

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 7 mars 2013

## **AVIS**

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

relatif à « une suspicion de tuberculose chez deux éléphants en captivité ».

---

*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 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 rendus publics.*

---

L'Anses a été saisie le 18 février 2013 par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) pour la réalisation de l'expertise suivante : saisine relative à une suspicion de tuberculose chez deux éléphants en captivité.

#### **1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE**

La situation sanitaire des deux éléphants Baby et Népal, détenues dans le Parc municipal de la Tête d'Or à Lyon et suspectes de tuberculose fait aujourd'hui l'objet de débats. Ces éléphants, confiées en 1999 au parc par leur actuel propriétaire, le cirque Pinder, ont été détenues avec une autre éléphant, Java, déjà présente dans le Parc et morte en août 2012.

Au cours de l'autopsie de Java, des prélèvements effectués sur poumons lésionnels et sur un nœud lymphatique trachéobronchique ont permis d'isoler et de cultiver *Mycobacterium tuberculosis*, agent de la tuberculose. Cette bactérie est surtout trouvée chez l'homme mais peut être transmise de l'homme à l'animal ou entre les animaux.

Les éléphants Baby et Népal avaient été testées pour la tuberculose par un dépistage sérologique, deux ans avant la mort de l'éléphant Java. En juillet 2010, l'éléphant Baby avait réagi positivement à deux tests sur trois et Népal avait réagi positivement à un test sur trois. Lors du re-contrôle en septembre 2010, Baby avait réagi à un test sur trois et Népal était négative pour les trois mêmes tests. Aucun examen de dépistage de la tuberculose n'a été entrepris depuis septembre 2010.

Selon les termes de la saisine, les deux éléphants Baby et Népal sont ainsi, « *d'un point de vue médical, fortement suspectes de tuberculose et réglementairement contaminées* ».

En France, il n'existe cependant pas de prescription réglementaire spécifique concernant la police sanitaire de la tuberculose chez les éléphants.

---

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail,  
27-31 av. du Général Leclerc, 94701 Maisons-Alfort Cedex - Téléphone : + 33 (0)1 49 77  
13 50 - Télécopie : + 33 (0)1 49 77 26 26 - [www.anses.fr](http://www.anses.fr)

Ces animaux ne répondant pas aux exigences sanitaires pour une présentation au public, le Parc de la Tête d'Or est tenu de les maintenir en confinement. Depuis fin 2010, la détention de ces animaux n'est souhaitée ni par le Parc de la Tête d'Or, ni par le Cirque Pinder.

En décembre 2012, la préfecture du Rhône a ordonné leur euthanasie suite à la confirmation de la maladie chez l'éléphante Java. Selon les termes de la saisine, « *La mobilisation des associations de protection animale et du Cirque Pinder a conduit à une suspension de l'exécution de cette décision et à un recours auprès du tribunal administratif de Lyon puis d'un appel auprès du Conseil d'Etat* ».

Compte tenu de la valeur sociétale évoquée de ces animaux, une alternative à leur euthanasie est envisagée. Le ministère de l'agriculture a élaboré un cahier des charges que devrait respecter toute initiative privée pour le maintien en vie des deux animaux, au travers d'un protocole de conservation approprié. Ce cahier des charges décrit les éléments minimaux à respecter en matière de suivi sanitaire, de protection des soigneurs et de confinement des animaux, sans préjudice des réglementations en vigueur, applicables par ailleurs.

Ainsi que le précise la DGAL dans la saisine, « *Compte tenu du risque avéré d'échec d'un traitement de ces deux éléphantés qui pourrait conduire au développement d'antibiorésistance par un germe auquel l'humain est hautement sensible* », le ministère de l'agriculture écarte la possibilité de mettre en place un tel traitement.

Une ébauche de protocole de suivi, établi par la vétérinaire du cirque Pinder, le docteur Florence Ollivet-Courtois, a été soumis au ministère de l'agriculture par la présidente d'honneur de la fédération mondiale du cirque, Madame Stéphanie de Monaco, et transmis à la direction générale de l'alimentation.

L'agence est sollicitée sur trois points :

1. Le ministère de l'agriculture, s'il écarte la possibilité de mettre en place un traitement curatif, souhaite connaître la position de l'Anses sur cette question.
2. Le cahier des charges élaboré par le ministère de l'agriculture est-il considéré comme adapté à la situation et quelles éventuelles modifications seraient pertinentes ?
3. Quels commentaires peuvent être émis sur le protocole de suivi proposé au ministère de l'agriculture par le Dr Florence Ollivet-Courtois ?

En addition à cette saisine, le 20 février 2013, la DGAI a sollicité l'expertise de l'Anses sur les tests de dépistage de la tuberculose qui pourraient être mis en œuvre sur les éléphantés du Parc de la Tête d'Or.

Le ministère souhaitait en effet savoir quels examens complémentaires devraient préférentiellement être effectués sur ces deux animaux pour documenter davantage leur statut sanitaire et dans quelles conditions ces tests devraient être réalisés.

La DGAI a précisé l'urgence de cette nouvelle requête, souhaitant que les questions ci-dessous soient traitées prioritairement aux précédentes :

1. Est-il recommandé d'entreprendre un diagnostic indirect à partir d'un prélèvement de sang obtenu sous sédation ou sous anesthésie, avec quelles méthodes et dans quel laboratoire ? Dans quels délais les résultats seraient-ils disponibles ?
2. Est-il recommandé d'entreprendre un diagnostic direct à partir d'un liquide de lavage de trompe obtenu sous anesthésie, avec quelles méthodes et dans quel laboratoire ? Dans quels délais les résultats seraient-ils disponibles ?

## 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) ».

L'expertise collective a été réalisée par le groupe d'expertise collective d'urgence « Tuberculose éléphants », multidisciplinaire, regroupant des compétences complémentaires (médecine vétérinaire, faune sauvage captive, santé publique, méthodes d'analyse, tuberculose, analyse de risque).

La saisine a été divisée en plusieurs parties, afin de tenir compte des différentes priorités du demandeur.

Les réponses aux questions relatives aux examens complémentaires ont fait l'objet d'une note intermédiaire adressée au demandeur le 22 février 2013 (annexe 4).

Les questions relatives au cahier des charges, au projet de protocole et au traitement des animaux tuberculeux ont été traitées en un second temps.

Le présent Avis reprend les réponses à l'ensemble des questions.

Trois réunions téléphoniques ont été organisées les 21, 26 février 2013 et 5 mars 2013.

Le Gecu « Tuberculose éléphants » a validé cet Avis par voie télématique le 6 mars 2013.

Les travaux du Gecu se sont basés sur les éléments transmis par la DGAL :

- Arrêté Préfectoral de Déclaration d'Infection
- Résultats d'autopsie de Java
- Rapport d'essai des sérologies
- Rapport d'essai du laboratoire national de référence
- Rapport d'analyse de M. Artois
- Documents transmis par les associations de sauvegarde des éléphants
- Protocole USDA 2012
- Cahier des charges de la DGAI
- Protocole de suivi sanitaire des éléphants proposé par le Dr Ollivet-Courtois

Ainsi que sur la bibliographie figurant à la fin du présent Avis.

## 3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GECU

### 3.1. Les infections à *Mycobacterium tuberculosis* chez les éléphants

Les termes utilisés pour décrire la tuberculose, qui est une maladie d'évolution lente, n'ont pas tous la même signification. Le présent Avis utilise trois termes, dont les significations sont les suivantes :

- Infection tuberculeuse, signifiant la présence du bacille tuberculeux dans l'organisme, de manière générale. Les tests sérologiques mettent en évidence une immunité, témoin d'une infection, mais ne départagent pas les deux situations suivantes :
  - o Infection tuberculeuse latente, signifiant la présence de bacilles ne se multipliant pas dans l'organisme infecté, car contrôlés par le système immunitaire. L'animal est infecté mais n'est ni malade, ni contagieux et il ne présente pas de signes cliniques.
  - o Tuberculose maladie, signifiant la présence de bacilles en multiplication. L'animal infecté est malade (avec ou sans signes cliniques) et, selon l'organe atteint, il peut être excréteur et contagieux.

### 3.1.1. La tuberculose à *M. tuberculosis* chez les éléphants

Sauf information contraire, le terme « éléphant » est utilisé dans le présent Avis pour désigner l'éléphant d'Asie (*Elephas maximus*), espèce pour laquelle les données sont les plus nombreuses. Toute mention à l'éléphant d'Afrique (*Loxodonta africana*) sera précisée. L'essentiel, sinon toutes les données disponibles, sont issues d'éléphants d'Asie captifs.

La tuberculose est une maladie due à une bactérie nommée *Mycobacterium tuberculosis* que l'on divise en plusieurs sous espèces ou variants dont *M. tuberculosis sensu stricto*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*. Lorsque l'on parle généralement de tous ces variants on parle de *M. tuberculosis* complexe ou complexe *M. tuberculosis*. Dans le cas des éléphants Baby et Népal, il s'agit du variant *M. tuberculosis*, principalement isolé chez l'homme mais transmissible de l'homme à l'animal et entre les animaux. La tuberculose à *Mycobacterium tuberculosis*, l'agent principal de la tuberculose humaine, est connue de longue date chez les éléphants : il existe des descriptions vieilles de plus de 2000 ans de lésions évocatrices de tuberculose dans cette espèce (Mikota and Maslow 2011). En revanche, cette maladie n'a été réellement étudiée chez l'éléphant que depuis son « émergence » dans les zoos et parcs zoologiques américains en 1996 (Michalak *et al.* 1998).

Cette maladie est une zoonose : le germe en cause (bacille tuberculeux) peut être commun aux animaux et à l'Homme. Ainsi, les éléphants atteints de tuberculose peuvent dans certains cas infecter l'Homme (Michalak *et al.* 1998; Murphree *et al.* 2011). Toutefois, la particularité de cette maladie est que son réservoir est principalement humain. On estime aujourd'hui qu'environ 2 milliards de personnes sont infectées de manière latente dans le monde (porteurs du bacille) et que 4 à 10% de ces personnes ont, ou développeront un jour, la maladie (Mikota 2008). Généralement, un éléphant se contamine initialement au contact de l'Homme et par la suite, s'il développe une tuberculose maladie, peut à son tour infecter l'Homme, d'autres éléphants, voire d'autres animaux sensibles à la tuberculose (Michalak *et al.* 1998; Lewerin *et al.* 2005; Murphree *et al.* 2011).

Le développement d'une tuberculose à *M. tuberculosis* chez l'éléphant n'est pas aussi bien connu que chez l'Homme. Néanmoins, compte tenu de l'observation de traits communs de la maladie dans les deux espèces, c'est en partie par extrapolation que les étapes principales de l'infection et les différentes évolutions possibles sont présentées comme similaires (Mikota 2008).

- En règle générale, la première étape de l'infection chez les mammifères et indépendamment de l'agent de la tuberculose concernée, est la constitution d'un complexe primaire d'infection (primo-infection) au cours de laquelle les bacilles qui ont pénétré dans l'organisme, généralement dans les poumons (mais parfois également par le système digestif), se développent dans les macrophages qui les ont phagocytés et forment un chancre d'inoculation. Cette lésion locale est associée à une lésion tuberculeuse du nœud lymphatique loco-régional. Chez l'éléphant, des examens post-mortem ont plusieurs fois permis la découverte de cette adénopathie (Delnatte 2008). C'est au cours de cette primo-infection que se mettent en place l'allergie tuberculinique (réaction d'hypersensibilité aux antigènes de *M. tuberculosis*, mise en évidence lors des tests d'intradermo-réaction à la tuberculine) et l'immunité tuberculeuse.
- Cette lésion initiale peut évoluer de plusieurs façons en fonction de différents facteurs de sensibilité de l'hôte et du pouvoir pathogène de la bactérie. Si la réaction immunitaire est efficace, le développement de la lésion primaire sera limité, cette lésion se stabilise (enkystement ou calcification) et le nombre de bacilles est réduit. Les éléphants présentent alors une infection latente, ne sont pas malades et ne sont pas contagieux (Mikota 2008). Par la suite, cette lésion peut évoluer vers la guérison et la disparition complète du bacille ; les réactions d'hypersensibilité et l'immunité antituberculeuse régressent alors progressivement.

On ignore aujourd'hui si la guérison est possible chez l'éléphant et, le cas échéant, dans quelles proportions.

- Cette lésion initiale peut également évoluer dès ce stade vers une généralisation précoce et l'éléphant développe alors une tuberculose maladie.

La lésion initiale peut aussi connaître un réveil infectieux plus tardif, à la faveur de différents mécanismes (baisse d'immunité, stress, nouvelle exposition), après des délais très variables et pouvant être très longs. Lors de ce réveil, les bacilles se multiplient, créant des lésions de proche en proche qui peuvent se cantonner à un organe ou se disséminer. Dans certains cas les lésions confluent et peuvent « s'ouvrir », créant des cavités contenant du bacille en grandes quantités. L'éléphant atteint par ce type de lésion ouverte est alors hautement contagieux.

Si l'on sait que chez l'éléphant, comme chez l'Homme, une première infection à *M. tuberculosis* peut évoluer vers une infection tuberculeuse latente, une tuberculose maladie ou vers la guérison (Mikota 2008), la fréquence de ces différentes situations, ainsi que les mécanismes régissant l'évolution du statut de l'animal sont mal connus. Un éléphant pourrait vivre très longtemps avec une infection tuberculeuse latente sans jamais développer une tuberculose maladie et donc sans jamais devenir contagieux. En revanche, le réveil d'une infection tuberculeuse latente serait toujours possible même plusieurs années après la première infection.

Un éléphant avec une infection tuberculeuse latente ne présente pas de signes cliniques. En revanche, un éléphant atteint de tuberculose maladie peut développer un certain nombre de signes cliniques qui dépendent de l'évolution de la maladie. Les signes cliniques sont variables et souvent peu spécifiques. Chez un éléphant suspect de tuberculose, toute apparition de signe clinique est un signal d'appel. La perte de poids, l'amyotrophie, la perte d'appétit ou l'intolérance à l'exercice sont autant de signes non spécifiques qui ont été signalés chez des éléphants malades de tuberculose (Mikota 2008; Mikota and Maslow 2011). Tous les signes d'atteinte pulmonaire doivent être surveillés (dyspnée, écoulements).

#### **Conclusions sur la tuberculose à *M. tuberculosis* chez les éléphants d'Afrique et d'Asie**

L'éléphant est une espèce sensible à *M. tuberculosis* et peut s'infecter au contact de l'Homme. Par extrapolation avec ce qui est connu chez l'homme, suite à une infection par *M. tuberculosis* et en fonction d'un certain nombre de facteurs, l'éléphant peut développer une infection tuberculeuse latente, sans développement du bacille, au cours de laquelle il n'est ni malade, ni contagieux. En revanche, dès le départ de l'infection ou à la faveur d'un réveil d'une infection latente, l'éléphant peut développer une tuberculose maladie qui se caractérise, soit par une généralisation de la maladie soit par une évolution de proche en proche des lésions, généralement à partir d'un foyer lésionnel respiratoire. L'éléphant atteint d'une tuberculose maladie doit être considéré comme hautement contagieux et peut alors infecter l'Homme, d'autres éléphants, voire d'autres animaux réceptifs à la tuberculose. Une tuberculose maladie peut se manifester par des signes cliniques très divers du fait de la diversité d'organes pouvant être touchés. Ainsi tout signe clinique peut être lié à une tuberculose, surtout les signes respiratoires. Les connaissances actuelles ne permettent pas de savoir quelles proportions d'éléphants infectés par les bacilles tuberculeux développent la maladie, guérissent ou restent infectés latents à vie.

#### **3.1.2. Données d'infections à *M. tuberculosis* chez les éléphants captifs**

L'infection à *M. tuberculosis* a pu être constatée chez les éléphants d'Afrique (*Loxodonta africana*) et d'Asie (*Elephas maximus*) bien que ces derniers soient considérés à la fois plus réceptifs et plus exposés par leurs contacts fréquents avec des humains infectés et réservoirs en Asie (Une and Mori 2007).

La tuberculose étant une maladie chronique d'évolution lente, avec dans un certain nombre de cas la possibilité d'infection latente, il n'est pas possible d'évaluer la probabilité de circulation du pathogène. En outre, les méthodes de recherche directe du bacille par lavage de trompe (*cf. infra*) sont peu sensibles par rapport à tous les cas présentant une culture positive : soit sur lavage de trompe, soit sur autres fluides (urine, écoulements vaginaux,...), soit sur organes lors d'examen post mortem (pas uniquement les poumons). Les estimations de circulation basées sur le nombre d'animaux excréteurs sont généralement en dessous de la réalité.

