



HAL
open science

Evaluation de nouveaux outils de diagnostic de la tuberculose bovine : Conditions d'utilisation d'un test de dosage d'IFN γ et d'un test PCR IS6110 en temps réel

Sandy Faye

► To cite this version:

Sandy Faye. Evaluation de nouveaux outils de diagnostic de la tuberculose bovine : Conditions d'utilisation d'un test de dosage d'IFN γ et d'un test PCR IS6110 en temps réel. Médecine vétérinaire et santé animale. AgroParisTech, 2010. Français. NNT : 2010AGPT0056 . pastel-00541997

HAL Id: pastel-00541997

<https://pastel.hal.science/pastel-00541997>

Submitted on 1 Dec 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N°:



Doctorat ParisTech

THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

**L'Institut des Sciences et Industries
du Vivant et de l'Environnement**

(AgroParisTech)

Spécialité : Sciences de la Vie et Santé

présentée et soutenue publiquement par

Sandy FAYE

le 06 octobre 2010

**EVALUATION DE NOUVEAUX OUTILS DE DIAGNOSTIC
DE LA TUBERCULOSE BOVINE :**

**Conditions d'utilisation d'un test de dosage d'IFN γ et
d'un test PCR IS6110 en temps réel**

Directeur de thèse : **Jean-Jacques BENET**

Co-directeur de thèse **Bruno GARIN-BASTUJI**

JURY

M. Jean-Jacques BENET , Professeur, Unité Epidémiologie des Maladies Animales Infectieuses, ENVA,	Examinateur
Mme María-Laura BOSCHIROLI , Chargée de Recherche, Unité Zoonoses Bactériennes, ANSES,	Examinateur
M. Olivier CERF , Professeur Emérite, Unité Epidémiologie et Analyse des risques, ENVA,	Examinateur
M. Bruno GARIN-BASTUJI , Directeur de Recherche, Unité Zoonoses Bactériennes, ANSES,	Examinateur
M. Jacques GODFROID , Professeur, Norwegian School of Veterinary Science,	Rapporteur
M. Jacques GUILLOT , Professeur, Unité Parasitologie et Maladies parasitaires, ENVA,	Président
M. Jean-Louis MOYEN , Directeur, Laboratoire Départemental, Conseil Général de la Dordogne,	Membre invité
M. Claude SAEGERMAN , Professeur, Unité Epidémiologie et Analyse des risques, Université de Liège,	Rapporteur
Mme Jaqueline VIALARD , Directrice, Laboratoire de Niort, ANSES,	Examinateur

**AgroParisTech
ENVA, Unité Epi-MAI**

ANSES, Laboratoire Santé Animale (ex AFSSA/Lerpaz), Unité Zoonoses Bactériennes
23, avenue du Général de Gaulle 94 706 MAISONS-ALFORT Cedex

Je tiens à remercier en tout premier lieu Monsieur Jean-Jacques Béné, Professeur de l'unité Epidémiologie des Maladies Animales Infectieuses (unité Epi-MAI, *ex* unité des Maladies Contagieuses) de l'ENVA et Monsieur Bruno Garin-Bastuji, Directeur de Recherche, Chef de l'unité des Zoonoses Bactériennes du Laboratoire Santé de Animale de l'ANSES (anciennement le Lerpaz de l'Afssa-Alfort), pour avoir bien voulu accepter de diriger cette thèse. Leur rigueur scientifique a été indispensable au bon déroulement de cette thèse.

Mes remerciements vont également à Madame Maria-Laura Boschioli, Chargée de Recherche, de l'Equipe des Mycobactéries de l'unité des Zoonoses Bactériennes du Laboratoire Santé de Animale de l'ANSES et Monsieur Jean-Louis Moyen, Directeur du Laboratoire Départemental d'Analyse et de Recherche (LDAR) de la Dordogne, pour m'avoir encadrée tout au long de ces années de thèse.

