) peut donner des détails d'imagerie en temps réel de la progression de la maladie et révéler la présence de petits granulomes mal identifiés avec des rayons X. Des analyses d'imagerie par laparoscopie peuvent également apporter une certaine utilité pour la reconnaissance de cas cliniques (Bushmitz *et al.* 2009).

En définitive, du fait qu'elles ne détectent que des cas cliniques avancés, les analyses d'imagerie sont à utiliser seulement en complément d'autres techniques de diagnostic

• Le protocole proposé par le Zooparc de Beauval

Une combinaison de tests est proposée par le Zooparc de Beauval pour le transfert des langurs. Dans le but d'augmenter la sensibilité de la détection, il est envisagé de faire appel à différents principes techniques, basés sur :

- une détection de la réponse immunologique (réponse immunologique cellulaire par IDT *versus* réponse immunologique humorale par sérologie) ;
- une détection du statut infectieux (excrétion détectée par PCR) ;
- une détection clinique (imagerie).

• Analyse du protocole et recommandations

- Pour la sérologie :

Aucune précision n'a pu être apportée sur le test sérologique prévu dans le protocole. Les experts ne peuvent donc pas se prononcer sur l'adéquation du test au contexte de son utilisation. Comme vu précédemment et selon l'expérience acquise au LNR, aussi

bien chez des macaques que pour d'autres espèces animales (à l'exception des suidés), les tests sérologiques en tuberculose sont en règle générale très peu sensibles et ne présentent pas d'intérêt dans des périodes non anamnestiques. Si le test proposé s'avérait être le MFIA, qui semble être le test le plus largement utilisé à l'heure actuelle pour le dépistage des macaques dans des élevages et des centres d'expérimentation, il faudrait réaliser les prises de sang pendant la période anamnestique, c'est à dire 10-15 jours après une IDT.

- Pour la PCR :

Du fait du manque de sensibilité de la méthode de détection moléculaire proposée mais également du manque d'utilité de pratiquer ce type de dépistage sur des animaux ne présentant pas de signes cliniques ni d'excrétion, les experts estiment que ce test ne présente pas d'intérêt et ne permettra pas d'augmenter la sensibilité du dépistage sur ces animaux.

Le seul intérêt serait son utilisation dans le cas d'un résultat non négatif à un test indirect ou suite à la mise en évidence d'un résultat par imagerie suspect, mais il s'agirait alors d'une démarche diagnostique, qui relèverait uniquement du suivi sanitaire des animaux demeurant dans le parc zoologique en Thaïlande. En effet, ces animaux présentant un résultat non négatif à un test indirect seraient d'office écartés du transfert, comme le précise l'arrêté du 19 juillet 2002 précité (Annexe 4)

- Pour l'intradermotuberculation

Ne pouvant écarter le fait que la tuberculose puisse circuler chez les employés du parc zoologique Khao Kheow Open Zoo, dans un pays très touché par cette maladie, les experts recommandent que les tuberculinations ne soient effectuées qu'avec les tuberculines mOT ou Bovituber (PPD B), les deux produits étant commercialisés par Zoetis. Les deux tests doivent être espacés d'au moins 30 jours pour éviter tout effet de désensibilisation. L'interprétation doit suivre strictement les guides d'interprétation (tableau 1).

Tableau 1 : grille de notation utilisée dans les différentes normes (Lecu et al, 2008):

0	Pas de réaction
1	Hématome, extravasation sanguine sur la paupière associée à l'injection de la tuberculine
2	Degrés variés d'érythèmes palpébraux
3	Inflammation modérée avec ou sans érythème
4	Inflammation palpébrale évidente avec tombée de la paupière, avec ou sans érythème
5	Nécrose de la paupière, avec inflammation variée, incluant paupière partiellement ou complètement close
Interprétation : 0-2 : négatifs en screening ; 3-5 : positifs	