- C'est aux Etats-Unis que les infections à *M. tuberculosis* chez les éléphants captifs sont les mieux documentées. Il est toutefois difficile de trouver des données de prévalences exactes. Selon Isaza, 1 à 8 éléphants sont diagnostiqués tuberculeux chaque année depuis 1994, (tuberculose maladie avec culture positive suite à lavage de trompe ou sur lésions post-mortem) (Isaza 2012), pour un cheptel d'environ 500 éléphants (en 2011, 246 éléphants d'Asie et 204 éléphants d'Afrique (Mikota and Maslow 2011). Plus de 90% des cas concernent les éléphants d'Asie (46 cas entre 1994 et 2010 contre 3 cas pour les éléphants d'Afrique). Ces indicateurs sont probablement en dessous de la réalité en ce qui concerne le nombre réel d'éléphants infectés par les bacilles tuberculeux, qui comprend les éléphants malades mais également les éléphants atteints d'infection tuberculeuse latente.
- La prise de conscience de l'importance de la maladie aux Etats-Unis a débouché sur la création d'un groupe de travail sur la tuberculose en parc zoologique : le *National Tuberculosis working group for Zoo and Wildlife Species* qui publie depuis 1997 un guide pour le contrôle de la tuberculose chez les éléphants (*Guidelines for the control of tuberculosis in elephants*) (USAHA 2010) (dénommé « Guidelines » dans la suite du présent Avis). La dernière version de ce guide a été publiée en 2010. Une version projet 2012 circule également (USAHA). Ce document est le seul guide publié au monde de surveillance et de gestion de la tuberculose chez les éléphants captifs.
- Des campagnes de dépistage par des tests sérologiques (détection d'éléphants malades ou infectés latents) ont également été entreprises en Asie et donnent respectivement 15% de séropositifs en Inde et plus de 20% au Népal (15% de 387 éléphants d'Asie testés avec le kit Elephant TB STAT PAK® en Inde et plus de 20% des 211 éléphants d'Asie testés avec le même kit au Népal) (Mikota and Maslow 2011).
- En Europe, 5 éléphants ont été trouvés porteurs de lésions tuberculeuses à l'autopsie dans un zoo en Suède. Un éléphant tuberculeux a également été identifié en Pologne (Pavlik *et al.* 2003). En France, un éléphant d'Afrique a été trouvé porteur de tuberculose dans le Parc de Peaugres (Ardèche) en décembre 2004. Cet éléphant partageait d'ailleurs un lien épidémiologique avec le foyer suédois (l'éléphant avait séjourné dans le parc suédois pendant 2 ans). Les 5 éléphants suédois et l'éléphant français ont tous été euthanasiés.

### **Conclusions sur la prévalence de l'infection tuberculeuse chez les éléphants d'Afrique et d'Asie**

Il est difficile d'obtenir des données chiffrées sur la circulation des bacilles tuberculeux chez les éléphants : plusieurs états d'infection tuberculeuse existent (tuberculose maladie, infection tuberculeuse latente), un éléphant développant une tuberculose maladie ne présente pas nécessairement de signes cliniques spécifiques et l'excrétion du bacille par les voies respiratoires est délicate à mettre en évidence. Aux Etats-Unis, entre 1 et 8 nouveaux cas de tuberculose maladie (cultures positives après lavages de trompe ou sur lésions post-mortem) sont diagnostiqués chaque année sur un cheptel d'environ 500 éléphants captifs. Plus de 90% des cas concernent l'éléphant d'Asie. Les études basées sur des tests sérologiques (qui sont susceptibles de dépister à la fois la tuberculose maladie et l'infection latente) donnent des chiffres entre 10 et 20% en Asie (Inde, Népal). Aucune campagne de dépistage n'a été entreprise en Europe jusqu'à présent.

Il est difficile de savoir quelles sont les origines de ces infections chez les éléphants de zoos et parcs : s'il peut être établi qu'un certain nombre d'individus ont été infectés dans leur pays d'origine au moment de leur capture, il demeure vraisemblable que d'autres individus se sont contaminés dans le pays d'accueil, au contact d'autres animaux ou d'humains malades. Par ailleurs, les origines des éléphants de parcs sont diverses, différentes en fonction des pays et pas toujours connues.

Il est difficile de transposer directement la situation Nord-Américaine à la situation française en l'absence d'une enquête épidémiologique et de la connaissance des origines de ces éléphants.

## **3.2. Risques de transmission à l'homme et mesures de précaution**

### **3.2.1. Risques de transmission à l'homme**

Pour que l'Homme soit infecté à partir d'un éléphant, il faut qu'il y ait un aérosol infectieux et que le produit soit inhalable.

Lorsqu'un éléphant présente une tuberculose maladie, il doit être considéré comme contagieux. Au cours d'une tuberculose maladie, l'ensemble des sécrétions de l'individu peut contenir le bacille (salive, expectorations, jetage nasal, fèces, lait, urine et autres). Les principales sources de contagion sont les productions respiratoires puisque le bacille est transmis dans la très grande majorité des cas par les aérosols qui pénètrent directement dans les voies respiratoires. Les autres productions virulentes peuvent également être sources de contagion (Dumonceaux *et al.* 2011; Mikota and Maslow 2011). Le bacille peut résister dans l'environnement et être remis en suspension dans l'air, notamment à la faveur du lavage d'un enclos.

Chez un éléphant malade de tuberculose, les signes cliniques ne sont pas forcément spécifiques de la maladie et parfois difficilement identifiables. Un éléphant peut être excréteur et donc contagieux sans présenter de signes cliniques. Ainsi un éléphant malade peut excréter le bacille pendant longtemps avant qu'il ne soit diagnostiqué.

Plusieurs cas de transmission avérée d'éléphant à humains ont été publiés (Michalak *et al.* 1998; Davis 2001; Une and Mori 2007). Le risque de transmission dans le cas d'éléphants de zoo concerne au premier chef les soigneurs et les vétérinaires mais il est impossible à documenter chez les visiteurs.

Le risque de transmission au personnel est beaucoup plus important au cours de lavage de trompe pour la recherche de *M. tuberculosis* (*cf infra*).

- Une étude épidémiologique, menée en 1996 et 1997 dans un parc Nord-Américain où trois éléphants étaient morts de tuberculose et un éléphant était excréteur, a révélé que 50% (11 sur 22) des soigneurs (toutes tâches confondues) avaient une IDR à la tuberculine (PPD) positive (8 de ces soigneurs ont rapporté des IDR négatives avant l'incident), dont 3 ont converti au cours de l'incident (infection probablement auprès de l'éléphant vivant). Sur ces 22 soigneurs, 12 s'occupaient

des éléphants (contacts proches et répétés) et 10 s'occupaient de tigres dans un bâtiment séparé. Les taux d'IDR positives étaient équivalents dans les deux groupes (50% pour les soigneurs d'éléphants et 56% pour les soigneurs de tigres) avec une probabilité de transmission interhumaine faible puisque seul un soigneur a développé une tuberculose active (visible à la radiologie des poumons) mais sans toux et avec deux recherches de bacilles par expectoration induite négatives (sur trois tests). Cette étude met en évidence une transmission avérée d'éléphant à humain (même génotype entre les éléphants et le soigneur malade et pas de transmission interhumaine envisagée) ainsi qu'un risque de transmission pour les soigneurs, non seulement en contact direct (soigneurs éléphants), mais également partageant le même système de ventilation que les éléphants (salles différentes dans un bâtiment pour les éléphants et les soigneurs d'éléphants et de tigres mais même système de ventilation).

Dans cette même étude était recommandée la mise en place d'un suivi sanitaire de tout soigneur en contact fréquent avec des éléphants (Michalak *et al.* 1998).

- Une autre étude a révélé qu'à partir d'un seul éléphant excréteur, 8 employés sur 13 ayant travaillé dans la zone de quarantaine où se trouvait l'animal avaient présenté des conversions de l'IDR. Au delà de la démonstration du risque potentiel représenté par un animal seul, cette étude montre qu'un contact proche n'était pas nécessaire pour être infecté : parmi les 13 employés, 2 travaillaient à la maintenance de la zone et 3 étaient des administrateurs du parc travaillant dans une salle séparée de la zone mais partageant le même système de ventilation. Dans cette étude, l'aérosolisation de matières virulentes par usage de nettoyeurs haute pression est nommément mise en cause (Murphree *et al.* 2011).

La transmission d'éléphants à éléphants a été avérée dans un certain nombre de cas, notamment en Suède (Lewerin *et al.* 2005) où un à deux individus d'un parc ont contaminé 3 autres éléphants ainsi qu'un rhinocéros (lien épidémiologique démontré par le génotypage des souches).

#### **Conclusions sur le risque de transmission**

Il existe plusieurs cas documentés de transmission du bacille tuberculeux d'un ou plusieurs éléphants malades de tuberculose à plusieurs personnes en contact direct ou indirect.

Le risque de transmission est plus important pour le personnel interagissant directement avec l'animal (soigneurs, vétérinaire) mais la possibilité d'une transmission ne doit pas être écartée pour d'autres personnels du zoo (autres soigneurs et autres fonctions) ainsi que pour le public. Par ailleurs, les systèmes de ventilation peuvent transporter le bacille d'une pièce à une autre. La tuberculose se transmet principalement par voie aérienne et débute généralement dans les poumons de l'hôte. De ce fait, les sécrétions respiratoires sont les principales matières infectieuses contenant le bacille. Cependant, les autres sécrétions peuvent héberger la bactérie qui peut être remise en suspension dans l'air dans certaines conditions. La contagiosité d'un éléphant n'est pas conditionnée par l'apparition de signes cliniques : un éléphant atteint de tuberculose peut être contagieux avant que des signes cliniques ne soient repérables.

#### **3.2.2. Mesures d'isolement de l'animal et de protection des manipulateurs en cas d'infection de l'animal**

Lorsqu'un éléphant est identifié comme présentant un risque de contamination pour le public, les manipulateurs et les autres animaux, cet animal doit être isolé physiquement du public et des autres animaux et un protocole de protection et de suivi des manipulateurs (soigneurs, vétérinaires) doit être mis en place, pour assurer le niveau de biosécurité le plus élevé possible. Les « guidelines » recommandent l'isolement des éléphants qui sont positifs en culture après lavage de trompe ou qui ont été en contact avec un éléphant



excréteur et fournissent des recommandations précises pour la protection des manipulateurs face à des éléphants tuberculeux (USAHA 2010).

- **Suivi sanitaire des personnes exposées**

La surveillance de la tuberculose chez les personnes exposées que sont les manipulateurs repose sur trois éléments : les clichés radiologiques du thorax, les intradermo-réactions (IDR) à 5 unités de tuberculine (test réglementaire) et les signes cliniques. Si dans d'autres pays et notamment aux Etats-Unis le suivi est basé principalement sur l'IDR, la pratique en France du BCG influence les résultats d'IDR, ce qui engendre la nécessité d'utiliser des algorithmes d'interprétation (CSHPPF 2003).

Compte tenu des inconnues qui entourent le risque infectieux représenté par un éléphant tuberculeux, il convient de considérer qu'il représente pour le manipulateur un risque au moins équivalent à celui encouru par un personnel hospitalier régulièrement exposé à des patients tuberculeux humains.

Avant manipulation d'animaux tuberculeux, il conviendrait que le manipulateur subisse un examen clinique préalable permettant la recherche de signes cliniques évocateurs (toux, hémoptysie, altération de l'état général), un cliché radiologique des poumons ainsi qu'une IDR qui servira de référence. Le suivi du manipulateur sera basé sur un cliché annuel des poumons et sur un examen clinique et une IDR tous les ans ou tous les deux ans. Ces recommandations correspondent à celles appliquées au personnel hospitalier évoluant dans un contexte dit de « risque élevé » (CSHPPF 2003). La surveillance biennale chez les personnels soignants est basée sur le délai de progression vers la tuberculose maladie, qui survient dans la majorité des cas dans les deux ans suivant le dernier contact (Sutherland 1968) et qui peut être évitée par le traitement préventif au stade de l'infection latente. L'ensemble de ces éléments doit être encadré par la médecine du travail.

Il est également possible d'utiliser des tests basés sur la détection d'interféron gamma. Ces tests ne sont pas influencés par une vaccination préalable et sont moins contraignants que les tests IDR. En médecine humaine, leur utilisation pour le suivi des personnels de santé n'a cependant pas été recommandé car plusieurs études ont montré leur faible reproductibilité intra-sujet, compliquant leur interprétation (Haut Conseil de la santé publique. Groupe de travail de la Commission spécialisée des maladies transmissibles 2011).

En ce qui concerne les soigneurs ayant été exposés sans protection respiratoire à des éléphants atteints de tuberculose maladie, il serait important que le vétérinaire informé d'un cas de tuberculose (maladie) réalise une notification à l'Agence régionale de santé comme dans le cas d'une tuberculose humaine, de sorte que le Centre de lutte antituberculeuse puisse réaliser une enquête d'entourage (CSHPPF 2006) et mettre en place chez les personnels exposés le suivi habituel des sujets contacts (à savoir la recherche d'une infection latente à traiter préventivement, et le dépistage d'une éventuelle tuberculose secondaire à traiter ainsi précocement)(CSHPPF 2003, 2006).

- **Protection et information des personnes exposées**

La protection des manipulateurs passe par plusieurs étapes :

- L'information du personnel sur le risque encouru, les modes de transmission de la bactérie et les signes cliniques évocateurs de la maladie.
- La limitation du nombre de manipulateurs et de la fréquence des contacts avec les individus infectés.
- Le port d'équipements de protection individuelle pour tout personnel agissant dans le même bâtiment que l'animal tuberculeux (soigneurs et autre personnel) : port d'appareils de protection respiratoire de norme FFP2 correctement ajustés. Le Gecu estime que les appareils de norme FFP1 offrent une protection insuffisante.

Le personnel doit être formé à l'utilisation correcte de ces équipements et les procédures de soin aux animaux devront prendre en compte la pénibilité ajoutée par le port de ces équipements.

- Les mesures d'hygiène élémentaires et de biosécurité visant à empêcher la transmission d'agents infectieux à l'extérieur du bâtiment devront également être respectées (port de blouse jetable, charlotte, gants jetables, bottes dédiées aux locaux).

- **Mesures de confinement des animaux**

Un éléphant atteint de tuberculose maladie et donc contagieux, doit être isolé de manière à ne pas être en contact avec le public d'une part, les autres animaux de toutes espèces sensibles d'autre part. Par mesure de sécurité et au vu de la difficulté déjà évoquée de qualifier le risque contagieux d'un éléphant, le Gecu estime que les mesures de confinement doivent s'étendre également aux éléphants suspects de tuberculose, en attendant de préciser leur statut.

Ceci nécessite d'héberger l'éléphant dans un système clos et ne communiquant pas avec l'extérieur. L'isolement derrière des grilles ou des vitres paravents est insuffisant : la transmission de la tuberculose peut se faire par voie aérienne. L'éléphant doit être isolé dans un bâtiment de quarantaine fermé (éventuellement vitré). Ce bâtiment doit par ailleurs empêcher la pénétration de rongeurs et doit disposer d'une ventilation propre ne communiquant avec aucune autre salle.

Si un éléphant tuberculeux est maintenu dans le respect des conditions ici présentées, il ne semble pas qu'il soit nécessaire d'isoler physiquement le bâtiment de détention des autres animaux : un bâtiment de quarantaine peut être mis en place au sein d'un parc zoologique tant qu'il n'est pas accolé directement à d'autres enclos, qu'il dispose d'un système de ventilation séparé et que toutes les mesures de biosécurité sont respectées.

Dans la mesure où l'éléphant peut excréter le bacille par toutes ses sécrétions, tous les déchets doivent être traités comme des matières potentiellement virulentes. Le nettoyage du bâtiment devra être effectué par un personnel équipé des EPI efficaces et de manière à limiter l'aérosolisation des déchets de l'éléphant. Tout ce qui sortira du bâtiment (outils, eaux de lavage, déchets) devra être traité comme potentiellement virulent.

Le transport éventuel d'éléphants tuberculeux doit obéir à certaines règles : compte-tenu des risques de dissémination possibles de mycobactéries durant le transport entre lieux de séjour, le Gecu recommande que les conditions de transport respectent les règles en vigueur pour l'acheminement de bovins tuberculeux vers l'abattoir. Il convient en particulier d'interdire toute rupture de charge et de veiller à l'absence de risque de contamination de la cabine du chauffeur par la ventilation du compartiment de transport des animaux. Le camion doit être fermé. Le nettoyage et la désinfection du véhicule devront être effectués de préférence dans un clos d'équarrissage ou un abattoir, possédant les structures nécessaires pour un traitement adéquat des effluents. Le transport devra aussi respecter les règles en vigueur relatives au bien-être animal

Il convient de préciser que les éléphants sont des animaux sociaux et que leur isolement dans un bâtiment fermé pose la question de l'expression de leurs comportements naturels et donc du bien-être de ces animaux.