Laura, je vous remercie pour la gentillesse, la grande disponibilité malgré la distance et «l'amitié» dont vous avez fait preuve envers moi, et pour avoir su me soutenir dans les moments les plus difficiles de ce travail... Cette thèse n'aurait jamais pu arriver à son terme sans vous. Soyez assurée, de mon profond respect et de ma sincère amitié. Je ne vous remercierai jamais assez...

Je remercie également Monsieur Moyen qui a été à l'origine de ce projet de recherche. Sans lui, cette thèse n'aurait pu commencer. Ses compétences, sa motivation et ses conseils avisés ont été précieux.

J'exprime également ma plus profonde gratitude à Monsieur Jacques Godfroid, Professeur à l'Ecole Norvégienne des Sciences Vétérinaires et à Monsieur Claude Saegerman, Professeur à l'Université de Liège, responsable de l'unité Epidémiologie et Analyse des risques, pour avoir pris en charge la difficile tâche d'être rapporteurs de ce travail.

Mes remerciements vont également à Madame Jaqueline Vialard, Directrice du Laboratoire de Niort, ANSES, à Monsieur Olivier Cerf, Professeur Emérite de l'unité Epidémiologie et Analyse des risques de l'ENVA et à Monsieur Jacques Guillot, Professeur de l'unité Parasitologie et Maladies Parasitaires de l'ENVA, qui ont acceptés d'être examinateurs de ma thèse.

Votre présence à ce jury est pour moi un honneur.

Je tiens aussi à remercier tous les membres de mon comité de pilotage de thèse : Monsieur Olivier Cerf, Madame Barbara Dufour, Professeur Directrice de l'unité Epi-MAI de l'ENVA, Monsieur Benoît Durand, Chargé de Recherche, de l'unité d'Epidémiologie du Laboratoire Santé de Animale de l'ANSES, Monsieur Marc Govaerts, Chercheur au Centre d'Etude et de Recherches Vétérinaires et Agronomiques (CERVA, Belgique), Monsieur Nicolas Keck, Chef de Service du Laboratoire Vétérinaire départemental de l'Hérault, Monsieur Karl Walravens, Chercheur au CERVA, ainsi que mes directeurs et encadrants de thèse.

J'adresse mes remerciements au Conseil Général de la Dordogne pour son accueil au sein du LDAR en tant qu'agent contractuel de thèse de janvier 2007 à juin 2010. Je remercie en particuliers Monsieur Bernard Cazeau, Président du Conseil Général et Monsieur Jean-Louis Moyen, Directeur du LDAR. Mes remerciements les plus chaleureux à l'ensemble de

mes collègues du LDAR et plus particulièrement aux services du secteur Santé Animale, grâce auxquelles ce travail a pu être réalisé dans d'excellentes conditions : le service PCR (Sandrine, Steph, Isabelle et Laure), le service Aide au Diagnostic (Charly, Fabienne, Gérard, Jérôme, Laurent, Pascal, Stéphan) et le service Immuno-sérologie (Armelle, Carole, Gatienne, Maïté, Michel, Patricia, Sabine).

Sandrine, Steph et Michel, merci pour votre soutien inconditionnel qui m'a permis de surmonter les moments de difficultés au cours de ma thèse. Mathieu, merci pour tes conseils d'ancien doctorant. Salima, on s'est connu la dernière année, je te remercie pour ton soutien et ton immense gentillesse. Merci à Hélène Gares, notamment pour la récolte des données auprès de la DDCSPP24. Hélène Magne, merci pour ton aide précieuse tout au long de ma thèse et en particulier concernant l'impression de mon manuscrit le 21 juillet... Je n'oublie pas non plus un agréable moment, la pause café de 10h ! Merci à Caroline, David, Sylvain, Sébastien, Elodie, Annabelle, Gérald, Claire, Nicole, l'AD et la PCR. Je remercie aussi Marie-Hélène, Nathalie et Liliane, pour leur soutien et leur patience aux alentours de 19h.