Lors du dépistage d'animaux dans le cadre d'un foyer de tuberculose dû à *Mycobacterium bovis* chez des macaques cynomolgus aux Etats Unis, Panarella et Bimes (2010) ont démontré que la palpation de paupières sur des animaux sous sédation à la lecture pouvait augmenter la sensibilité de 33% sur des animaux infectés, notamment sur ceux qui présentent des stades 1 lors de l'interprétation uniquement visuelle (Panarella et Hampshire, 2016). Une observation visuelle ne suffit donc pas pour détecter tous les animaux infectés. La palpation est un excellent moyen d'augmenter la sensibilité de détection d'animaux réagissant. Les experts recommandent qu'une palpation soit également effectuée pour détecter toute réaction non négative à l'IDT.

Enfin, l'examen clinique complet et l'imagerie pourront compléter le dépistage par IDT pour écarter tout signe évocateur de tuberculose.

La recommandation des experts est qu'aucun animal ayant présenté des résultats non négatifs à l'un des trois tests : IDT pratiquée comme indiqué ci-dessus / examen clinique / imagerie, ne soit transféré vers la France.

Si d'autres animaux de la même colonie du parc thaïlandais Khao Kheow Open Zoo que les précédents, présentant un résultat négatif, étaient envisagés pour le transfert, il serait nécessaire de vérifier qu'ils n'ont pas contracté l'infection et donc qu'ils ne deviennent pas positifs ultérieurement, une fois transférés. Si la moindre réaction était observée sur un des cinq animaux ainsi candidats au transfert, il faudra en France réaliser un test complémentaire sur les animaux qui ont pu être introduits, initialement négatifs, et ce au moins en respectant 30 jours après la dernière IDT, si le test réalisé est un nouveau test IDT. Un test de dosage d'interféron gamma pourra également être pratiqué en France où il y existe des laboratoires vétérinaires départementaux agréés. Ce test complémentaire à l'IDT est basé également sur la réponse immune cellulaire (voir rapport de saisine n°2019-SA-0035). Un test commercial, le Primagam est actuellement disponible. Ce test est réalisé par des laboratoires vétérinaires départementaux agréés en France. Au contraire de l'IDT pour lequel il faut respecter au moins 30 jours entre un test et l'autre, le dosage d'IFNg peut être effectué à tout moment indépendamment de tests effectués au préalable. L'optimal serait d'attendre au moins 15 jours après le dernier test IDT ayant été pratiqué sur les animaux, afin de détecter des infections récentes non mesurables par la précédente IDT.

3.3. Conclusion

L'Anses a procédé à l'examen du protocole de dépistage préalable à l'importation de cinq primates (Langurs de Douc) depuis la Thaïlande, proposé par le Zooparc de Beauval, dans le cadre d'un programme de sauvegarde et d'une demande de dérogation aux dispositions de l'arrêté du 19 juillet 2002, définissant les conditions sanitaires requises pour les primates importés à destination des établissements de présentation au public.

L'examen du protocole a porté uniquement sur le dépistage du chikungunya (interprétation du libellé de l'arrêté « maladies du type Kungunya »), les autres fièvres hémorragiques simiennes ne circulant pas en Thaïlande, ce que le certificat sanitaire a vocation à attester, et sur le dépistage de la tuberculose.

Compte tenu des éléments apportés par la DGAL et par l'audition du vétérinaire responsable du Zooparc de Beauval, et considérant les éléments scientifiques disponibles sur les tests de dépistage pouvant être pratiqués sur des primates non humains, l'Anses conclut :