### **Conclusions sur l'isolement d'individus infectés et la protection des manipulateurs**

Les mesures de protection doivent concerner de façon identique l'ensemble du personnel qui intervient dans le même bâtiment que l'éléphant tuberculeux, que ce soit un soigneur, un vétérinaire ou d'autres métiers. La ventilation du bâtiment d'isolement doit être uniquement dédiée aux éléphants et ne doit pas communiquer avec d'autres salles. Les mesures de protection du personnel exposé passent par le port d'un équipement complet de protection, en particulier d'appareils de protection respiratoire de norme FFP2. Ces mesures de protection doivent être accompagnées d'un isolement physique de l'animal et de la limitation du nombre de visites au strict minimum. Par ailleurs, il convient d'informer le personnel sur les risques encourus, les modes de contamination et les symptômes d'appel de la tuberculose chez l'Homme et également chez l'éléphant. Un suivi du personnel par la médecine du travail doit également être mis en place selon le même protocole que celui auquel sont soumis les personnels soignants exposés à des patients tuberculeux en médecine humaine

### **3.3. Méthodes analytiques disponibles**

Les méthodes de recherche de la tuberculose, qu'elles soient directes ou indirectes, ne permettent pas de garantir, lorsqu'elles donnent un résultat négatif, que l'individu testé n'est pas porteur de *M. tuberculosis*.

Dans l'ensemble du présent Avis, on entend par méthode directe, une méthode visant à identifier l'agent pathogène directement. Une méthode indirecte vise quant à elle à identifier une réaction immunitaire spécifique vis-à-vis de cet agent pathogène.

Pour l'ensemble des méthodes présentées, les prélèvements doivent être effectués par un vétérinaire.

#### **3.3.1. Méthodes de recherche directe de *M. tuberculosis***

Trois méthodes de prélèvement de productions respiratoires en vue d'une recherche de *M. tuberculosis* par mise en culture sont décrites comme « acceptables » par les « Guidelines » pour le prélèvement de sécrétions respiratoires en vue d'une recherche de *M. tuberculosis* par mise en culture. Ces trois méthodes sont basées sur le même principe : la mise en culture des produits d'éjection par la trompe. Dans deux cas, du liquide est injecté dans la trompe puis récupéré (sur animal vigile ou sur animal sédaté), dans le troisième cas, seules les productions muqueuses activement éjectées de la trompe sont mises en culture.

La mise en culture, lorsqu'elle s'avère positive, permet également de génotyper la souche et d'évaluer la sensibilité de *M. tuberculosis* aux antibiotiques.

Il est possible également de procéder à la recherche de bactérie par examen microscopique direct (sans mise en culture) ou par PCR sur les produits de lavage de trompe. Toutefois, la sensibilité de la PCR sur produits de lavage n'est pas documentée. Cette méthode peut être utilisée en même temps que la mise en culture, dans l'objectif de gagner du temps si elle s'avère positive.

Une méthode PCR a été décrite récemment : Kay *et al.* (2011) utilise l'amorce IS6110, universelle pour toutes les mycobactéries appartenant au complexe de *M. tuberculosis*.

Cette cible PCR, décrite comme la plus sensible pour le diagnostic de la tuberculose, ne différencie pas la sous-espèce de bacille tuberculeux au sein du complexe *tuberculosis* (ex. *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*) mais confirme, lorsqu'elle est positive, le caractère zoonotique de l'agent mis en évidence.

Pour palier cette difficulté, d'autres cibles génétiques, qui donnent cependant des résultats moins sensibles, peuvent également être utilisées (Huard *et al.* 2003). La concentration d'ADN extrait du prélèvement conditionnera de façon plus importante le résultat pour cette dernière méthode (combinaisons de plusieurs cibles génétiques) que pour la PCR IS6110.

A noter que ces méthodes, décrites ici sur animal vivant, peuvent également être mises en œuvre pour des examens post-mortem sur lésions. Dans ce cas la sensibilité des méthodes est maximale.

– *Description*

La méthode de référence retenue par les « guidelines » est la mise en culture de sécrétions respiratoires obtenues par lavage de trompe avec sac. Ce procédé consiste à injecter 60 ml de sérum physiologique stérile dans la trompe de l'éléphant, à faire lever la trompe le plus haut possible puis à faire expulser le liquide que l'on récupère dans un sac stérile. Vingt ml sont récupérés en flacon stérile sur lesquels l'examen microscopique direct, la mise en culture et la PCR sont possibles (Mikota and Maslow 2011). Cette méthode nécessite un entraînement préalable de l'animal pendant plusieurs semaines et éventuellement une contention. L'acte de prélèvement peut s'avérer dangereux pour le manipulateur, surtout sur des animaux peu dociles (Mikota and Maslow 2011). La procédure du lavage doit être absolument respectée (surtout l'élévation de la trompe après injection) : si l'individu n'inspire pas le liquide, seule la trompe est rincée et non les voies respiratoires supérieures correspondant à l'oropharynx.

L'acte de lavage de trompe peut être effectué sous anesthésie générale (Janssen *et al.* 2004), éventuellement sous sédation debout mais pas de façon répétée, car la répétition à courts intervalles de contention chimique est dangereuse pour l'animal et pour les opérateurs. Par ailleurs, en sédation, les liquides de lavages pénètrent moins loin que si l'animal inspire de façon volontaire. Ils ne passent pas par l'oropharynx ; le lavage est limité à la trompe. Le prélèvement est donc moins pertinent sous sédation.

– *Qualité des tests*

Les tests directs (examen microscopique après coloration de Ziehl-Neelsen, PCR, mise en culture) qui peuvent être mis en œuvre sur un échantillon de liquide de lavage de trompe ne nécessitent que l'utilisation de réactifs disponibles en France. Ils peuvent être réalisés en laboratoire de microbiologie agréé, de préférence au Laboratoire National de Référence qui dispose des moyens de génotypage permettant de caractériser la souche en cause, en cas de culture positive.

Outre les difficultés pratiques à mettre en œuvre un tel prélèvement, le résultat, même négatif, ne pourra en aucun cas apporter une preuve que l'animal est indemne : l'excrétion du bacille est intermittente (Lyaschenko *et al.*, 2012) et de ce fait les analyses sont rarement positives même sur animal fortement infecté. Enfin, les éléphants utilisent leur trompe pour un grand nombre de fonctions, entraînant des contaminations importantes, entre autres par des mycobactéries atypiques, qui gênent très fortement la recherche de *M. tuberculosis* (Mikota and Maslow 2011). Deux expériences de recherche de *M. tuberculosis* dans des lavages de trompe ont permis de mettre le germe en évidence 7 fois sur 189 (expérience en Zoo en Suède sur 5 individus avec tuberculose avérée (Mikota and Maslow 2011)) et 2 fois sur 60 (expérience en Thaïlande sur 3 éléphants avec tuberculose avérée (Angkawanish *et al.* 2010)), établissant la sensibilité de la méthode autour de 4% sur des animaux malades de tuberculose. L'augmentation de la fréquence des lavages permet d'améliorer la sensibilité et il est recommandé de répéter ce lavage plusieurs fois (3 fois sur 7 jours) pour améliorer la sensibilité globale du test (Lyashchenko *et al.* 2012).

### 3.3.2. Méthodes de recherche indirectes

La recherche indirecte d'une contamination tuberculeuse consiste en une exploration des réponses immunitaires cellulaires et humorales déclenchées au cours de l'infection par la mycobactérie. L'ensemble de ces tests peut être réalisé sur animal vigile ou anesthésié sans altération du résultat : la sédation n'a pas d'effet sur les niveaux d'immunoglobulines.

• **Tests basés sur la réponse cellulaire**

Les outils pour explorer les réactions d'immunité cellulaire chez l'éléphant ne sont pas encore validés : l'intradermo-tuberculation a été utilisée sur les éléphants de parcs zoologiques et de cirques aux Etats-Unis jusqu'au début des années 2000 mais semble peu sensible, même sur des animaux excréteurs. Une étude donne une sensibilité de 16,7% (une réaction positive pour 6 éléphants malades) et une spécificité de 74,2% (8 réactions positives pour 31 éléphants non malades) dans la situation d'une tuberculose maladie avérée (Mikota *et al.* 2001). Les « Guidelines » USAHA/APHIS/USDA (USAHA, 2010) recommandent de ne pas utiliser ce test.

Les tests interféron gamma disponibles pour les animaux (Bovigam®, Primagam®, par exemple) ne sont pas utilisables en l'état chez l'éléphant car ils doivent être modifiés pour permettre la détection de l'interféron gamma de cette espèce (Morar *et al.* 2007).

- **Tests basés sur la réponse humorale**

Il existe plusieurs tests de recherche d'infection tuberculeuse basés sur la réponse immunitaire humorale qui sont utilisables chez l'éléphant.

Deux kits sont commercialisés aux Etats-Unis et disponibles en France: le test Dual Path Platform VetTB assay (DPP) et le test Elephant TB STAT PAK (STAT PAK). Cependant, le test STAT PAK est en cours de réajustement aux Etats-Unis, suite à un changement de fournisseur d'un des composants. Sa disponibilité est ainsi suspendue pour plusieurs mois (en attente de sa re-validation chez l'éléphant par l'USDA aux Etats-Unis).

Le test « MAPIA » (Multi Antigen Print ImmunoAssay), est exclusivement pratiqué aux USA.

Il existe également un test ELISA pratiqué au National Reference Laboratory, CIDC de Lelystad aux Pays Bas.

- Description

- Le kit commercial Elephant TB STAT PAK (ChemBio Inc, Medford, NY) est basé sur la technologie « lateral flow ». Il s'agit d'une cassette contenant une feuille de cellulose. Le sérum déposé sur cette bande migre par capillarité vers une première bande sur laquelle les anticorps sont conjugués à des billes de latex de couleur bleue (Lyashchenko *et al.* 2006; Lyashchenko *et al.* 2012). La deuxième bande du test contient un cocktail d'antigènes de Mycobactéries (un panel choisi pour être notamment spécifique des mycobactéries du complexe *tuberculosis*) sur lequel les anticorps conjugués spécifiques de ces antigènes se fixent, colorant cette bande en bleu. Ce test est présenté comme disposant d'une sensibilité et d'une spécificité proches de 100% par rapport à la mise en culture positive, suite à un lavage de trompe (Lyashchenko *et al.*, 2012).
- Le Dual Path Platform (DPP) VetTB assay (ChemBio Inc, Medford, NY) est basé sur la révélation par des particules d'or couplées à des protéines A/G (ces protéines sont capables de se fixer aux IgG) de la fixation d'IgG sur deux bandes : T1 (Antigène recombinant MPB83) et T2 (Antigènes recombinants CFP10/ESAT-6). Le test est positif si au moins une des deux bandes est positive (Greenwald *et al.*, 2009). Le résultat est obtenu par une lecture identique à celle du STAT PAK, à laquelle on peut éventuellement ajouter une valeur semi-quantitative en mesurant l'intensité de coloration des bandes par une lecture optique de la réflectance (Greenwald *et al.* 2009). Les qualités de sensibilité et de spécificité de ce test sont équivalentes à celles du STAT PAK, qui repose sur les mêmes antigènes (Greenwald *et al.*, 2009).

- Le test MAPIA est quant à lui basé sur la détection de plusieurs antigènes, sur plusieurs bandes. Son avantage est de présenter un profil de réponse immunitaire. Toutefois, cette méthode n'étant pratiquée qu'aux Etats-Unis, sa mise en œuvre suppose d'y envoyer les sérums d'éléphants en provenance de France. Or, s'agissant d'échantillons biologiques d'une espèce citée en Annexe I de la CITES<sup>1</sup>, l'acheminement de sérums vers les Etats-Unis est complexe sur le plan administratif.
- Le test ELISA pratiqué aux Pays-Bas peut être utilisé sur plusieurs espèces animales de zoos. Il a été évalué notamment pour les cervidés (EFSA 2008) mais il n'existe pas de publication relative à son utilisation et son évaluation chez l'éléphant. Brièvement, ce test utilise des filtrats d'antigènes de *M. bovis* ou *M. avium* associés à l'antigène recombinant MPB70 (Hall and Thoen 1983; Flamand *et al.* 1994).

Aujourd'hui, seul le test DPP est immédiatement disponible en France.

- Qualité des tests

Les kits présentés (STAT PAK et DPP) ont souvent été testés conjointement. Une première étude menée en 2009 sur 236 éléphants dont 26 confirmés infectés par *M. tuberculosis* par culture, a donné des sensibilités et spécificités de 100% pour les deux tests par rapport au standard « culture positive suite à lavage de trompe » (Greenwald *et al.* 2009). Une deuxième étude menée sur 14 éléphants infectés a confirmé que les animaux bactériologiquement positifs étaient également séropositifs (Lyashchenko *et al.* 2012).

Ces données doivent être interprétées avec prudence car elles sont calculées par rapport à des cultures positives suite à lavages de trompe ou à des cultures positives post-mortem. Il s'agit donc de sensibilités élevées pour des éléphants excréteurs ou des éléphants malades et non pour l'ensemble des éléphants porteurs d'une infection tuberculeuse (éléphants malades de tuberculose mais également éléphants présentant des tuberculoses latentes). Par ailleurs, des faux négatifs ont déjà été documentés : un éléphant mort de tuberculose était négatif 3 fois de suite au test STAT PAK respectivement 4 mois, 7 jours et 24 heures avant sa mort (Angkawanish *et al.* 2010). Deux autres éléphants de la même étude étaient séronégatifs pour le même test quelques jours avant leur mort mais étaient positifs respectivement 10 et 23 mois plus tôt. Pour ces éléphants, un état anergique est l'hypothèse avancée pour expliquer l'absence d'anticorps.

Prenant en compte ces réserves, il faut souligner que les tests STAT PAK et DPP restent les meilleurs kits aujourd'hui disponibles en terme de sensibilité et de spécificité.

Ces kits ont par ailleurs été testés dans une étude longitudinale au cours de laquelle ont été analysés des sérums prélevés sur 14 éléphants plusieurs mois ou années avant une première culture positive sur lavage de trompe (ou une autopsie révélant une tuberculose). Les résultats montrent que les tests DPP et STAT PAK sont positifs plusieurs mois à années avant les cultures prouvant la précocité de ces tests dans le diagnostic d'une tuberculose (Lyashchenko *et al.* 2012).

Ces tests sont présentés comme plus précoces que les tests directs mais il est difficile de chiffrer le délai entre infection et positivité à ces tests ou le délai entre positivité à ces tests et excrétion du bacille (Murphree *et al.* 2011).

---

<sup>1</sup> La CITES est la Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction, connue également comme la Convention de Washington. C'est un accord international entre Etats. Elle a pour but de veiller à ce que le commerce international des spécimens d'animaux et de plantes sauvages ne menace pas la survie des espèces auxquelles ils appartiennent. L'Annexe I de la CITES concerne les **espèces les plus menacées**. Leur commerce international est en règle générale **interdit**.

### 3.3.3. Interprétation des résultats des tests

Compte tenu des différents éléments mis en évidence en utilisant les méthodes de recherche directes et indirectes pour la tuberculose, d'une part et en tenant compte d'autre part, de la qualité de ces tests, l'interprétation des résultats d'analyse est résumée dans le tableau ci-après :

Résultat des tests		Interprétation
Indirect	Direct	
+	+	L'animal est infecté par le bacille de la tuberculose et il est excréteur.
+	-	L'animal est infecté par le bacille de la tuberculose. Son statut d'excréteur n'est pas connu.
-	-	Compte tenu des valeurs intrinsèques des tests, il n'est pas possible de conclure quant au statut sanitaire de l'animal sur la base de ces seuls résultats.
-	+	L'animal est infecté par le bacille de la tuberculose et il est excréteur.

#### **Conclusions sur les méthodes analytiques**

Les méthodes de recherche directe du bacille tuberculeux sont basées sur la mise en culture, l'examen microscopique et la PCR sur liquides de lavage de trompe. La détection sur animal sédaté est moins sensible que sur animal vigile et entraîné. Cette méthode est peu sensible, du fait de la conjonction de plusieurs facteurs : le lavage de trompe ne permet pas toujours la récupération des bacilles, l'excrétion des bacilles lors d'une tuberculose maladie est intermittente, de nombreux éléments prélevés lors du lavage de trompe constituent des inhibiteurs de la PCR et rendent la culture bactériologique délicate. Plusieurs lavages de trompe sont recommandés à courts intervalles pour augmenter la probabilité de détection du bacille tuberculeux.

Malgré ses imperfections, la recherche directe par lavage de trompe reste aujourd'hui la seule méthode qui permette d'identifier de son vivant, un animal excréteur et donc contagieux.

Il existe plusieurs méthodes de recherche indirectes. Les méthodes basées sur l'immunité cellulaire ne sont pas envisageables ici car moins sensibles que d'autres méthodes disponibles (cas de l'intradermo-tuberculation) ou non disponibles pour l'éléphant (cas du test interféron gamma).