Mes sincères remerciements vont également à toute l'Equipe des Mycobactéries du Laboratoire Santé de Animale de l'ANSES et en particuliers à Sylvie Hénault, Claudine Karoui, Kristel de Cruz et Rachid Aaziz, pour leur travail de collaboration. Merci à Gabriela Vecchio pour sa très grande sympathie.

Un grand merci aussi à l'Ecole Doctorale ABIES pour ses bons conseils, ses formations proposées et... les repas délicieux ! Merci à Corinne Fiers pour son soutien et son aide à la fin.

J'adresse mes remerciements à la DDCSPP24 et au GDS24 pour leur grande collaboration technique. Mes pensées vont également aux éleveurs qui traversent une passe difficile en ce moment. Mes remerciements vont aussi à Madame Brigitte Biasino de la DDCSPP21 pour m'avoir transmis quelques données et aussi aux laboratoires agréés pour la réalisation des analyses histopathologiques, le LDA22 et l'ENVL. Merci en particulier à Monsieur Patrick Belli, Maître de Conférences de l'unité d'Histologie Anatomie Pathologique de l'ENVL, pour m'avoir accueillie et m'avoir accordé de son temps pour une présentation de l'histologie et pour m'avoir envoyées quelques photos qui ont pu illustrer ce manuscrit.

Je tiens à remercier Monsieur Eric Sellal, le Directeur de la Société LSI ainsi que son personnel, en particuliers Lise et Sandrine, pour notre étroite collaboration sur la validation du test PCR. J'exprime ma profonde gratitude à LSI pour avoir financé mon déplacement à Wellington, en Nouvelle Zélande, pour la 5^{ème} Conférence *M. bovis*. Mes remerciements aussi à la Société Prionics qui commercialise le test Bovigam[®] ainsi qu'à SSI pour les Ag recombinants.

Par ailleurs, cette thèse n'aurait pu avoir lieu sans les contributions financières de l'ANRT, de la région Aquitaine et du FEDER.

Ces années de travail ont été facilitées par le soutien et les encouragements de mes amis de toujours, mes amis de fac et mes amis connus pendant ma thèse. Merci à Marjorie et Alain,

REMERCIEMENTS

Lynda et Ludo, Claire, Fred et Thibaut, Sèverine, Jean-Yves et Mathias, Benoît, Antho, Paul, et Pj, Marion, Domi et Mat, Laure, Laeti et Salima.

Merci du fond du cœur à Laurent pour ta patience, ta compréhension, ton réconfort et ton amour. Mes sincères remerciements à ta famille et tes amis.

Enfin, mes remerciements les plus forts reviennent à ma famille (ma mère, Marine, Pierre-Yves et ma grand-mère, mon père et mes grands-parents, Cathy, Jean-Luc, Arthur, Adrien et Aurélie, Jacqueline, Louis, Marie-Christine et Xavier) qui m'a fait confiance et m'a toujours encouragée et soutenue et sans qui je n'aurais pu aller au bout de mes projets. Mamie et Maman, je vous dédie ce travail en espérant que vous en serez fiers...

Je voudrais remercier toutes les personnes que j'ai malheureusement oubliées de citer ici...

Evaluation de nouveaux outils de diagnostic de la tuberculose bovine : Conditions d'utilisation d'un test de dosage d'IFN γ et d'un test PCR IS6110 en temps réel

RESUME :

Face à une recrudescence préoccupante depuis 2004 des cas de tuberculose bovine (Tb) en Dordogne et du fait des défauts diagnostiques des méthodes de détection classiques comme l'intradermotuberculation simple (IDS), la bactériologie ou l'inspection systématique des carcasses à l'abattoir, deux nouveaux outils de diagnostic rapide, (i) le test de dosage d'interféron gamma (IFN γ) Bovigam[®] modifié, basé sur des dérivés protéiques purifiés bovins et aviaires (PPD) et des antigènes recombinants spécifiques, ESAT6 et CFP10 (R) et, (ii) une méthode PCR en temps réel basée sur la détection de la séquence d'insertion IS6110 (PCR), ont été intégrés dans le dispositif de lutte afin d'évaluer leurs utilités diagnostiques.