- **Pour le chikungunya** : que la quarantaine est l'étape la plus importante pour garantir que les animaux importés ne sont pas infectés et, surtout, qu'ils ne représentent pas un risque sanitaire en arrivant en phase virémique. Celle-ci doit être réalisée en excluant tout contact avec des moustiques.
 - La sérologie en début de quarantaine, si elle est positive, permettra d'être plus serein, notamment si les conditions de quarantaine ne permettent pas de garantir une absence totale de contact entre les animaux et les moustiques.
 - Si au moins une sérologie est négative, afin d'anticiper et de maîtriser au maximum le risque d'importation d'animaux virémiques (par exemple, problème pendant la quarantaine et animaux ainsi infectés), l'Anses recommande de placer les animaux à leur arrivée au Zooparc de Beauval dans un enclos intérieur fermé pendant 3 semaines, en mettant en place des mesures anti-moustiques dans cet enclos.
- **Pour la tuberculose** : que l'intradermotuberculation doit être réalisée uniquement avec les tuberculines mOT ou Bovituber (PPD B). Les deux tests doivent être espacés d'au moins 30

jours pour éviter tout effet de désensibilisation. L'interprétation doit suivre strictement les guides d'interprétation repris dans le tableau 1 du présent Avis.

L'examen clinique complet et l'imagerie pourront compléter le dépistage par IDT pour écarter tout signe évocateur de tuberculose. Aucun animal ayant présenté des résultats non négatifs à l'un des trois tests : IDT pratiquée comme indiqué ci-avant / examen clinique / imagerie, ne doit être transféré vers la France. Il convient également de prévoir un contrôle supplémentaire en France en cas de transfert de singes négatifs qui proviendraient de la même colonie du parc thaïlandais Khao Kheow Open Zoo que ceux ayant un résultat non négatif, restés sur place.

Le test PCR ne présente pas d'intérêt et ne permettra pas d'augmenter la sensibilité du dépistage sur ces animaux.

L'absence de précision sur le test sérologique envisagé ne permet pas de se prononcer sur son adéquation au contexte de son utilisation. En tout état de cause, les tests sérologiques en tuberculose, chez de nombreuses espèces animales, sont très peu sensibles et ne présentent pas d'intérêt dans des périodes non anamnestiques (i.e. en dehors de la fenêtre de 10-15 jours après une IDT).

Par ailleurs, s'agissant de l'arrêté du 19 juillet 2002 fixant les conditions sanitaires pour l'importation et le transit, sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outre-mer, des animaux vivants et de certains de leurs produits, l'Anses recommande au Ministère de l'Agriculture de procéder à la correction concernant la désignation dans l'annexe 4 du virus « Kungunya ». Cette désignation probablement erronée soulève des incertitudes (cf. avis Afssa de 2002 et 2011) et génère des difficultés de mise en œuvre, comme cela a été le cas pour l'enclenchement de la présente saisine.

Dr Roger Genet

MOTS-CLES

Primate non humain, parc zoologique, tuberculose, Chikungunya, dépistage

Non-human primate, zoo garden, tuberculosis, Chikungunya, detection

BIBLIOGRAPHIE

Bushmitz M, Lecu A, Verreck F, Preussing E, Rensing S, Mätz-Rensing K; EPV-Tuberculosis Working Group on Non-human Primate Health. Guidelines for the prevention and control of tuberculosis in non-human primates: recommendations of the European Primate Veterinary Association Working Group on Tuberculosis. *J Med Primatol.* 2009 Feb;38(1):59-69. doi: 10.1111/j.1600-0684.2008.00303.x. Epub 2008 Aug 18. PubMed PMID: 18715268.

Casal C, Díez-Guerrier A, Álvarez J, Rodríguez-Campos S, Mateos A, Linscott R, Martel E, Lawrence JC, Whelan C, Clarke J, O'Brien A, Domínguez L, Aranaz A. Strategic use of serology for the diagnosis of bovine tuberculosis after intradermal skin testing. *Vet Microbiol.* 2014 Jun 4;170(3-4):342-51. doi:10.1016/j.vetmic.2014.02.036. Epub 2014 Mar 2. PubMed PMID: 24679958.