Les méthodes de référence retenues par les « guidelines » et réalisables en France sont les kits DPP et Elephant TB STAT PAK, sous réserve de disponibilité de ce dernier. Ces deux méthodes sont présentées comme ayant des sensibilités et spécificités proches de 100% mais ces valeurs intrinsèques sont calculées par rapport à des éléphants malades et excréteurs (culture positive sur lavage de trompe). Les sensibilités et spécificités réelles de ces tests, à savoir leur capacité à détecter l'ensemble des éléphants infectés de bacilles tuberculeux (malades ou infectés latents) ne sont pas connues mais sont certainement inférieures à 100%. Aussi, les résultats de ces tests doivent-ils toujours être interprétés avec prudence.

### 3.4. Analyse du statut sanitaire de Baby et Népal

#### 3.4.1. Historique sanitaire des deux éléphants

Le Tableau 1 montre l'historique connu des éléphants du Parc de la Tête d'Or.

Initialement, 3 éléphants d'origine inconnue ont été introduits au Parc de la Tête d'Or en 1964, dont deux sont morts de causes inconnues en 1995 et 1998. Par la suite, les deux éléphants Baby et Népal ont été introduites en 1999 et ont côtoyé Java jusqu'à sa mort en 2012. L'origine de Baby et Népal est inconnue.

1964	Introduction de trois éléphants d'origine inconnue (dont l'éléphant Java) au Parc de la Tête d'Or
1995	Mort d'un premier éléphant (causes inconnues)
1998	Mort d'un deuxième éléphant (causes inconnues), le dernier éléphant vivant est Java
1999	Introduction de Baby et Népal, deux éléphants prêtées au Parc par le cirque Pinder pour cause de problèmes de comportement.
Juillet 2010	Un premier dépistage de tuberculose est effectué sur Baby et Népal à l'aide de trois tests : Elephant TB STAT PAK (Chembio) DPP (Chembio) ELISA (Lelystad) Java n'a pas été prélevé
Septembre 2010	Une deuxième série de tests est menée sur les mêmes éléphants avec les 3 mêmes tests
Septembre 2010	Suite à des résultats positifs à certains tests, les trois éléphants sont isolées du public
Août 2012	Mort de Java. Culture de <i>M. tuberculosis</i> positive sur des prélèvements d'autopsie

**Tableau 1 : les différentes étapes marquantes de la vie des éléphants du Parc de la Tête d'Or.**

Les deux séries de tests ainsi que leurs résultats sont présentés dans le Tableau 2 ci-dessous.

	"BABY" L99001	Date prélèvement	Date des tests	"NEPAL" L99002	Date prélèvement	Date des tests
ERT	POS	22/07/2010	17/08/2010	neg	17/08/2010	19/08/2010
DPP bande 1 MPB83	POS	22/07/2010	17/08/2010	neg	17/08/2010	19/08/2010
DPP bande 2 ESAT6/CFP10	POS	22/07/2010	17/08/2010	POS	17/08/2010	19/08/2010
ELISA MPB70	<5	22/07/2010	25/08/2010	<5	19/08/2010	25/08/2010
ELISA Avium/Para	<5	22/07/2010	25/08/2010	<5	19/08/2010	25/08/2010
ELISA Bovis	<5	22/07/2010	25/08/2010	<5	19/08/2010	25/08/2010
post IDT* (réalisé le 20/08/2010):						
ERT	POS	07/09/2010	29/09/2010	neg	07/09/2010	29/09/2010
DPP bande 1 MPB83	neg	07/09/2010	29/09/2010	neg	07/09/2010	29/09/2010
DPP bande 2 ESAT6/CFP10	neg	07/09/2010	29/09/2010	neg	07/09/2010	29/09/2010
ELISA MPB70	<5	23/08/2010	25/08/2010	<5	23/08/2010	25/08/2010
ELISA Avium/Para	<5	23/08/2010	25/08/2010	<5	23/08/2010	25/08/2010
ELISA Bovis	<5	23/08/2010	25/08/2010	<5	23/08/2010	25/08/2010

**Tableau 2 : récapitulatif des résultats des tests pratiqués en 2010 sur Baby et Népal (ERT = STAT PAK)**



Ce Tableau 2 ainsi que les photos des tests (annexe 3) montrent que l'éléphante Baby présentait des réactions positives pour le test STAT PAK (ou ERT) ainsi que pour le test DPP (les deux bandes sont positives) lors de la première série de tests du 22 juillet 2010 (test ELISA négatif pour les antigènes Avium/Paratuberculosis et Bovis).

Cette même éléphante a subi une intradermo-tuberculation par PPD le 20 août 2010 qui n'avait pas une vocation diagnostique : cette IDT avait pour but de créer un effet « booster » sur l'immunité tuberculose spécifique, en vue de la deuxième série de tests effectué 15 jours plus tard, le 7 septembre 2010. Les conditions de réalisation de cette IDT ne sont pas connues (dose et voie d'administration non documentées).

La deuxième série de tests pour Baby a montré une seule réaction positive au test STAT PAK et une « négativation » du test DPP (les tests ELISA sont restés négatifs).

Le Tableau 2 montre que Népal a subi les mêmes tests et la même IDT 15 jours avant la deuxième série de tests. Népal a répondu positivement sur une seule bande du test DPP (Bande ESAT6/CFP10) lors de la première série de tests et a répondu négativement à l'ensemble des tests de la deuxième série.

La première série de tests est fortement évocatrice d'une infection par les bacilles tuberculeux chez Baby puisque deux tests successifs ont été positifs.

En ce qui concerne Népal, la réaction à une seule des deux bandes d'un test DPP est considérée comme un test positif dans la littérature (Greenwald *et al*, 2009). Il peut paraître surprenant que ce test DPP se soit « négativé » chez les deux individus pour le deuxième test, mais Baby est restée positive au test STAT PAK, confirmant son statut infecté. A noter qu'à l'époque de ce test, le DPP était encore en cours de validation. Il est donc préférable de retenir le résultat du STAT PAK, test alors validé.

Par ailleurs, l'effet « booster » par intradermo-tuberculation n'est pas démontré chez l'éléphant et l'impact d'une IDT mal connue, sur les résultats de tests sérologiques ne peut être correctement évalué.

Au vu de l'ensemble des deux séries de tests, Baby était infectée par des bacilles tuberculeux en 2010 et le statut de Népal peut être considéré comme douteux.

Ces deux éléphantés ont coexisté avec Java entre 1999 et 2012. Quelle que soit la cause de la mort de Java, il faut souligner la présence de la bactérie vivante *M. tuberculosis* dans deux types de prélèvements différents.

La mort de Java ne semble pas avoir été due à une tuberculose : de nombreux autres prélèvements réalisés sur les lésions qui ont causé la mort (principalement des lésions rénales) n'ont pas permis de mettre en évidence le bacille. Il n'est donc pas possible de conclure sur le caractère excréteur de l'animal juste avant sa mort, mais les lésions pulmonaires retrouvées et la mise en évidence de *M. tuberculosis* vivante dans ces lésions sont fortement évocatrices d'une tuberculose maladie et d'une excrétion antérieure à la mort de Java.

La bactérie isolée des poumons de Java a été typée ; il s'agit d'une souche de type « East African Indian », très courante en Asie, mais toutefois de répartition mondiale. Ce type de souche a été déjà retrouvé chez des éléphants en captivité en Union Européenne et aux Etats-Unis (Higgins 2011).

Baby et Népal ont donc un contexte épidémiologique défavorable pour la tuberculose : Baby était infectée par des bacilles tuberculeux en 2010 et Népal était douteuse. On ne peut distinguer à l'heure actuelle chez ces deux éléphants une infection tuberculeuse latente d'une tuberculose maladie. A la suite de ces tests, les deux éléphantés ont passé 2 ans avec un éléphant présentant une tuberculose maladie.

Concernant la valeur des deux individus Baby et Nepal pour la conservation de l'espèce, le Gecu apporte les précisions suivantes : l'éléphant d'Asie (*Elephas maximus*) est classé « menacé de disparition » par la liste rouge de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature ([www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)). On estime que la population actuelle est comprise entre 40.000 et 50.000 individus, répartis en petites populations, souvent isolées, présentes dans 13 pays. Environ la moitié se trouve en Inde. La déforestation, la réduction des habitats naturels et le braconnage constituent des menaces encore non maîtrisées. Dans ce contexte, le sort des deux animaux présents à Lyon au Parc de la Tête d'Or, âgés, peut-être malades, est sans aucun impact sur le devenir de l'espèce. Inversement, prélever des animaux en nature pour des cirques ou des parcs zoologiques risque de contribuer à aggraver la situation délicate de l'espèce.

### 3.4.2. Conclusions sur l'utilisation à venir des tests pour les éléphants Baby et Népal

En ce qui concerne la mise en place d'examen complémentaires pour documenter davantage le statut sanitaire des éléphants du Parc de la Tête d'Or, les experts du Gecu proposent la mise en place simultanée de tests indirects et directs.

Les tests indirects présentant les meilleures sensibilités et spécificités sont les deux tests commercialisés par le laboratoire Chembio : Elephant TB STAT PAK et DPP. Il s'avère que seul l'un de ces deux tests est aujourd'hui directement disponible : le test DPP.

Les recherches directes de *M. tuberculosis* seront effectuées à partir de lavages de trompe avec un examen microscopique après coloration de Ziehl-Neelsen, une mise en culture sur milieu spécifique. Une amplification par PCR pourra être réalisée sur le prélèvement en tenant compte des difficultés liées à la présence probable d'inhibiteurs de la réaction dans l'échantillon et du manque de connaissance de la sensibilité de la PCR vis-à-vis de la culture.

Le Gecu recommande que les lavages de trompe soient effectués sur animal vigile et entraîné, à raison de trois lavages sur une semaine par la méthode dite du « lavage en sac ». Les experts sont conscients des contraintes de délais imposées par cette méthode du fait du nécessaire entraînement préalable des éléphants aux lavages de trompe, mais soutiennent ce choix pour deux raisons :

- Un lavage unique sous sédation aurait un impact très négatif sur la sensibilité de la méthode comparé à trois lavages sur animal vigile.
- Le risque important représenté par trois sédations répétées en une semaine pour un éléphant et pour le personnel opérant la procédure, ce qui interdit d'envisager ce procédé.

Les tests indirect (DPP) et direct (examens bactériologique ou PCR sur liquide de lavages de trompe) seront interprétés en concomitance, afin d'améliorer l'information obtenue : le DPP informe sur l'état infecté de l'individu, mais le statut infecté ne signifie pas systématiquement que l'animal est ou deviendra excréteur. La recherche du pathogène informe sur l'excrétion du bacille et donc la contagiosité de l'individu. La culture bactérienne permet aussi, si elle est positive, d'étudier le génotype du bacille tuberculeux et sa sensibilité aux antibiotiques. En conséquence, il ne paraît pas pertinent de conditionner l'utilisation d'un test aux résultats de l'autre test.

Les actes de prélèvement (prises de sang et lavages de trompes) devront être effectués par un vétérinaire. Les tests (DPP, PCR et bactériologie) seront réalisés par le Laboratoire National de Référence « tuberculose » au laboratoire de santé animale de Maisons-Alfort de l'Anses.

Au vu du protocole proposé, les résultats des différents tests peuvent être obtenus après des délais différents. Le test DPP peut être mis en place rapidement et ne nécessite pas de délai particulier. Les lavages de trompe nécessiteront un entraînement préalable des éléphants de plusieurs semaines à quoi il faudra ajouter le délai de rendu des analyses d'une semaine pour les PCR et de trois mois pour les cultures (durée maximale de culture pour déclarer le prélèvement négatif).

Le choix de réaliser des tests complémentaires ne remet pas en question les résultats des tests obtenus lors des prélèvements effectués en 2010. Seul le test DPP a été ajusté par le laboratoire Chembio depuis 2010 : les tests DPP réalisés en 2010 ont été pratiqués avec des unités de tests alors expérimentales ; depuis, le laboratoire Chembio a ajusté ce produit afin qu'il puisse finalement obtenir une validation par l'USDA fin 2012. C'est donc cette version validée qu'il convient d'utiliser dans le cas présent.

L'interprétation qui sera faite des nouvelles analyses devra prendre en compte les résultats de l'ensemble des tests effectués en 2010. Si des sérums issus des prélèvements de Baby et Népal de 2010 sont toujours disponibles, les experts proposent que ces prélèvements soient testés à nouveau par le test DPP actuel, au vu des ajustements que ce test a subi depuis 2010, ceci sous réserve du respect des conditions de conservation des sérums en dessous de -18°C. En effet, des études rétrospectives sur sérothèques ont été réalisées avec succès sur des sérums conservés durant une période supérieure à 5 ans, ce qui indique une bonne conservation des anticorps (Greenwald *et al*, 2009).

Les résultats de ces tests seront interprétés avec discernement :

- Un test DPP positif est en faveur d'un état infecté de l'éléphant (bonne spécificité) mais un résultat négatif ne sera pas conclusif compte tenu de la sensibilité du test et de l'existence éventuelle d'une phase anergique au moment du prélèvement ;
- Si la culture est positive sur le lavage de trompe, cela signifie que l'éléphant est atteint de tuberculose et qu'il est contagieux (excrétion du bacille par l'individu). En revanche, des résultats négatifs, ne pourront pas être conclusifs au vu de la faible sensibilité de la méthode.

En outre, compte tenu de la situation épidémiologique des 2 éléphants, un suivi sanitaire longitudinal doit être envisagé, dont les conditions devront être précisées en fonction des résultats de la première série de tests, telle que présentée ici.

### **3.5. Traitements**

Aujourd'hui, le traitement d'éléphants malades de tuberculose n'est pratiqué qu'aux Etats-Unis. Le présent avis décrit ici le principe de ces traitements d'après les publications américaines.

#### **3.5.1. Animaux concernés par le traitement**

Aux Etats-Unis, un consensus s'est dégagé concernant la nécessité de traiter les éléphants atteints de tuberculose maladie, c'est-à-dire positifs en culture suite à lavage de trompe et/ou présentant les signes cliniques d'une tuberculose (Mikota and Maslow 2011). Les éléphants infectés mais non malades, c'est-à-dire en pratique les animaux séropositifs mais négatifs en culture suite à lavage de trompe, peuvent subir un traitement prophylactique dans certains cas, après une évaluation individuelle du risque. Précisons que s'il est recommandé de traiter les animaux malades, il n'existe pas de réglementation qui rende ce traitement obligatoire aux Etats-Unis.

### 3.5.2. Démarche du traitement et principes actifs

Le traitement de la tuberculose de l'éléphant est directement inspiré de celui de l'Homme. De nombreux facteurs conditionnant son efficacité ne sont pas connus chez l'éléphant : les concentrations plasmatiques efficaces chez l'Homme ne le sont peut-être pas chez l'éléphant, la durée de traitement est fixée arbitrairement. Les inconnues entourant la thérapeutique antituberculeuse chez l'éléphant rendent aléatoire la définition de paramètres de suivi de l'observance d'un traitement dans cette espèce.

- **Traitement curatif**

Les « guidelines » présentent un ensemble de traitements basé sur le même principe que les traitements humains chez des patients atteints de tuberculose maladie : un individu infecté doit être traité quotidiennement par une association d'antibiotiques, pour permettre une efficacité du traitement et éviter l'apparition d'antibiorésistances.

Avant de traiter un éléphant, la sensibilité de la souche de *M. tuberculosis* mise en évidence doit être évaluée pour permettre le choix optimal des antibiotiques.

Le traitement curatif de la tuberculose d'un éléphant est basé sur 12 mois, contre 6 mois chez l'Homme. Cet allongement de la durée de traitement a été choisi compte tenu des inconnues qui pèsent sur le succès du traitement chez l'éléphant et sur la possibilité que la tuberculose soit plus difficile à éradiquer chez cette espèce (Mikota and Maslow 2011). L'ensemble des traitements décrits nécessite l'administration de doses élevées de médicaments. Chez l'éléphant, de telles administrations ne peuvent être envisagées sans un entraînement préalable de l'individu et de nombreux refus de traitements peuvent être observés, notamment au début. Les protocoles mis en place, notamment par les « guidelines », précisent et prennent en compte les refus de traitement dans leurs protocoles : les protocoles proposés donnent une durée de principe du traitement, accompagnée d'une durée maximale acceptable. Par exemple, pour une première étape de trithérapie de 2 mois, les « guidelines » précisent qu'elle peut s'étaler en pratique jusqu'à 90 jours (30 jours de refus de traitement au maximum).

Le principe du traitement curatif est présenté dans le Tableau 3 : il repose sur l'administration quotidienne de trois antibiotiques de première ligne pendant les 2 premiers mois (90 jours au maximum) puis sur l'administration quotidienne de deux antibiotiques pendant les 10 mois suivants (durée totale acceptée de 15 mois au maximum).