Les différentes études réalisées ont montré que la méthode PCR est au moins aussi sensible que la bactériologie. Sa spécificité opérationnelle est très satisfaisante et sa valeur prédictive positive est excellente vis-à-vis de la bactériologie et l'histologie. Elle constitue donc un outil rapide et fiable de diagnostic de la Tb permettant, en complément d'une tuberculation ou une histologie positive, d'éviter d'attendre le résultat bactériologique pour déclarer l'infection. Elle permet ainsi de raccourcir considérablement les délais de confirmation définitive de l'infection (de 2,5 mois), ce qui constitue un avantage opérationnel crucial.

L'application du test IFN γ modifié comme outil de confirmation des IDS non-négatives n'est pas parfait mais sa complémentarité vis-à-vis de l'IDS en fait un atout indéniable. D'un point de vue technique, un mode de calcul normalisé des résultats individuels doit être utilisé pour obtenir une meilleure reproductibilité et donc pouvoir établir des comparaisons intra et inter laboratoires. De plus, il est nécessaire d'adapter les critères d'analyse (seuils décisionnels des formules normalisées et méthodes d'interprétation du résultat final) au statut infectieux régional d'une part, (région de faible ou forte prévalence de Tb, réactions non-spécifiques rares ou fréquentes) et, aux conditions d'application du test d'autre part (dans la population générale ou dans une population d'IDS non-négatives), pour une utilisation appropriée du test IFN γ .

Ces résultats satisfaisants ont conduit en août 2009 à la reconnaissance réglementaire des tests PCR IS6110 et IFN γ modifié comme outils de confirmation de l'infection de Tb et des IDS non-négatives respectivement.

Mots clés :

Tuberculose bovine, Valeurs diagnostiques opérationnelles, Test de dosage d'IFN γ Bovigam[®], ESAT6, CFP10, PCR IS6110, PCR en temps réel.

Evaluation of new tools for bovine tuberculosis diagnosis: Conditions of use of an IFN γ assay and an IS6110 real-time PCR**ABSTRACT:**

Due to a worrying increase of bovine tuberculosis (bTB) outbreaks in Dordogne since 2004 and because of the diagnostic deficiencies of conventional detection methods, like the single intradermal tuberculin test (SITT), bacteriology or systematic carcasses inspection at slaughterhouse, two new rapid diagnostic tools, (i) the modified interferon gamma (IFN γ) assay Bovigam[®] based on protein purified derivatives (PPD) and ESAT6 and CFP10 specific recombinant antigens (R) and, (ii) a real-time PCR method based on the detection of the insertion sequence IS6110 (PCR), were included in the current bTB control campaign in order to estimate their diagnostic value.

The various studies carried out showed that PCR is at least as sensitive as bacteriology. Its operational specificity is very satisfying and its positive predictive value is excellent compared to bacteriology and histology. Therefore, it constitutes a rapid and reliable bTB diagnostic tool that, in case of positive skin tests or histology, avoids waiting for bacteriological results to confirm infection and thus reduces considerably the time needed for infection notification (about 2,5 months), which represents a crucial operational advantage.

The application of the modified IFN γ assay as a tool for confirming non-negative SITT is not perfect but is an undeniable asset because of its SITT complementarity. From a technical point of view, a normalized calculation method of individual results must be used to obtain a better reproducibility and to allow establishing comparisons within a laboratory and between laboratories. Furthermore, it is necessary to adapt the analysis criteria (the decisional cut-off of the normalized formulae and the interpretation methods of the final result) to the regional infectious status on one hand (low or high prevalence area of bTB, rare or frequent non-specific reactions) and, on the other hand, to the test application conditions (in the general population or in the non-negative SITT population), for an appropriate use of the modified IFN γ assay.

These satisfying findings led to the approval of the PCR IS6110 and the modified IFN γ assay as official confirmation tools of Tb infection and non-negative SITT respectively in August 2009.