Chansaenroj J. et al., Genome sequences of chikungunya virus isolates from an outbreak in southwest Bangkok in 2018 *Archives of Virology* (2020) 165:445–450

Del Portillo P, Thomas MC, Martínez E, Marañón C, Valladares B, Patarroyo ME, Carlos López M. Multiprimer PCR system for differential identification of mycobacteria in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 1996 Feb;34(2):324-8. PubMed PMID: 8789008; PubMed Central PMCID: PMC228790.

Franke F., Giron S., Cochet A., Jeannin C., Leparc-Goffart I., de Valk H., Grard G., Galla M., Jourdain F., Chaud P., L'Ambert G., Ferré J.B., de Lamballerie X., Paty M.C. (2019) Émergences de dengue et de chikungunya en France métropolitaine 2010-2018 ; *Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire* 2019(19-20):374-82

Horwood P.F. & Buchy P. Chikungunya, *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* (2015) 34 (2), 479-489

Jurczynski K, Lyashchenko KP, Gomis D, Moser I, Greenwald R, Moisson P. Pinniped tuberculosis in Malayan tapirs (*Tapirus indicus*) and its transmission to other terrestrial mammals. *J Zoo Wildl Med.* 2011 Jun;42(2):222-7. PubMed PMID: 22946398.

Kanaujia GV, Garcia MA, Bouley DM, Peters R, Gennaro ML. Detection of early secretory antigenic target-6 antibody for diagnosis of tuberculosis in non-human primates. *Comp Med.* 2003 Dec;53(6):602-6. PubMed PMID: 14727807.

Kanaujia GV, Motzel S, Garcia MA, Andersen P, Gennaro ML. Recognition of ESAT-6 sequences by antibodies in sera of tuberculous nonhuman primates. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004 Jan;11(1):222-6. PubMed PMID: 14715573; PubMed Central PMCID: PMC321353.

Lecu A, Knauf S, Mätz-Rensing K, Franz-Josef Kaup FJ. Tuberculosis in Nonhuman Primates, - an Overview of Diagnostic Tools. 2008.

https://www.dpz.eu/fileadmin/content/Infektionspathologie/Bilder/Dokumente/LECU%20TuberculosisFORMAT%20COP_Korr.pdf

Lerche NW, Yee JL, Capuano SV, Flynn JL. New approaches to tuberculosis surveillance in nonhuman primates. *ILAR J.* 2008;49(2):170-8. PubMed PMID:18323579.

Lyashchenko KP, Greenwald R, Esfandiari J, Greenwald D, Nacy CA, Gibson S, Didier PJ, Washington M, Szczerba P, Motzel S, Handt L, Pollock JM, McNair J, Andersen P, Langermans JA, Verreck F, Ervin S, Ervin F, McCombs C. PrimaTB STAT-PAK assay, a novel, rapid lateral-flow test for tuberculosis in nonhuman primates. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Sep;14(9):1158-64. Epub 2007 Jul 25. PubMed PMID: 17652522; PubMed Central PMCID: PMC2043323.

Moser I, Prodinge WM, Hotzel H, Greenwald R, Lyashchenko KP, Bakker D, Gomis D, Seidler T, Ellenberger C, Hetzel U, Wuennemann K, Moisson P. *Mycobacterium pinnipedii*: transmission from South American sea lion (*Otaria byronia*) to Bactrian camel (*Camelus bactrianus bactrianus*) and Malayan tapirs (*Tapirus indicus*). *Vet Microbiol.* 2008 Mar 18;127(3-4):399-406. Epub 2007 Aug 26. PubMed PMID: 17913401.

Murakami PS, Monego F, Ho JL, Gibson A, Javorouski ML, Bonat M, Lacerda O, Brockelt SR, Biesdorf SM, Nakatani SM, Riediger IN, Fuverki RB, Biava JS, Vieira RF, do Santos AP, de Barros Filho IR, Biondo AW. Detection of RD(Rio) strain of *Mycobacterium tuberculosis* in tapirs (*Tapirus terrestris*) from a zoo in Brazil. *J Zoo Wildl Med.* 2012 Dec;43(4):872-5. PubMed PMID: 23272356.