Durée totale d'un traitement : 12 mois	
2 premiers mois	10 mois suivants
Traitement quotidien avec 3 antibiotiques de première ligne	Traitement quotidien avec 2 antibiotiques de première ligne.
60 doses de chaque antibiotique en 90 jours	300 doses en 10 mois
360 doses données sur un délai maximum de 15 mois (prise en compte des potentiels refus de traitement)	

**Tableau 3 : principe du traitement curatif de la tuberculose chez l'éléphant**

Les antibiotiques recommandés pour le traitement sont les mêmes que pour le traitement d'un humain à savoir des antibiotiques de première ligne :

- Isoniazide,
- Rifampicine,

- Pyrazinamide,
- Ethambutol.

Ces principes actifs présentent les meilleures activités et le moins d'effets secondaires. Des antibiotiques de seconde ligne, qui présentent une activité moindre et des effets secondaires plus importants, sont utilisés en cas d'échec thérapeutique des antibiotiques de première ligne, c'est-à-dire sur des souches multi-résistantes aux antibiotiques (Multi-drug resistant TB). Il s'agit de :

- Capréomycine,
- Ethionamide,
- Cycloserine,
- Thiacétazone.

Les fluoroquinolones sont également évoquées par les « guidelines » comme présentant une bonne activité contre à *M. tuberculosis*.

Les doses efficaces de principes actifs ne sont pas connues chez les éléphants. Les références pour le traitement des éléphants sont les limites basses des concentrations plasmatiques considérées comme efficaces chez l'Homme (Mikota and Maslow 2011).

Basées sur les concentrations plasmatiques efficaces chez l'Homme, des posologies spécifiques à l'éléphant sont documentées pour l'Isoniazide, la Rifampicine, le Pyrazinamide et l'Ethambutol, associées à des voies d'administration précises (Maslow *et al.* 2005a; Maslow *et al.* 2005b; Zhu *et al.* 2005; Peloquin *et al.* 2006). Les publications qui présentent ces posologies indiquent que le suivi de l'observance d'un traitement doit être effectué par mesure des concentrations plasmatiques des principes actifs administrés. Ainsi la mise en place d'un traitement chez un éléphant doit être accompagnée d'un suivi des concentrations sanguines de tous les principes actifs employés tel que présenté dans le Tableau 4. Les techniques à utiliser pour ces dosages sont soit de la chromatographie liquide haute pression pour le dosage de la Rifampicine (Peloquin *et al.* 2006) et l'Isoniazide (Maslow *et al.* 2005b) ou de la chromatographie en phase gazeuse pour le Pyrazinamide et l'Ethambutol (Maslow *et al.* 2005a; Zhu *et al.* 2005).

Pour chaque principe actif, des délais post-traitement sont donnés pour estimer au mieux la concentration maximale dans le sang. Il est toutefois précisé dans plusieurs publications que, du fait de la variabilité individuelle, des prélèvements à 30mn, 1, 2, 4 et 6h post-traitement pour évaluer la concentration de chaque principe actif, sont plus pertinents pour estimer la sensibilité individuelle des animaux lors des premiers traitements (Mikota 2008).

Si des posologies ont été fixées pour les antibiotiques de première ligne, il n'existe pas de données sur les antibiotiques de seconde ligne. En cas d'échec thérapeutique des antibiotiques de première ligne, la mise en place d'un traitement basé sur des antibiotiques de seconde ligne ne repose sur aucune publication en termes de schéma thérapeutique.

Principe actif	Voie d'administration	Posologie (mg/kg)	Concentration sérologique efficace (µg/ml)	Suivi des concentrations sanguines
Isoniazide	Orale ou rectale	4 à 7,5	3-5	2-3h puis 6h post-traitement
Pyrazinamide	Orale ou rectale	30	20-60	1-2h post-traitement
Rifampicine	Orale	10	8-24	2 et 4 h post-traitement
Ethambutol	Orale	30	2-6	Non documenté

**Tableau 4 : Posologies chez l'éléphant des principaux principes actifs antituberculeux et suivi des concentrations sanguines.**

Si les doses de principes actifs sont équivalentes à celle proposées pour l'Homme, la dose totale pour un individu se compte en dizaines voire en centaines de grammes.

A titre d'exemple, une trithérapie présentée comme un traitement classique (Mikota and Maslow 2011) à base d'Isoniazide [posologie 7,5mg/kg/j (Maslow *et al.* 2005b)], Rifampicine [posologie 10mg/kg/j (Peloquin *et al.* 2006)] et Pyrazinamide [posologie 30mg/kg/j (Zhu *et al.* 2005)] nécessiterait respectivement 30, 40 et 120g de principes actifs pour un individu de quatre tonnes.

La voie et le mode d'administration des antibiotiques sont importants à préciser : plusieurs antibiotiques ne peuvent être associés aux aliments (Isoniazide (Maslow *et al.* 2005b), Rifampicine (Peloquin *et al.* 2006)) ; certains ne peuvent pas être administrés par certaines voies [par exemple la voie rectale pour la rifampicine (Peloquin *et al.* 2006)].

- **Traitement prophylactique**

Les traitements prophylactiques recommandés par les « guidelines » reposent sur l'administration quotidienne de deux antibiotiques de première ligne pendant 9 mois. Au total, cela représente 270 doses dont les 60 premières doivent être administrées dans les 90 premiers jours (pas plus de 30 jours avec refus de médication). Les « guidelines » présentent un traitement alternatif avec 60 doses dans les 90 premiers jours puis un traitement un jour sur deux pendant 9 mois avec double dose des deux antibiotiques.

Les « guidelines » précisent que cette administration doit être associée à des mesures de concentrations sanguines pour prouver que les concentrations efficaces sont atteintes.

Cette démarche de traitement au stade d'infection latente, efficace en santé publique humaine, apparaît hasardeuse chez l'éléphant, car il est difficile dans cette espèce d'affirmer le caractère purement latent de l'infection ; or une bithérapie favoriserait l'émergence de résistances si l'inoculum bactérien était plus élevé comme dans une tuberculose maladie méconnue.

### 3.5.3.Effets secondaires

La thérapie envisagée en cas de tuberculose chez l'éléphant fait appel à des principes actifs qui présentent un grand nombre d'effets secondaires. Les effets secondaires des principaux antibiotiques de première ligne sont listés dans le Tableau 5.

Principe actif	Effets secondaires
Isoniazide	Anorexie, léthargie, pica, anémie, élévation des enzymes hépatiques
Pyrazinamide	Potentiellement hépatotoxique
Rifampicine	Allergie potentiellement grave chez l'Homme
Ethambutol	Neuro-rétinite et baisse de l'acuité visuelle chez l'Homme

**Tableau 5 : effets secondaires des principaux antibiotiques de première ligne (adapté de Mikota (2008))**

Toute thérapie antituberculeuse doit être accompagnée d'un suivi mensuel de l'état de santé général, comprenant une surveillance clinique mais également un suivi hématologique et hépatique.

Si certains effets secondaires liés à des antibiotiques utilisés seuls sont connus chez l'éléphant, les effets secondaires consécutifs à l'utilisation combinée de ces principes actifs ne sont pas connus.

Au-delà des inconvénients que peuvent engendrer les effets secondaires cités, il est à noter que leur apparition peut obliger à stopper le traitement pendant plusieurs semaines ce qui peut avoir un impact sur le résultat de ce traitement (Dumonceaux *et al.* 2011).

Par ailleurs, le traitement et l'ensemble des tests et suivis qu'il engendre (suivi de l'évolution de la tuberculose, suivi de l'état sanitaire général, suivi de l'observance), obligent le personnel à des contacts réitérés de longue durée sur un animal contagieux.

#### 3.5.4. Efficacité du traitement

L'efficacité à long-terme d'un traitement antituberculeux chez des animaux est inconnue et il est difficile de quantifier l'efficacité de ces traitements chez les éléphants. Aucune publication ne fournit d'éléments chiffrés de succès ou d'échec thérapeutique. Si le traitement des éléphants est encadré aux Etats-Unis, il n'existe pas de suivi centralisé des éléphants traités et aucune base de données regroupant ces résultats. Quatre cas d'échec thérapeutique avec une résurgence de tuberculose sont documentés (Mikota and Maslow 2011).

Les « guidelines » suggèrent un suivi approfondi du statut d'un éléphant traité pour la tuberculose. Un test STAT PAK doit être effectué tous les deux mois pour les 6 premiers mois de traitement puis tous les 6 mois pendant le reste de la vie de l'individu. Des lavages de trompe (3 lavages en une semaine) tous les mois pendant les 6 premiers mois de traitement puis tous les 6 mois pendant le reste de la vie de l'individu sont également prévus. Un éléphant traité pour la tuberculose aux Etats-Unis sera considéré comme infecté à vie après le traitement : des rechutes post-traitements sont toujours possibles chez un éléphant qui a été traité. La mise en place d'un protocole de suivi aussi lourd permet de s'assurer qu'il n'y a pas de résurgence de la maladie.

Il est important de noter que dans certains cas, l'échec thérapeutique est lié à l'émergence pendant le traitement de résistances aux antibiotiques. Ainsi deux cas d'acquisition de résistances (une souche multi-résistante et une souche résistante à la Rifampicine) sont documentés (Lyashchenko *et al.* 2006).

Les inconnues et les difficultés qui pèsent sur le traitement des éléphants sont de nature à conduire à de mauvaises observances des traitements. La mauvaise observance répétée de traitements antibiotiques et notamment le sous-dosage et l'interruption des traitements engagés, sont sources de sélection de résistances aux antibiotiques (Afssa 2006). L'échec d'observance ou l'apparition d'effet secondaire ne sont toutefois pas systématiques.

Les résistances aux antibiotiques sélectionnées dans le cadre d'un traitement antituberculeux mal maîtrisé, du fait des nombreuses inconnues et difficultés soulevées ci-dessus, concerneraient des antibiotiques de première ligne réservés à l'Homme.

Un éléphant atteint d'une tuberculose multi-résistante ne serait plus soignable et surtout constituerait un danger important pour son entourage.

Le risque que l'usage de ces antibiotiques, dans ces conditions, engendre également des résistances sur d'autres agents pathogènes ou sur la flore commensale des éléphants, comme cela existe dans d'autres espèces d'animaux d'élevage pour d'autres antibiotiques, ne peut-être évalué ici, faute de connaissances suffisantes.



### **Conclusion concernant le traitement**

Plusieurs éléphants malades de tuberculose sont traités aux Etats-Unis, généralement suite à des cultures positives sur lavages de trompe.

Le traitement antibiotique curatif, bâti par comparaison à celui de la tuberculose humaine, repose sur une trithérapie (trois antibiotiques de première ligne) de deux mois puis une bithérapie (deux antibiotiques de première ligne) pendant 10 mois. Un traitement prophylactique allégé est également pratiqué dans certains cas sur des éléphants séropositifs (présumés infectés latents). Le Gecu déconseille formellement cette dernière option, compte-tenu de la faible sensibilité du dépistage bactériologique des individus malades chez les éléphants.

Des posologies sont documentées pour 4 antibiotiques de première ligne mais les fortes variabilités individuelles obligent, lors d'un traitement, à suivre les concentrations sanguines des principes actifs par des méthodes de dosages lourdes et coûteuses. Par ailleurs, les antibiotiques utilisés peuvent engendrer des effets secondaires suffisamment importants pour pouvoir conduire à l'interruption d'un traitement.

Le traitement antibiotique décrit aux USA est d'une extrême lourdeur, car il nécessite l'administration quotidienne d'antibiotiques mais également un grand nombre d'actes pour les différents suivis (observance, état général, suivi hématologique et biochimique). Les contacts très fréquents et très rapprochés entre personnel humain et éléphant, nécessaires à un tel traitement, entraînent à la fois un risque de contamination et un risque physique pour l'homme. Ils affectent fortement le bien-être des animaux.

L'observance des traitements antituberculeux chez les éléphants est difficile à définir du fait des nombreuses inconnues qui concernent les concentrations plasmatiques efficaces des principes actifs et les variabilités individuelles. Par ailleurs, une bonne observance est elle-même difficile à obtenir, au vu de la lourdeur du traitement et du suivi requis, des refus de traitement et des nombreux effets secondaires potentiels.

Ces deux difficultés augmentent le risque de conduire à des traitements inefficaces, aboutissant à des individus non soignés et à de possibles sélections d'antibiorésistance, à des principes actifs pour lesquels il n'existe pas de traitements alternatifs chez l'Homme.

La thérapeutique antituberculeuse telle qu'elle existe aujourd'hui est lourde à mettre en place et dangereuse pour l'éléphant et pour les manipulateurs. Les incertitudes qui l'entourent (pharmacocinétique incertaine, refus de prise par l'éléphant notamment) peuvent mener à la sélection d'antibiorésistances pour des antibiotiques de première ligne utilisés dans le traitement de la tuberculose chez l'Homme. Ces mêmes incertitudes ne permettent pas de garantir la réussite du traitement, même envisagé dans des conditions optimales de réalisation et de suivi.

### **3.6. Analyse du cahier des charges mis en place par la Direction Générale de l'Alimentation**

Au vu des connaissances sur la tuberculose chez l'éléphant présentées dans cet avis, l'Anses a identifié un certain nombre de points dans le cahier des charges établi par la DGAI sur lesquels des commentaires peuvent être effectués. L'établissement de ce cahier des charges et son évaluation par l'Anses ne permettent pas de valider d'emblée tout protocole qui en découlerait. Le respect du cahier des charges est un préalable qui devra être accompagné de l'évaluation de tout protocole visant la conservation des éléphants Baby et Népal.

Par ailleurs, tout protocole mis en place devrait être accompagné de mesures de suivi de son application et de son évaluation, à prévoir par le gestionnaire.

### 3.6.1. Suivi vétérinaire

Concernant le paragraphe « suivi vétérinaire » du cahier des charges, les points suivants sont commentés par les experts.

1. « *Un protocole détaillé de suivi médical des éléphantés devra être présenté et mis en œuvre afin de permettre de caractériser au moins tous les 3 mois l'évolution du risque d'excrétion du bacille.* »

En l'absence de connaissances suffisamment précises sur la durée d'évolution de la tuberculose chez l'éléphant, les seuls délais inter-tests envisageables découlent d'aspects organisationnels qui peuvent être liés, soit aux délais d'obtention de résultats des tests (bactériologie : 3 mois), soit à des éléments relatifs au suivi des personnes exposées.

Les tests à mettre en place sont contraignants et dangereux à la fois pour l'animal et pour les manipulateurs. Toutefois la précision du statut sanitaire des éléphants passe nécessairement par l'obtention de résultats d'analyse, à la fois en sérologie et en culture suite à lavage de trompe.

Dans le cas où toutes les analyses seraient négatives sur plusieurs dépistages, un allègement du suivi pourra être envisagé. Si en revanche, un éléphant est ou devient excréteur (positif en culture suite à lavage de trompe), le devenir de l'éléphant doit être précisé dans ce cahier des charges.

Toute dégradation de l'état général des animaux devra être signalé et entraîner, parmi les examens complémentaires, des lavages de trompe. Le suivi clinique de ces animaux ne doit pas concerner uniquement la tuberculose mais doit permettre de détecter et de traiter toute nouvelle pathologie.

2. « *Les analyses complémentaires devront être pratiquées dans un laboratoire agréé ou dans des conditions convenues avec le laboratoire national de référence de l'Anses de Maisons-Alfort et la Direction générale de l'Alimentation* »

Les experts souhaitent que soit rajoutée à ce volet l'obligation de procéder aux examens bactériologiques dans un laboratoire de niveau de confinement 3 (L3).

Pour avoir une assurance concernant la traçabilité des échantillons et la certification des résultats, le terme « analyses complémentaires » devrait comprendre à la fois les tests directs et indirects qui devraient être réalisés dans des laboratoires accrédités COFRAC.

3. « *Un suivi annuel de la tuberculose chez les autres espèces sensibles éventuellement détenues sur le même site.* »

Le Gecu ne considère pas qu'il soit pertinent de suivre la tuberculose chez les autres espèces sensibles détenues sur le même site. En effet, le « site » doit être défini comme étant l'endroit où les éléphants sont confinés, sans contact avec d'autres espèces. Auquel cas, si le cahier des charges est respecté, les éléphants seront isolés efficacement des autres animaux et le risque de transmission sera donc nul.

4. « *Un suivi du bon état de santé général des éléphantés et le cas échéant un protocole de soin.* »

Le suivi du bon état général des éléphants doit prendre en compte des considérations relatives au bien-être de ces animaux.

Les experts remarquent que le cahier des charges proposé par la DGAL ne prévoit pas de sortie des éléphants autre que la mort naturelle ou l'euthanasie. Du point de vue du bien-être de ces animaux et de leur durée de vie, est-il souhaitable d'envisager leur retour à

des conditions de détentions plus assouplies après un certain nombre de tests directs et indirects négatifs ?

### 3.6.2. Protection des soigneurs

Concernant le paragraphe « protection des soigneurs », le Gecu souhaite effectuer les remarques suivantes :

Dans le contexte des connaissances actuelles sur le statut de Baby et Népal, les mesures de protections des soigneurs doivent découler du postulat que ces éléphantés sont contagieuses.