Panarella ML, Bimes RS. A naturally occurring outbreak of tuberculosis in a group of imported cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Am Assoc Lab AnimSci.* 2010 Mar;49(2):221-5. PubMed PMID: 20353699; PubMed Central PMCID:PMC2846012.

Panarella M, Hampshire V. The tuberculin skin test in monkeys. *Lab Anim (NY).* 2016 Aug 23;45(9):331-2. doi: 10.1038/labani.1086. PubMed PMID: 27551802.

Ravindran R, Krishnan VV, Dhawan R, Wunderlich ML, Lerche NW, Flynn JL, Luciw PA, Khan IH. Plasma antibody profiles in non-human primate tuberculosis. *J Med Primatol.* 2014 Apr;43(2):59-71. doi: 10.1111/jmp.12097. Epub 2014 Jan 22. PubMed PMID: 24446897.

Rodriguez JG, Mejia GA, Del Portillo P, Patarroyo ME, Murillo LA. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiology.* 1995 Sep;141 (Pt 9):2131-8. PubMed PMID: 7496524.

Valentine et al., Sylvatic cycles of arboviruses in non-human primates *Parasites Vectors* (2019) 12:463

Sites internet:

<https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/chikungunya>

<https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-a-transmission-vectorielle/chikungunya>

<https://siamactu.fr/les-cas-de-chikungunya-ont-triple-en-thailande-au-cours-de-l-annee-2019/>

<https://solidarites-sante.gouv.fr/sante-et-environnement/risques-microbiologiques-physiques-et-chimiques/especes-nuisibles-et-parasites/article/cartes-de-presence-du-moustique-tigre-aedes-albopictus-en-france-metropolitaine>

ANNEXE 1

Présentation des intervenants

PRÉAMBULE : Les experts membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

PARTICIPATION ANSES

Rapporteurs

Mme Maria-Laura BOSCHIROLI, Responsable LNR Tuberculose, Anses, Laboratoire de Santé Animale de Maisons-Alfort-Dozulé

M. Philippe MARIANNEAU, Chef d'Unité Virologie, Anses, Laboratoire de Lyon.

Coordination scientifique

Mme Charlotte DUNOYER - Anses, Direction de l'Evaluation des Risques, UERSABA.

Secrétariat administratif

M. Régis MOLINET – Anses

AUDITION DE PERSONNALITÉS EXTÉRIEURES

Zooparc de Beauval

Dr Baptiste MULOT, Vétérinaire responsable

ANNEXE 2 : SAISINE



MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION

**Direction générale de l'alimentation
Service de la gouvernance et de l'international dans
les domaines sanitaire et alimentaire
Sous-direction des affaires sanitaires européennes et
internationales
Service d'inspection vétérinaire et phytosanitaire
aux frontières (SIVEP)**

Dossier suivi par : Pascale Vignal-Gautron
Tél : 01 49 55 74 30
Réf. Interne : 190386
mail : sivep.sdasei.dgal@agriculture.gouv.fr

Le Directeur Général de l'Alimentation

à

Monsieur le Directeur Général de l'Agence
nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,
de l'environnement et du travail

27-31, avenue du Général Leclerc – B.P. 19
94701 MAISONS ALFORT CEDEX

Objet : saisine relative à la demande du ZooParc de Beauval concernant une demande de dérogation pour l'importation de primates, dans le cadre d'un programme de sauvegarde, ne répondant pas aux dispositions de l'arrêté du 19 juillet 2002¹ définissant les conditions sanitaires requises pour les primates importés à destination des établissements de présentation au public.

P.-J. Annexes : Arrêté du 19 juillet 2002 et Courrier du ZooParc de Beauval

Conformément à l'article L. 261-2 du code rural et de la pêche maritime, j'ai l'honneur de solliciter l'avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail concernant une demande de dérogation, transmise par le ZooParc de Beauval, pour l'importation de cinq primates (*Pygathrix nemaus*), espèce en danger, figurant en annexe I A de la convention de Washington et ne répondant pas aux dispositions sanitaires requises pour l'importation de ces animaux sur le territoire français.

En effet, les conditions sanitaires d'importation de primates ne sont pas harmonisées au niveau européen et chaque État membre dispose de ses propres règles en la matière.

En ce qui concerne la France, c'est l'arrêté du 19 juillet 2002 et son annexe 4 qui régissent les conditions d'importation des primates à destination, notamment, des établissements de présentation au public.

L'établissement zoologique de départ, Khao Kheow Open Zoo est situé en Thaïlande, pays tiers autorisé au titre de l'arrêté du 19 juillet 2002, à exporter des primates vers la France, cependant, le parc ne peut attester du respect de l'intégralité des conditions requises au point 3. a) et des conditions requises au point 3. d) du certificat sanitaire attendu :

- Le point 3 a) du certificat sanitaire impose que les animaux soient originaires et proviennent d'un pays tiers dans lequel aucun cas de fièvres hémorragiques simiennes (fièvre de Crimée-Congo, fièvre jaune, fièvre de Mayaro, maladies à virus Ebola, maladie de Marburg, maladie à virus Kungunya) n'a été constaté au cours des deux dernières années.

La Thaïlande n'est pas indemne de maladies à virus de type Kungunya mais cependant, la zone d'origine et l'établissement de provenance ne sont pas touchés par le virus.

- le point 3 d) du certificat sanitaire impose que les animaux soient originaires et proviennent d'un établissement dans lequel aucun cas de tuberculose et de rage n'a été constaté au cours des deux dernières années.

Le parc n'est pas indemne de tuberculose, mais aucun cas n'a été enregistré sur des primates.

Aussi, le ZooParc de Beauval, agréé au titre de l'annexe C de la directive 92/65/CEE², propose de mettre en place un protocole de substitution à l'attestation de ces garanties, afin de pouvoir importer les animaux.

¹ Arrêté du 19 juillet 2002 fixant les conditions sanitaires pour l'importation et le transit, sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outre-mer, des animaux vivants et de certains de leurs produits visés à l'article L. 236-1 du code rural

² Directive du Conseil du 13 juillet 1992 définissant les conditions de police sanitaire régissant les échanges et les importations dans la Communauté d'animaux, de spermatozoïdes, d'ovules et d'embryons non soumis, en ce qui concerne les conditions de police sanitaire, aux réglementations communautaires spécifiques visées à l'annexe A section I de la directive 90/425/CEE

En ce qui concerne la prévention des maladies de type Kungunya (point 3a) du certificat sanitaire :

le ZooParc de Beauval propose de faire porter la certification relative aux maladies de ce type sur l'établissement et non sur le pays tiers dans sa globalité et d'associer le dispositif suivant :

- tester les individus à l'entrée en quarantaine dans l'institution d'origine, par un test ELISA, auprès d'un laboratoire officiel,
- tester les individus en quarantaine dans l'institution d'origine, dix jours avant leur exportation, par PCR réalisée dans un laboratoire officiel,
- pratiquer une surveillance dans le lieu de quarantaine, afin de mettre en avant tout signe clinique de maladies qui serait susceptible d'apparaître, (dispositif requis par le certificat sanitaire)
- protéger les animaux du vecteur,
- protéger les caisses de transport des animaux contre le vecteur,
- transférer les animaux, sans rupture de charge, du poste de contrôle frontalier de Roissy jusqu'au ZooParc de Beauval,
- transférer les individus, à leur arrivée, dans un enclos neuf, dans lequel aucun animal n'aura préalablement séjourné.