Il est souhaitable qu'en sus de l'information sur le risque de contamination encouru ainsi que les symptômes d'appel chez l'Homme, les soigneurs et personnels interagissant avec les animaux tuberculeux soient informés sur les signes d'appel de tuberculose chez l'éléphant qui doivent conduire à alerter le vétérinaire. De plus, toute dégradation de l'état général des animaux doit conduire à pratiquer, parmi les examens complémentaires, la recherche de bacilles sur lavage de trompe dans les meilleures conditions compatibles avec leur état.

1. *« Formation à la biosécurité notamment en ce qui concerne l'utilisation des protections personnelles et du risque de contamination par le matériel ou l'environnement (litière ?). »*

Les experts renvoient au paragraphe 3.2.1 et insistent sur les différentes sources de contamination potentielles qui doivent faire l'objet de l'information du personnel : sécrétions respiratoires mais également aérosolisation des matières virulentes quelle que soit leur origine.

2. *« Protocole de suivi médical spécifique visant à détecter une contamination ou un risque d'aggravation des conséquences d'une contamination (grossesse, immunodépression...). »*

Au vu de l'existence d'une législation spécifique à la protection et à la surveillance de la tuberculose chez les travailleurs exposés, le Gecu recommande que sur ce point précis, le cahier des charges soit exhaustif et concordant avec la législation spécifique existante. Dans le cas des éléphantés de la tête d'Or et au vu des faibles connaissances sur le potentiel infectieux d'éléphants tuberculeux, le Gecu considère les travailleurs comme évoluant dans un contexte de « risque élevé » (*cf paragraphe 3.2.2*).

Par ailleurs, les personnels présentant des risques accrus pour la tuberculose (grossesse, personnes immunodéprimées) devraient être exclus de tout contact direct ou indirect avec les éléphantés.

### 3.6.3. Installations

Concernant le paragraphe « Installations », le Gecu souhaite effectuer des remarques sur les points suivants et renvoie au paragraphe 3.2.2.

1. *« être construites ou isolées de manière à interdire tout contact avec des animaux se trouvant à l'extérieur de l'enclos »*
2. *« être indépendantes et nettement séparées des locaux où sont hébergés d'autres animaux d'espèce sensibles »*
3. *« disposer d'installations permettant d'assurer le logement et l'isolement des animaux et pouvant être facilement nettoyées et désinfectées »*

Les experts rappellent que plusieurs cas de transmission de tuberculose de l'éléphant à l'Homme par le biais de la ventilation sont documentés. Il doit être précisé dans le cahier des charges que l'installation ou les salles assurant le logement et l'isolement des animaux doivent avoir un système de ventilation dédié, ne communiquant avec aucune autre installation ni pièce du même bâtiment.

Cette ventilation doit par ailleurs être équipée de systèmes de filtration appropriés.

4. *« adaptés aux besoins physiologiques de l'espèce garantissant des conditions de respect du bien être animal »*

Il n'existe pas de réglementation spécifique applicable aux conditions de détention des éléphants autres que l'arrêté du 25 mars 2004. Il existe cependant un certain nombre de recommandations qui sont publiés (EAZA 2004; CAZA 2008; AZA 2011). Le Gecu préconise de se reporter à ces publications.

5. *« prévoir les conditions de transport des animaux pour les transferts éventuels du parc de la tête d'or vers toute structure dédiée à leur prise en charge »*

Les experts recommandent de modifier le terme « prévoir » par « préciser » et d'inclure la notion de prévention du risque sanitaire. Les recommandations du Gecu figurant au paragraphe 3.2.2 du présent Avis, à propos du transport des éléphants, pourraient être reprises dans le Cahier des Charges

#### **3.6.4.Fonctionnement**

Les experts recommandent de ne pas avoir recours aux nettoyeurs haute pression qui provoquent une aérosolisation des déchets et une suspension possible dans l'air de matières virulentes.

#### **3.7. Evaluation du protocole proposé par le Dr Ollivet-Courtois pour le suivi vétérinaire des éléphantés et dans le cadre du cahier des charges**

Le protocole proposé par le Dr Ollivet-Courtois repose, sans l'adapter à la situation particulière de Baby et de Népal, sur celui décrit par les « guidelines » de l'USDA (USAHA 2010) pour des éléphants négatifs en culture sur lavage de trompe ayant été en contact avec un individu excréteur dans les 12 mois précédents.

Le protocole du Dr Ollivet-Courtois précise que les lavages de trompes sont « faisables sous sédation debout ». Les experts soulignent que la contention chimique n'est pas une alternative intéressante pour les raisons évoquées précédemment dans ce document (paragraphe 3.3.1).

Ce protocole prévoit par ordre de préférence le traitement, la mise en quarantaine sans traitement puis l'euthanasie en cas de culture ou de PCR positive. Le traitement antibiotique d'éléphants atteints de tuberculose n'est pas recommandé par le GECU pour les raisons évoquées dans le paragraphe 3.5.

Ce protocole est incomplet dans la mesure où il ne concerne que certains aspects du cahier des charges de la DGAI.

#### **3.8. Conclusions du Gecu**

Les experts reprennent ici les conclusions des différents chapitres présentés dans le paragraphe 3 de cet avis.

- Concernant le traitement d'éléphants atteints de tuberculose, les experts considèrent que la thérapeutique antituberculeuse telle qu'elle existe aujourd'hui est lourde à mettre en place et dangereuse pour l'éléphant et pour les manipulateurs. Les incertitudes qui l'entourent et les difficultés de mise en œuvre et de suivi compromettent la réussite du traitement et peuvent mener à la sélection de bacilles tuberculeux antibiorésistants, pour des antibiotiques de première ligne utilisés dans le traitement de la tuberculose chez l'Homme. Ainsi les risques de traiter des éléphants tuberculeux paraissent trop élevés par rapport à la probabilité d'un succès thérapeutique. Les experts considèrent que les traitements à visée curative ou prophylactique contre la tuberculose chez les éléphants ne doivent pas être envisagés en l'état actuel des connaissances disponibles.
- Concernant les tests directs et indirects envisageables pour préciser le statut des éléphants Baby et Népal vis-à-vis de la tuberculose, les experts recommandent l'usage du test DPP pour la recherche d'une infection tuberculeuse chez Baby et Népal. Pour évaluer la contagiosité des éléphants, les experts recommandent de procéder à des examens bactériologiques sur liquide de lavage de trompe obtenus sur animal vigile par la technique du « lavage de trompe en sac ». Cet acte devra être répété 3 fois en une semaine. Les experts précisent que ces deux tests (direct et indirect) doivent être réalisés conjointement : le recours à un test ne devra pas être conditionné au résultat de l'autre. Les experts tiennent également à souligner que cette première série de tests devra être accompagnée d'un suivi longitudinal du statut sanitaire des éléphants vis-à-vis de la tuberculose.
- Concernant le cahier des charges établi par la DGAI, les experts considèrent que le document fourni permet d'aborder l'ensemble des aspects importants pour la conservation des éléphants Baby et Népal et qu'il est compatible avec l'établissement d'un protocole viable. Quelques points méritent toutefois d'être amendés ou complétés.
  - En matière sanitaire, les remarques du Gecu visent à ce que le cahier des charges soit rédigé dans le but d'atteindre conjointement les 3 objectifs suivants : un suivi sanitaire des animaux approprié pour suivre leur statut au regard de la tuberculose, le respect de la santé des personnes exposées et le bien-être des éléphants
  - Concernant les installations, le Gecu recommande d'indiquer clairement que les éléphants doivent être maintenues dans un bâtiment fermé. Les experts demandent également que soit précisée la nécessité d'une ventilation dédiée à la salle des éléphants et ne communiquant avec aucune autre salle, au vu de la possible transmission de la tuberculose par voie aérienne.Les experts rendent un avis favorable à ce cahier des charges sous réserve des modifications à effectuer présentées dans cet avis.  
Le Gecu souligne que la validation de ce cahier des charges ne revient pas à cautionner d'emblée des protocoles qui en découleraient. Ces derniers nécessiteront à leur tour d'être validés par les autorités.
- Concernant le protocole proposé par le Dr Ollivet-Courtois, les experts remarquent qu'il ne concerne que le suivi de la tuberculose des éléphants en général et qu'il n'a pas été adapté à la situation particulière de Baby et de Népal. En outre, plusieurs volets du cahier des charges ne sont pas couverts.  
Les experts ne peuvent donc pas se prononcer sur la validité de ce protocole au regard du cahier des charges.

De plus, compte tenu des éléments apportés par l'analyse de la situation particulière de Baby et de Népal, considérant l'existence, dans d'autres pays, d'une situation sanitaire des éléphants captifs défavorable vis-à-vis de la tuberculose, et en l'absence de suivi global de cette maladie chez les éléphants en France, le Gecu souligne l'importance d'engager des travaux permettant de préciser la situation globale française en matière d'infection tuberculeuse des éléphants, afin d'analyser le risque encouru par les soigneurs et le public, dans le but de proposer des mesures de précaution appropriées. Une collaboration systématique avec la médecine du travail et les Centres de lutte antituberculeuse optimiserait le suivi des personnels exposés.

#### 4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions du Gecu.

De plus, l'Anses souligne que l'évaluation du cahier des charges et des tests utilisables ainsi que leurs conclusions doivent s'inscrire dans le contexte particulier des éléphants Baby et Népal. Ces éléments n'ont pas vocation à être appliqués en l'état à d'autres cas qui pourraient être mis en évidence sur le territoire national.

Au-delà, l'Anses souligne la nécessité de s'interroger ultérieurement sur la durabilité des conditions de maintien dans le cadre du cahier des charges, au regard des contraintes importantes qu'elles imposent et du bien-être des deux éléphants.

Le directeur général

Marc Mortureux

## MOTS-CLES

Tuberculose, éléphants, *Mycobacterium tuberculosis*, Baby, Népal, parc de la tête d'Or, tests diagnostics, traitement, cahier des charges

## BIBLIOGRAPHIE

- Arrêté du 25 mars 2004 fixant les règles générales de fonctionnement et les caractéristiques générales des installations des établissements zoologiques à caractère fixe et permanent, présentant au public des spécimens vivants de la faune locale ou étrangère et relevant de la rubrique 21-40 de la nomenclature des installations classées pour la protection de l'environnement. JORF du 01/04/2004.
- Afssa, 2006. Usage vétérinaire des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine. 214p.
- Angkawanish, T, Wajjwalku, W, Sirimalaisuwan, A, Mahasawangkul, S, Kaewsakhorn, T, Boonsri, K, Rutten, VP (2010) Mycobacterium tuberculosis infection of domesticated Asian elephants, Thailand. *Emerg Infect Dis* **16**, 1949-51.
- AZA (2011) 'AZA Standards for Elephant Management and Care.' Available at [http://www.aza.org/uploadedFiles/Conservation/Commitments\\_and\\_Impacts/Elephant\\_Conservation/ElephantStandards.pdf](http://www.aza.org/uploadedFiles/Conservation/Commitments_and_Impacts/Elephant_Conservation/ElephantStandards.pdf)
- CAZA (2008) 'CAZA Elephant care manual.' Available at <http://www.caza.ca/media/Pdf/Policies/Oct%201%202008%20english%20policies/CAZA%20Elephant%20Care%20Manual%20October%201%202008.pdf>
- CSHPF, 2003. Prévention et prise en charge de la tuberculose en France: Synthèse et recommandations du groupe de travail du CSHPF (2002-2003). *Rev Mal Resp.* 20: 7S3-7S106.
- CSHPF (2006) Enquête autour d'un cas de tuberculose, recommandations pratiques. Available at [http://cclin-sudest.chu-lyon.fr/EHPAD/EHPAD\\_recommandations/enquete\\_cshpf.pdf](http://cclin-sudest.chu-lyon.fr/EHPAD/EHPAD_recommandations/enquete_cshpf.pdf).
- Davis, M (2001) Mycobacterium tuberculosis risk for elephant handlers and veterinarians. *Appl Occup Environ Hyg* **16**, 350-3.
- Delnatte, P (2008) Etude de la tuberculose chez l'éléphant: importance en parc zoologique. Université Paul Sabatier de Toulouse.
- Dumonceaux, GA, Leger, JS, Olsen, JH, Burton, MS, Ashkin, D, Maslow, JN (2011) Genitourinary and pulmonary multidrug resistant mycobacterium tuberculosis infection in an Asian elephant (*Elephas maximus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **42**, 709-712.
- EAZA (2004) Guide d'instruction pour le bien-être des animaux en zoos, l'éléphant.

- EFSA, 2008. Annex to the EFSA Journal : opinion of the Scientific panel on animal health and animal welfare: "tuberculosis testing in deer". Scientific report on "Tuberculosis testing in deer". (Question No EFSA-Q-2006-179). Panel on animal health and animal welfare, 645: 1-34.
- Flamand, JR, Greth, A, Haagsma, J, Griffin, F (1994) An outbreak of tuberculosis in a captive herd of Arabian Oryx (*Oryx leucoryx*): diagnosis and monitoring. *Vet Rec* **134(5)**, 115-118.
- Greenwald, R, Lyashchenko, O, Esfandiari, J, Miller, M, Mikota, S, Olsen, JH, Ball, R, Dumonceaux, G, Schmitt, D, Moller, T, Payeur, JB, Harris, B, Sofranko, D, Waters, WR, Lyashchenko, KP (2009) Highly accurate antibody assays for early and rapid detection of tuberculosis in African and Asian elephants. *Clin Vaccine Immunol* **16**, 605-12.
- Hall, MR, Thoen, C (1983) Preparation of biologically active components of *Mycobacterium bovis*, using Triton X-100 or Potassium chloride. *Am J Vet Res* **44(8)**, 1602-1604.
- Haut Conseil de la santé publique. Groupe de travail de la Commission spécialisée des maladies transmissibles (2011) Tuberculose et tests de détection de l'interféron gamma. *Collection Avis et Rapports* 1-49.
- Higgins, J (2011) 'Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* cultured from elephants, Tuberculosis in elephants: Science, Myth and Beyond.' Kansas city, MO, April 5-6 2011. (APHIS Center for Animal Welfare:
- Huard, RC, Lazzarini, LC, Butler, WR, van Soelingen, D, Ho, JL (2003) PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol* **41 (4)**, 1637-50.
- Isaza, R SNT Center (Ed.) (2012) 'Tuberculosis and elephants: the "real" elephant in the room, Webinar "TB and Elephants".' College of veterinary medicine, University of Florida. Available at <http://sntc.medicine.ufl.edu/Files/News/SNTC%20Webinar%20elephant%20tuberculosis%20final%20-%20v01.pdf>
- Janssen, D, Oosterhuis, J, Fuller, J, Williams, K (2004) 'Field technique: a method for obtaining trunk wash mycobacterial cultures on anesthetized free-ranging African elephants (*Loxodonta africana*). Joint conference of the American Association of Zoo Veterinarians.'. (Wildlife Disease Association:
- Kay, MK, Linke, L, Triantis, J, Salman, MD, Larsen, RS (2011) Evaluation of DNA extraction techniques for detecting *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in Asian elephant trunk wash samples. *J Clin Microbiol* **49**, 618-23.
- Lewerin, S, Olsson, SL, Eld, K, Röken, B, Ghebremichael, S, Koivula, T, Källenius, G, Bölske, G (2005) Outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* infection among captive Asian elephants in a Swedish zoo. *Veterinary Record* **156**, 171-175.
- Lyashchenko, KP, Greenwald, R, Esfandiari, J, Mikota, S, Miller, M, Moller, T, Vogelnest, L, Gairhe, KP, Robbe-Austerman, S, Gai, J, Waters, WR (2012) Field application of serodiagnostics to identify elephants with tuberculosis prior to case confirmation by culture. *Clin Vaccine Immunol* **19**, 1269-75.
- Lyashchenko, KP, Greenwald, R, Esfandiari, J, Olsen, JH, Ball, R, Dumonceaux, G, Dunker, F, Buckley, C, Richard, M, Murray, S, Payeur, JB, Andersen, P, Pollock, JM, Mikota, S, Miller, M, Sofranko, D, Waters, WR (2006) Tuberculosis in elephants: antibody responses to defined antigens of