En ce qui concerne la prévention de la tuberculose (point 3d) du certificat sanitaire :

le ZooParc de Beauval propose de faire porter la certification sanitaire sur l'absence de cas de tuberculose enregistré sur des primates au cours des deux dernières années et d'associer le dispositif suivant :

- soumettre les animaux en début et en fin de quarantaine à deux épreuves de dépistage contre la tuberculose, (dispositif requis par le certificat sanitaire),
- tester les animaux, en complément, pour la tuberculose, à l'entrée de la quarantaine, par test ELISA, radiographie thoracique et lavage broncho-alvéolaire pour PCR,
- transférer les animaux directement, sans rupture de charge, du poste de contrôle frontalier de Roissy au ZooParc de Beauval
- transférer les individus dans l'enclos neuf.

Je souhaiterais donc recueillir l'avis de l'ANSES sur :

1. les protocoles et tests proposés, afin de s'assurer qu'ils apportent les garanties sanitaires requises quant à l'absence de possibilité de contamination humaine et animale, au regard de la dérogation sollicitée,
2. la mise en œuvre éventuelle de protocoles de dépistage et de quarantaine complémentaires, susceptibles d'apporter des garanties supplémentaires pour la réalisation d'un tel mouvement,
3. ou les risques sanitaires identifiés qui ne permettraient pas de procéder à une telle importation.

Je vous remercie par avance de bien vouloir apporter une réponse à ces questions pour 20 janvier 2019.

Le Directeur Général de l'Alimentation
Bruno FERREIRA

Destinataires pour la réponse mail :

Destinataires DGAL :

- boîte institutionnelle du bureau métier : sivep.sdasei.dgal@agriculture.gouv.fr
- responsable du dossier : pascal.vignal-gautron@agriculture.gouv.fr
- boîte institutionnelle : saisines-anses.dgal@agriculture.gouv.fr

copie à : Maria-laura.BOSCHIROLI@anses.fr



A Saint-Aignan,
Le 6 Novembre 2019

Dr Baptiste Mulot
Responsable Vétérinaire
ZooParc de Beauval
41110 Saint-Aignan
baptiste.mulot@zoobeauval.com
Tel. : 0607475663

Objet : Demande de dérogation pour l'entrée sur le territoire français de cinq (5) langurs de Douc (*Pygathrix nemoeus*) depuis la Thaïlande.

Madame, Monsieur,

Le ZooParc de Beauval (41110 Saint-Aignan, France / Agrément BALAI FRA2041198001) souhaite importer de Khao Kheow Open Zoo, 235 Moo7 Bang Phra, Si Racha District, Chon Buri 21110, Thaïlande, dans le cadre d'un programme d'élevage, 5 langurs de Douc (*Pygathrix nemoeus*).

- Mâle – 900012000575895 – né le 26/12/2014 au Dusit Zoological Park, Bangkok
- Femelle – 900012000609372 – née le 22/06/2008 au Dusit Zoological Park, Bangkok
- Femelle – 933076400522697 – née le 24/12/2015 au Dusit Zoological Park, Bangkok
- Femelle – 900012000571881 – née le 18/05/2009 au Dusit Zoological Park, Bangkok
- Femelle – 900079000050898 – née le 09/05/2015 au Dusit Zoological Park, Bangkok

En effet, cette espèce est classée **En danger** par l'IUCN et en **annexe IA** de la convention CITES.

A ce jour, seulement 119 individus sont hébergés dans 12 institutions à travers le monde (dont 10 en Asie du Sud-est) et participent donc à la conservation *ex-situ*.

En Europe, deux parcs (Zoo de Chelby en République Tchèque et Zoo de Cologne en Allemagne) présentent cette espèce (5 et 1 individus respectivement), il est donc essentiel pour le futur de cette espèce que plus de parcs européens participent au programme international d'élevage.

Les parcs zoologiques de Khao Kheow Open Zoo et Dusit Zoological Park appartiennent à la Zoological Park Organization, institution gouvernementale thaïlandaise gérant les 6 parcs zoologiques publics du pays.