- Mycobacterium tuberculosis, potential for early diagnosis, and monitoring of treatment. *Clin Vaccine Immunol* **13**, 722-32.
- Maslow, J, Mikota, S, Zhu, M, Riddle, H, Peloquin, CA (2005a) Pharmacokinetics of ethambutol (EMB) in elephants. *J Vet Pharmacol Ther* **28(3)**, 321-3.
- Maslow, JN, Mikota, SK, Zhu, M, Isaza, R, Peddie, LR, Dunker, F, Peddie, J, Riddle, H, Peloquin, CA (2005b) Population pharmacokinetics of isoniazid in the treatment of Mycobacterium tuberculosis among Asian and African elephants (*Elephas maximus* and *Loxodonta africana*). *J Vet Pharmacol Ther* **28**, 21-7.
- Michalak, K, Austin, C, Diesel, S, Bacon, MJ, Zimmerman, P, Maslow, JN (1998) Mycobacterium tuberculosis infection as a zoonotic disease: transmission between humans and elephants. *Emerg Infect Dis* **4**, 283-7.
- Mikota, S (2008) Tuberculosis in elephants. In 'Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy, 6th Edition (M. E. Fowler and R. E Miller, eds.)' (Ed. Saunders.) pp. 355-364. Saint Louis, MO)
- Mikota, SK, Maslow, JN (2011) Tuberculosis at the human-animal interface: an emerging disease of elephants. *Tuberculosis* **91**, 208-11.
- Mikota, SK, Peddie, L, Peddie, J, Isaza, R, Dunker, F, West, G, Lindsay, W, Larsen, RS, Salman, MD, Chatterjee, D, Payeur, J, Whipple, D, Thoen, C, Davis, DS, Sedgwick, C, Montali, RJ, Ziccardi, M, Maslow, J (2001) Epidemiology and diagnosis of Mycobacterium tuberculosis in captive Asian elephants (*Elephas maximus*). *J Zoo Wildl Med* **32**, 1-16.
- Morar, D, Tijhaar, E, Negrea, A, Klos, H, Hendriks, J, van Rhijn, I, Godfroid, J, Michel, A, Rutten, VP (2007) 'Development of an ELISA for the detection of Interferon-gamma (IFN-g) as a diagnostic tool for tuberculosis in elephants., VII EWDA Congress.' Greece.
- Murphree, R, Warkentin, JV, Dunn, JR, Schaffner, W, Jones, TF (2011) Elephant-to-human transmission of tuberculosis, 2009. *Emerg Infect Dis* **17**, 366-71.
- Pavlik, I, Yayo Ayele, W, Parmova, I, Melicharek, I, Hanzlikova, M, Svejnochova, M, Körmendy, B, Nagy, G, Cvetnic, Z, Katalinic-Jankovic, V, Ocepek, M, Zolnir-Dovc, M, Lipiec, M, Havelkova, M (2003) Mycobacterium tuberculosis in animal and human populations in six Central European countries during 1990-1999. *Veterinarni Medicina* **48**, 83-89.
- Peloquin, CA, Maslow, JN, Mikota, SK, Forrest, A, Dunker, F, Isaza, R, Peddie, LR, Peddie, J, Zhu, M (2006) Dose selection and pharmacokinetics of rifampin in elephants for the treatment of tuberculosis. *J Vet Pharmacol Ther* **29**, 581-5.
- Sutherland, I (1968) The ten-year incidence of clinical tuberculosis following "conversion" in 2550 individuals aged 14 to 19 years old. The Hague.
- Une, Y, Mori, T (2007) Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **30**, 415-25.
- USAHA, DRAFT for Guidelines for the control of tuberculosis in Elephants 2012.
- USAHA (2010) 'Guidelines for the control of tuberculosis in elephants 2010.' Available at [http://www.aphis.usda.gov/animal\\_welfare/index.shtml](http://www.aphis.usda.gov/animal_welfare/index.shtml)
- Zhu, M, Maslow, JN, Mikota, SK, Isaza, R, Dunker, F, Riddle, H, Peloquin, CA (2005) Population pharmacokinetics of pyrazinamide in elephants. *J Vet Pharmacol Ther* **28**, 403-409.

## **Annexe 1. Cahier des charges pour un protocole de conservation de Baby et de Népal (DGAI)**

Un protocole de conservation des éléphants Baby et Népal d'initiative privée qui proposerait le maintien en vie des éléphants Baby et Népal devrait présenter des garanties minimales de maîtrise des points suivants, sans préjudice des réglementations en vigueur applicables par ailleurs.

### A. Suivi vétérinaire

- Les animaux devront être placés en permanence sous la supervision d'un vétérinaire sanitaire compétent dans le domaine de la faune sauvage captive ;
- Un protocole détaillé de suivi médical des éléphants devra être présenté et mis en œuvre afin de permettre de caractériser au moins tous les 3 mois l'évolution du risque d'excrétion du bacille ;
- Les analyses complémentaires devront être pratiquées dans un laboratoire agréé ou dans des conditions convenues avec le laboratoire national de référence de l'Anses de Maisons-Alfort et la Direction générale de l'Alimentation ;
- Un suivi annuel de la tuberculose chez les autres espèces sensibles éventuellement détenues sur le même site ;
- Un suivi du bon état de santé général des éléphants et le cas échéant un protocole de soin ;
- En cas de mort des animaux il devra être procédé à leur autopsie et aux examens post-mortem nécessaires à un diagnostic de tuberculose.

### B. Protection des soigneurs

Le protocole de conservation doit présenter des garanties relatives à la protection de la santé des personnes en contact avec les éléphants et les matériaux potentiellement contaminés. Ces garanties doivent porter à minima sur les points suivants :

3. Information sur le risque de contamination encouru ;
4. Formation à la biosécurité notamment en ce qui concerne l'utilisation des protections personnelles et du risque de contamination par le matériel ;
5. Protocole de suivi médical spécifique visant à détecter une contamination ou un risque d'aggravation des conséquences d'une contamination (grossesse, immunodépression...);
6. Certificat d'aptitude délivré par un médecin du travail et incluant un diagnostic initial de tuberculose.

### C. Installations

Les installations où les animaux seraient conservés doivent répondre à minima aux conditions suivantes visant à minimiser le risque de contamination environnementale :

- être construites ou isolées de manière à interdire tout contact avec des animaux se trouvant à l'extérieur de l'enclos ;
- être indépendantes et nettement séparées des locaux où sont hébergés d'autres animaux d'espèce sensibles;

- disposer d'installations permettant d'assurer le logement et l'isolement des animaux et pouvant être facilement nettoyées et désinfectées
- pouvoir être fermé à clé et à empêcher l'accès aux personnes non autorisées
- adaptés aux besoins physiologiques de l'espèce garantissant des conditions de respect du bien être animal
- disposer des locaux dédiés annexes nécessaires (vestiaires , stockage aliments, stockage matériel, poste de nettoyage désinfection...)

#### D. Fonctionnement

Les conditions de fonctionnement doivent prévoir les éléments suivants :

- Documentation technique qui intègre notamment les éléments descriptifs suivants :
  - la description détaillée et plan d'ensemble des installations affectées à l'hébergement, à l'entretien des animaux et à la gestion de leurs effluents
  - la description des équipements et du matériel utilisés ;
  - la description des conditions de fonctionnement et des différents circuits ;
- Protocole de gestion des effluents et des déchets alimentaires conformes aux prescriptions du Règlement 1069/2009 concernant les matières de catégorie 2 ;
- Protocole de nettoyage et de désinfection des installations et du matériel ;
- Plan de lutte contre les animaux indésirables ;
- Surveillance empêchant l'entrée de toute personne non autorisée et tenue d'un registre des entrées et des sorties ;
- Adresser un rapport annuel de suivi médical et vétérinaire à la direction départementale en charge de la protection des populations
- Se soumettre à toute inspection initiée par les services de l'Etat.

#### E. Financement:

- la mise en œuvre de ce protocole est subordonné à l'engagement écrit du détenteur et propriétaire de le respecter scrupuleusement et d'en assumer la charge financière.
- Une assurance en responsabilité civile devra en outre être souscrite pour couvrir toute indemnisation de contentieux privés qui pourrait survenir à la suite notamment de contamination humaines.

Si le suivi vétérinaire met en évidence une excrétion active de bacilles tuberculeux, il devra être procédé à l'euthanasie des animaux.

## Annexe 2. Protocole établi par le Dr Ollivet-Courtois transmis au ministère de l'agriculture

**1.1/** Coloration, Culture et PCR sur sécrétions respiratoires dans la trompe réalisé sur animal entraîné 3 fois à une semaine d'intervalle. Le lavage de trompe est effectué tous les 3 mois pendant 1 an. Puis tous les 6 mois pendant 2 ans puis annuellement. Les personnes qui procèdent à l'examen sont protégées par des lunettes, des gants, un masque protégeant de la contamination tuberculeuse, une tunique jetables avec capuche et sur bottes jetables. En l'absence de personnel compétent au zoo pour procéder à l'entraînement des animaux, on pourra confier l'entraînement à du personnel extérieur qualifié et autorisé par le préfet à rentrer en contact protégé avec les éléphants (une liste de noms à été fournie par la fondation Bardot), ou à des prélèvements sous sédation debout. L'USDA précise que l'entraînement prend entre 2 et 4 semaines. Les analyses sont confiées à l'ANSES.

**1.2/** À chaque intervention pour les prélèvements directs (donc tous les 3 mois), sont réalisées des prises de sang pour des tests sérologiques avec un Elephant TB StatPack® du laboratoire Chembio (sensibilité 98 %, spécificité 95 %). En l'absence de test ELEPHANT STATPAK®, le dépistage se fait avec les tests Elephant DualPathPlatform ® (DPP, sensibilité et spécificité très élevées et remplaçant le test MAPIA ). Les tests sérologiques Elephant STATPAK® et / ou DPP® sont réalisés soit par le docteur Alexis Lécu, responsable européen du TB Working group, soit par l'ANSES, sur place ou après acheminement sous scellées.

**2.1/** Si une culture ou une PCR est positive :

A. Traitement :

C'est l'option à préférer pour les éléphants à la culture positive lorsque c'est possible. Le protocole de traitement doit être achevé en 15 mois

B. Quarantaine sans traitement

Cette option peut être envisagée spécialement pour les animaux qui sont déjà hébergés seuls et qui ne sont pas considérés comme de bons candidats au traitement (mâles)

C. Euthanasie

Cette option peut être envisagée pour les animaux cliniquement malades, ou qui ne peuvent pas être traités ou encore pour d'autres motifs à la discrétion du clinicien.

l'animal pourra soit être traité, soit rester à l'isolement, soit être euthanasié.

**2.2/** Si la PCR/culture est négative : on procède à un test DDP®.

- Si un test DDP® est négatif, retour au 1.1+1.2.
- Si le DPP ® est positif, retour au 1.1+1.2 mais le suivi doit durer 3 ans.

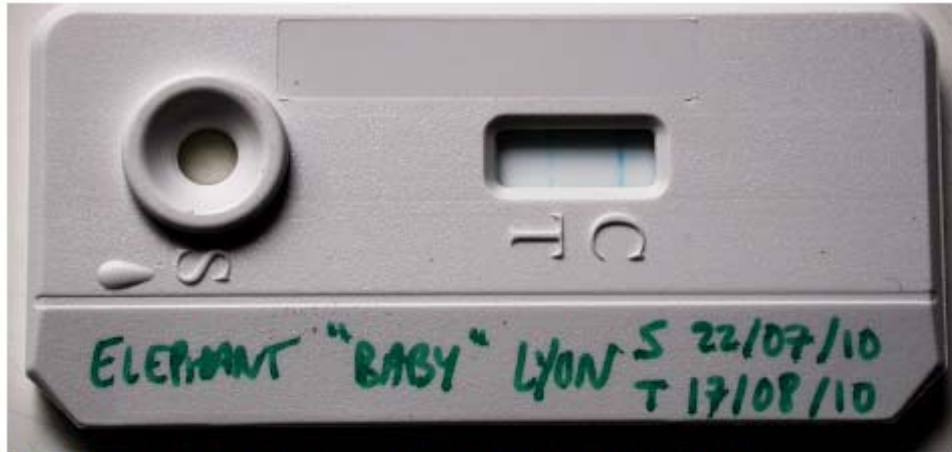
### 1.2 1.1

### 2.2 2.1

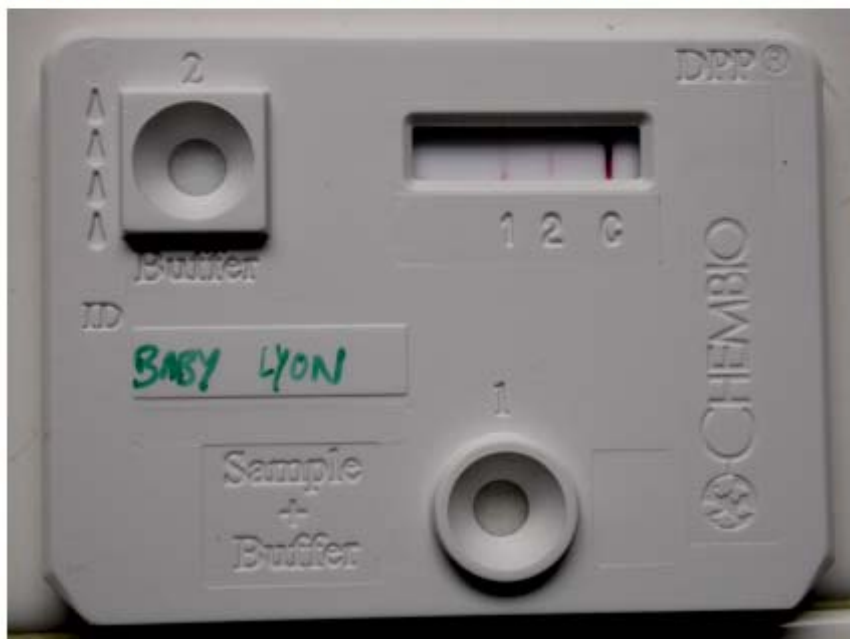
#### Références bibliographiques :

- « Tuberculosis in Elephants: Antibody Responses to Defined Antigens of Mycobacterium tuberculosis, Potential for Early Diagnosis, and Monitoring of Treatment ». **2006**. Lyashchenko KP, Greenwald R, Esfandiari J, Olsen JH, Ball R, Dumonceaux G, Dunker F, Buckley C et al. Clinical and Vaccine Immunology, 13(7) :722-732.
- “Highly accurate antibody assays for early and rapid detection of tuberculosis in African and Asian éléphants ». **2009**. Greenwald R., Lyaschchenko K.P., Esfandiari, J. & al. Clinical and Vaccine Immunology16(5) : 605-612.
- « Field Application of Serodiagnosis to identify Elephants with Tuberculosis prior to case confirmation by culture ». **2012**. Lyaschchenko KP, GreenwaldR, Esfandiari JE, Mikota S ; Miller M, Moller T, Vogelnest L, Gairhe KP, Robbe Austerman SR, Gai J, Waters R. Clinical and Vaccine Immunology19 (8) : 1269-1275
- « Serodiagnosis of Tuberculosis in Asian Elephants (Elephas maximus) in Southern India : a latent class analysis ». 2012. Verma-Kumar S, Abraham D, Dendukuri N, Cheeran JV, Sukumar R, Balaji KN. Plos One 7(11) e49548: 1-8.

Annexe 3 : Photos des tests effectués sur Baby et Népal en 2010



STATPAK Baby réalisé le 17/08/10 sur un prélèvement du 22/07/10



DPP Baby réalisé le 17/08/10 sur un prélèvement du 22/07/10



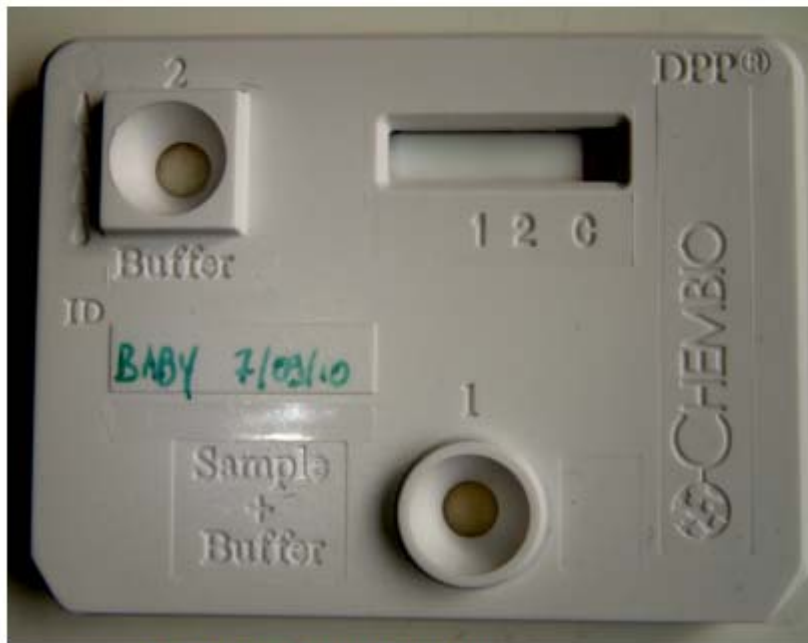
STAT PAK Nepal réalisé le 17/08/10 sur un prélèvement du 22/07/10



DPP Nepal réalisé le 17/08/10 sur un prélèvement du 22/07/10



DPP Nepal réalisé le 07/09/10

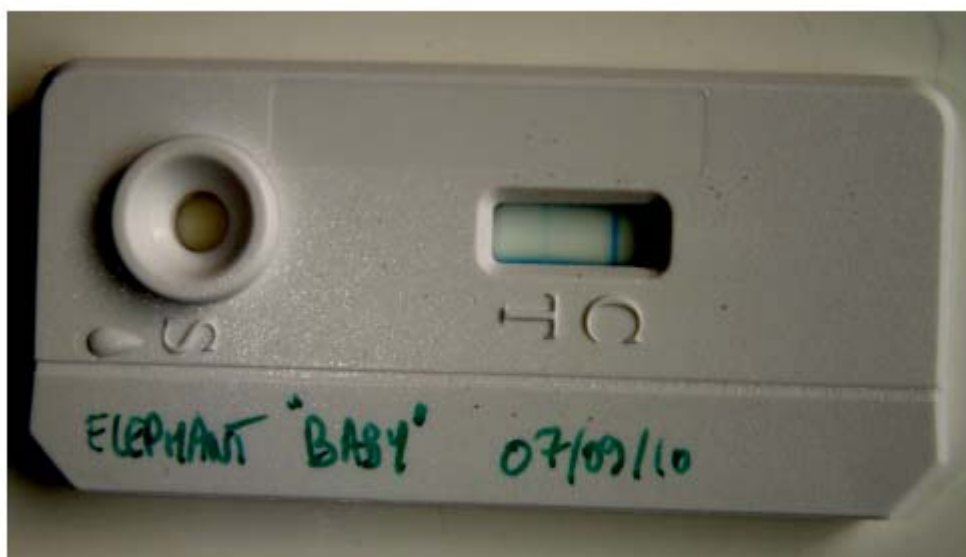


DPP Baby réalisé le 07/09/10





STAT PAK Nepal 07/09/10 fait le 29/09/10



STAT PAK Baby 07/09/10 fait le 29/09/10

**Annexe 4 : Note intermédiaire du 22/02/2013**

---

**Demande d'information relative au dépistage de la  
tuberculose chez deux éléphants en captivité**

---

**Questions intégrées à la  
saisine « 2013-SA-0029 »**

**Note intermédiaire**

**Février 2013**

## Contexte

L'Anses a été saisie le 18 février 2013 par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) pour la réalisation de l'expertise suivante : saisine relative à une suspicion de tuberculose chez deux éléphants en captivité.

La situation sanitaire des deux éléphants, Baby et Népal, détenus dans le Parc municipal de la Tête d'Or à Lyon et suspects de tuberculose fait aujourd'hui l'objet de débats. Ces éléphants, confiées en 1999 au parc par leur actuel propriétaire, le cirque Pinder, ont été détenues avec une autre éléphante, Java, déjà présente dans le Parc et décédée en août 2012.

En décembre 2012, la préfecture du Rhône a ordonné l'euthanasie de Baby et Nepal suite à la confirmation de la maladie chez l'éléphante Java. La mobilisation des associations de protection animale et du Cirque Pinder a conduit à une suspension de l'exécution de cette décision et à un recours auprès du tribunal administratif de Lyon puis d'un appel auprès du Conseil d'Etat.

Compte tenu de la valeur sociétale de ces animaux, une alternative à leur euthanasie est envisagée. Le ministère de l'agriculture a élaboré un cahier des charges que devrait respecter toute initiative privée pour le maintien en vie des deux animaux, au travers d'un protocole de conservation approprié. Ce cahier des charges décrit les éléments minimaux à respecter en matière de suivi sanitaire, de protection des soigneurs et de confinement des animaux, sans préjudice des réglementations en vigueur, applicables par ailleurs.

Une ébauche de protocole de suivi, établi par la vétérinaire du cirque Pinder, le docteur Florence Ollivet-Courtois, a été soumis au ministère de l'agriculture par la présidente d'honneur de la fédération mondiale du cirque, Madame Stéphanie de Monaco, et transmis à la direction générale de l'alimentation.

L'agence a été sollicitée sur trois points pour lesquelles une réponse est attendue pour le 01 mars 2013:

4. Le ministère de l'agriculture, s'il écarte la possibilité de mettre en place un traitement curatif, souhaite connaître la position de l'Anses sur cette question.
5. Le cahier des charge élaboré par le ministère de l'agriculture (annexe 1) est-il considéré comme adapté à la situation et quelles éventuelles modifications seraient pertinentes ?
6. Quels commentaires peuvent être émis sur le protocole de suivi proposé au ministère de l'agriculture (annexe 2) par le Dr Florence Olivier-Courtois ?

En addition à cette saisine, le 20 février 2013 la DGAI a sollicité l'expertise de l'Anses sur les tests de dépistage de la tuberculose qui pourraient être mis en œuvre pour accélérer le diagnostic de la maladie. La DGAI a précisé l'urgence de cette nouvelle requête, souhaitant une réponse anticipée au 22 février 2013. Les questions précises posées à l'Anses sont :

3. Est-il recommandé d'entreprendre un diagnostic indirect à partir d'un prélèvement de sang obtenu sous sédation ou sous anesthésie, avec quelles méthodes et dans quel laboratoire ? Dans quels délais les résultats seraient-ils disponibles ?
4. Est-il recommandé d'entreprendre un diagnostic direct à partir d'un liquide de lavage de trompe obtenu sous anesthésie, avec quelles méthodes et dans quel laboratoire ? Dans quels délais les résultats seraient-ils disponibles ?

## 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) ».

L'expertise collective a été réalisée par le groupe d'expertise collective d'urgence (Gecu) « Tuberculose éléphants » entre le 18 février et le 22 février 2013. Ce Gecu a été créé dans le cadre de la saisine 2013-SA-0029, relative à une suspicion de tuberculose chez deux éléphants en captivité.

Le Gecu s'est réuni par voie téléphonique le 21 février 2013 et a débattu à cette réunion des questions portant sur le dépistage posées par la DGAI. Une note intermédiaire a été soumise le 21 février 2013 et validée par le président du Gecu le 22 février 2013.

Les éléments de réponse donnés ci-dessous reflètent la position du Gecu « Tuberculose éléphants » créé en réponse à la saisine 2013-SA-0029 et consulté en urgence sur ces questions précises le 20 février 2013. Toutefois, le Gecu se réserve la possibilité de compléter ces éléments dans l'Avis final, à la suite du traitement complet de la saisine.

## Réponse aux questions concernant le dépistage

Pour l'ensemble des méthodes présentées, les prélèvements doivent être effectués par un vétérinaire.

### Méthodes de recherche directe de *M. tuberculosis*

La méthode de référence retenue par les, « guidelines for the control of tuberculosis in elephants » de l'USAHA/APHIS aux Etats-Unis (USAHA, 2010) est la mise en culture de sécrétions respiratoires obtenues par lavage de trompe avec sac. Ce procédé consiste à injecter 60 ml de sérum physiologique stérile dans la trompe de l'éléphant, à faire lever la trompe le plus haut possible puis à faire expulser le liquide que l'on récupère dans un sac stérile. Vingt ml sont récupérés en flacon stérile sur lesquels l'examen microscopique direct, la mise en culture et la PCR sont possibles (Mikota and Maslow 2011). Cette méthode nécessite un entraînement préalable de l'animal pendant plusieurs semaines et éventuellement une contention. Ce lavage doit être répété plusieurs fois (3 fois sur 7 jours) pour améliorer la sensibilité globale du test.

L'acte de prélèvement peut s'avérer dangereux pour le manipulateur, surtout sur des animaux peu dociles (Mikota and Maslow 2011). La procédure du lavage doit être absolument respectée (surtout l'élévation de la trompe après injection) : si l'individu n'inspire pas le liquide, seule les parties distales de la trompe sont rincées et non les voies respiratoires supérieures.

L'acte de lavage de trompe peut être effectué sous anesthésie générale (Janssen *et al.* 2004), éventuellement sous sédation debout mais pas de façon répétée, car la répétition à courts intervalles de contention chimique est dangereuse pour l'animal. Par ailleurs, en sédation, les liquides de lavages pénètrent moins loin que si l'animal inspire de façon volontaire. Ils ne passent pas par les voies respiratoires supérieures ; le lavage est limité aux parties distales de la trompe. Le prélèvement est donc moins pertinent sous sédation.

Les tests directs (examen microscopique après coloration de Ziehl-Neelsen, PCR, mise en culture) qui peuvent être mis en œuvre sur un échantillon de liquide de lavage de trompe ne nécessitent que l'utilisation de réactifs disponibles en France. Ils peuvent être réalisés en laboratoire de microbiologie agréé, de préférence au Laboratoire National de Référence qui dispose des moyens de génotypage permettant de caractériser la souche en cause, en cas de culture positive.

### Méthodes de recherche indirectes

La recherche indirecte d'une contamination tuberculeuse consiste en une exploration des réponses immunitaires cellulaires et humorales déclenchées au cours de l'infection par la mycobactérie.

Les outils pour explorer les réactions d'immunité cellulaire chez l'éléphant ne sont pas encore validés : l'intradermotuberculination a été utilisée sur les éléphants de parcs zoologiques et de cirques aux Etats-Unis jusqu'au début des années 2000 mais semble peu sensible même sur des animaux excréteurs. Les « Guidelines » USAHA/APHIS/USDA (USAHA, 2010) recommandent de ne pas utiliser ce test.

Les tests interféron gamma disponibles pour les animaux (Bovigam®, Primagam®, par exemple) ne sont pas utilisables en l'état chez l'éléphant car ils doivent être modifiés pour permettre la détection de l'interféron gamma de cette espèce (Morar *et al.* 2007).

Il existe plusieurs tests de recherche d'infection tuberculeuse basés sur la réponse immunitaire humorale qui sont utilisables chez l'éléphant. Deux tests sont commercialisés : le test Dual Path Platform VetTB assay (DPP) et le test Elephant TB STAT PAK (STAT PAK). A noter qu'un test ELISA est pratiqué par le National Reference Laboratory, CIDC de Lelystad aux Pays Bas. Mais celui-ci n'est pas commercialisé sous forme de kit disponible en France.

Le test commercial Elephant TB STAT PAK (ChemBio Inc, Medford, NY) est un basé sur la technologie « lateral flow ». Il s'agit d'une cassette contenant une feuille de cellulose. Le sérum déposé sur cette bande migre par capillarité vers une première bande sur laquelle les anticorps sont conjugués à des billes de latex de couleur bleue (Lyashchenko *et al.* 2006; Lyashchenko *et al.* 2012). La deuxième bande du test contient un cocktail d'antigènes de Mycobactéries (un panel choisi pour être notamment spécifique des mycobactéries du complexe *tuberculosis*) sur lequel les anticorps conjugués spécifiques de ces antigènes se fixent, colorant cette bande en bleu. Ce test est présenté comme disposant d'une sensibilité et d'une spécificité proches de 100% par rapport à la mise en culture suite à un lavage de trompe (Lyashchenko *et al.*, 2012) .

Le Dual Path Platform (DPP) VetTB assay (ChemBio Inc, Medford, NY) est basé sur la révélation par des particules d'or couplées à des protéines A/G (ces protéines sont capables de se fixer aux IgG) de la fixation d'IgG sur deux bandes : T1 (Ag MPB83) et T2 (Ag CFP10/ESAT-6). Le test est positif si au moins une des deux bandes est positive (Greenwald *et al.*, 2009). Le résultat est obtenu par une lecture identique à celle du STAT PAK, à laquelle on peut éventuellement ajouter une valeur semi-quantitative en mesurant l'intensité de coloration des bandes par une lecture optique de la réflectance (Greenwald *et al.* 2009). Les qualités de sensibilité et de spécificité de ce test sont équivalentes à celles du STAT PAK, qui repose sur les mêmes antigènes (Greenwald *et al.*, 2009).

Ces deux kits commerciaux ont été mis au point et sont vendus aux Etats-Unis. Aujourd'hui, seul le test DPP est immédiatement disponible en France. Le test STAT PAK est en cours de réajustement aux Etats-Unis, suite à un changement de fournisseur d'un des composants. Sa disponibilité est ainsi suspendue pour plusieurs mois (en attente de sa re-validation chez l'éléphant par l'USDA aux Etats-Unis).

## Conclusions sur l'utilisation des tests pour les éléphantés Baby et Népal

En ce qui concerne la mise en place d'examen complémentaires pour documenter davantage le statut sanitaire des éléphantés du Parc de la Tête d'Or, les experts proposent la mise en place simultanée de tests indirects et directs.

Les tests indirects présentant les meilleures sensibilités et spécificités sont les deux tests commercialisés par le laboratoire Chembio : Elephant TB STAT PAK et DPP. Il s'avère que seul l'un de ces deux tests est aujourd'hui directement disponible : le test DPP.

Les recherches directes de *M. tuberculosis* seront effectuées à partir de lavages de trompe avec un examen microscopique après coloration de Ziehl-Neelsen, une mise en culture sur milieu spécifique. Une amplification par PCR pourra être réalisée sur le prélèvement en tenant compte des difficultés liées à la présence probable d'inhibiteurs de la réaction dans l'échantillon. Les experts recommandent que les lavages de trompe soient effectués sur animal vigile et entraîné, à raison de trois lavages sur une semaine par la méthode dite du « lavage en sac ». Les experts sont conscients des contraintes de délais imposées par cette méthode du fait du nécessaire entraînement préalable des éléphants aux lavages de trompe mais soutiennent ce choix pour deux raisons :

- Un lavage unique sous sédation aurait un impact très négatif sur la sensibilité de la méthode comparé à trois lavages sur animal vigile.
- Le risque important représenté par trois sédations répétées en une semaine pour un éléphant et pour le personnel opérant la procédure, ce qui interdit d'envisager ce procédé.

Les tests indirect (DPP) et direct (examens bactériologique ou PCR sur liquide de lavages de trompe) seront interprétés en concomitance, afin d'améliorer l'information obtenue : le DPP informe sur l'état infecté de l'individu, mais le statut infecté ne signifie pas systématiquement que l'animal est ou deviendra excréteur. La recherche du pathogène informe sur l'excrétion du bacille et donc la contagiosité de l'individu. La culture bactérienne permet aussi, si elle est positive, d'étudier le génotype du bacille tuberculeux et sa sensibilité aux antibiotiques. Il ne paraît pas pertinent de conditionner l'utilisation d'un test aux résultats de l'autre test.

Les actes de prélèvement (prises de sang et lavages de trompes) devront être effectués par un vétérinaire. Les tests (DPP, PCR et bactériologie) seront réalisés par le Laboratoire National de Référence « tuberculose » au laboratoire de santé animale de Maisons-Alfort de l'Anses.

Au vu du protocole proposé, les résultats des différents tests peuvent être obtenus après des délais différents. Le test DPP peut être mis en place rapidement et ne nécessite pas de délai particulier. Les lavages de trompe nécessiteront un entraînement préalable des éléphantés de plusieurs semaines à quoi il faudra ajouter le délai de rendu des analyses d'une semaine pour les PCR et de trois mois pour les cultures (durée maximale de culture pour déclarer le prélèvement négatif).

Le choix de réaliser des tests complémentaires ne remet pas en question les résultats des tests obtenus lors des prélèvements effectués en 2010. Seul le test DPP a été ajusté par le laboratoire Chembio depuis 2010 : les tests DPP réalisés en 2010 ont été pratiqués avec des unités de tests alors expérimentales ; depuis, le laboratoire Chembio a ajusté ce produit afin qu'il puisse finalement obtenir une validation par l'USDA fin 2012. C'est donc cette version validée qu'il convient d'utiliser dans le cas présent.

L'interprétation qui sera faite des nouvelles analyses devra prendre en compte les résultats de l'ensemble des tests effectués en 2010. Si des sérums issus des

prélèvements de Baby et Nepal de 2010 sont toujours disponibles, les experts proposent que ces prélèvements soient testés à nouveau par le test DPP actuel, au vu des ajustements que ce test a subi depuis 2010, ceci sous réserve du respect des conditions de conservation des sérums en dessous de -18°C. En effet, des études rétrospectives sur sérothèques ont été réalisées sur des sérums conservés durant une période supérieure à 5 ans, ce qui indique une bonne conservation des anticorps (Greenwald *et al*, 2009).

Les résultats de ces tests seront interprétés avec discernement :

- Un test DPP positif est en faveur d'un état infecté de l'éléphant (bonne spécificité) mais un résultat négatif ne sera pas conclusif compte tenu de la sensibilité du test et de l'existence éventuelle d'une phase anergique au moment du prélèvement ;
- Si la culture est positive sur le lavage de trompe, cela signifie que l'éléphant est atteint de tuberculose et qu'il est contagieux (excrétion du bacille par l'individu). En revanche, des résultats négatifs, ne pourront pas être conclusifs au vu de la faible sensibilité de la méthode.

La tuberculose est une maladie à évolution lente pour laquelle les connaissances chez l'éléphant sont parcellaires et dont l'excrétion est considérée unanimement comme intermittente. En fonction des résultats de la première série de tests telle que présentée ici, un suivi sanitaire longitudinal devra être envisagé.