C'est dans cet objectif qu'un Memorandum of Understanding a été signé en 2018 entre le gouvernement thaïlandais et le ZooParc de Beauval, pour coopérer dans la conservation de cette espèce.

Malheureusement les autorités sanitaires du lieu de départ ne peuvent pas répondre aux points 3a et 3d de l'annexe 4 de l'arrêté du 19 juillet 2002 :

- o **Concernant le point 3a**, la Thaïlande n'est pas indemne de maladie à virus Kungunya. Par contre le virus ne sévit pas sur l'ensemble du pays et la zone d'origine des animaux n'est pas une zone touchée.

Nous vous proposons de :

- modifier la clause « sont originaires et proviennent d'un pays tiers dans lequel aucun cas de fièvres hémorragiques simiennes (fièvre de Crimée-Congo, fièvre jaune, fièvre de Mayaro, maladies à virus Ebola, maladie de Marburg, maladie à virus Kungunya) n'a été constaté au cours des deux dernières années. » par « sont originaires et proviennent d'un pays tiers dans lequel aucun cas de fièvres hémorragiques simiennes (fièvre de Crimée-Congo, fièvre jaune, fièvre de Mayaro, maladies à virus Ebola, maladie de Marburg) n'a été constaté au cours des deux dernières années et d'une institution dans laquelle aucun cas de maladie à virus Kungunya n'a été constaté au cours des deux dernières années. »



- tester les individus à l'entrée en quarantaine dans l'institution d'origine par ELISA dans un laboratoire officiel,
 - tester les individus en quarantaine dans l'institution d'origine 10 jours avant leur exportation par PCR dans un laboratoire officiel,
 - surveiller en quarantaine (comme déjà indiqué dans le certificat sanitaire) tout signe clinique,
 - protéger pendant la quarantaine les animaux contre le vecteur,
 - protéger les caisses de transport des animaux contre le vecteur,
 - transférer les primates directement sans interruption du point de contrôle à Roissy au ZooParc de Beauval,
 - A leur arrivée, ces individus iront dans un enclos neuf, dans lequel ils seront les premiers animaux.
- o **Concernant le point 3d**, l'institution n'est pas indemne de tuberculose. L'institution n'a cependant jamais eu de cas de tuberculose sur primates.
- Nous vous proposons de :
- modifier la clause « sont originaires et proviennent d'un établissement dans lequel aucun cas de tuberculose et de rage n'a été constaté au cours des deux dernières années. » par « sont originaires et proviennent d'un établissement dans lequel aucun cas de rage n'a été constaté au cours des deux dernières années et dans lequel aucun cas de tuberculose sur primates n'a été constaté au cours des deux dernières années. »
 - soumettre les animaux en début et en fin de quarantaine (comme déjà indiqué dans le certificat sanitaire) à deux épreuves de dépistage contre la tuberculose
 - tester pour la tuberculose, en plus, à l'entrée en quarantaine, les animaux par ELISA, radiographie thoracique et lavage broncho-alvéolaire pour PCR,
 - transférer les primates directement sans interruption du point de contrôle à Roissy au ZooParc de Beauval,
 - A leur arrivée, ces individus iront dans un enclos neuf, dans lequel ils seront les premiers animaux.

A la lumière des éléments décrits ci-dessus, j'ai donc l'honneur de solliciter auprès de votre administration l'obtention d'une dérogation sanitaire dans le cadre de l'importation de ces langurs de Douc depuis le Khao Kheow Open Zoo, Thaïlande.

Je me tiens à votre disposition pour toute question et vous remercie par avance de votre retour.
Cordialement,

Dr Baptiste Mulot
Responsable vétérinaire et vétérinaire sanitaire
ZooParc de Beauval, France


Docteur Baptiste MULOT
VÉTÉRINAIRE
ZOO PARC DE BEAUVAL
41 40 SAINT AIGNAN
Tél. 02 54 75 74 24 - Fax 02 54 75 74 30