Keywords:

Bovine tuberculosis, Operational diagnostic values, Bovigam[®] IFN γ assay, ESAT6, CFP10, PCR IS6110, Real-time PCR.

ABREVIATIONS & SIGLES

AAR : Acido-Alcool-Résistance

Ac : Anticorps

ADN : Acide DésoxyRiboNucléique

AFNOR : Association Française de Normalisation

Afssa : Agence française de sécurité sanitaire des aliments

Ag : Antigène

AM : Arrêté Ministériel

ANRT : Association Nationale de Recherche Technique

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

AOR : Auramine O/Rhodamine

APDI : Arrêté Préfectoral portant sur la Déclaration d'Infection

APMS : Arrêté Préfectoral de Mise sous Surveillance

ARN : Acide RiboNucléique

ASDA : Attestation Sanitaire à Délivrance Anticipée

BAAR : Bacille Acido-Alcool-Résistant

Bact. : Bactériologie (Culture et identification si nécessaire)

C : Atome de carbone

CFP10 : *Culture Filtrate Protein*, protéine de 10 kDa sécrétée en début d'infection de Tb

CIFRE : Convention Industrielle de Formation par la Recherche

Col : Coletsos[®] (milieu de culture)

Ct : *Cycle threshold* ou Cycle seuil

CV : Coefficient de Variation

DDSV : Direction Départementale des Services Vétérinaires

DDSV21 : Direction Départementale des Services Vétérinaires de la Côte d'Or

DDSV24 : Direction Départementale des Services Vétérinaires de la Dordogne

DDCSPP (ex DDSV) : Direction Départementale de la Cohésion Sociale et de la Protection des Populations

DDCSPP24 (ex DDSV24) : Direction Départementale de la Cohésion Sociale et de la Protection des Populations de la Dordogne

DGAI : Direction Générale de l'Alimentation

DIV : Divergent

DIV¹ : PPD+ & R-

DIV² : PPD- & R+

DO : Densité Optique

ECDC : *European Centre for Disease Prevention and Control* ou Centre européen de prévention et de contrôle des maladies

EDE : Etablissement Départemental de l'Elevage

EFSA : *European Food Safety Authority* ou Autorité européenne de sécurité des aliments

EIA : *Enzyme ImmunoAssays* ou tests immunoenzymatiques

ELISA : *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* ou test d'immunoabsorption par enzyme liée

ENVA : Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

ENVL : Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

ENV/Afssa-Lyon : Laboratoire d'histologie de l'ENVL et l'Afssa de Lyon.

EPC : *External Positive Control* ou un contrôle (témoin) positif d'amplification de la cible génétique (IS6110)

Epi-MAI (unité) : Epidémiologie des Maladies Animales Infectieuses (*ex* unité des Maladies Contagieuses)

ESAT6 : *Early Secreted Antigenic Target*, protéine de 6 kDa sécrétée en début d'infection de Tb

EUA : Etats-Unis d'Amérique

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

FEDER : Fonds Européen de Développement Régional

FNGDS : Fédération Nationale des Groupements de Défense Sanitaire.

GB : Grande Bretagne

GDS : Groupement de Défense Sanitaire

GDS24 : Groupement de Défense Sanitaire de la Dordogne

GTV : Groupement Technique Vétérinaire

HE : Hémalum-éosine (coloration)

Hist. : Histologie (au moins examen histologique avec coloration de ZN)

HRP : Enzyme peroxydase de raifort

HSR : Hypersensibilité retardée

IDT : Intradermotuberculation

IDS : Intradermotuberculation Simple

IDC : Intradermotuberculation Comparative

IFN γ : Interféron gamma

IHC : Immunohistochimie

IPC : *Internal positive control* ou Contrôle d'extraction d'ADN

IPC_{endo} : IPC de nature endogène

IPC_{exo} : IPC de nature exogène

IS6110 : *Insertion Sequence 6110* ou Séquence d'insertion 6110

Ld : Limite de détection

LDAR24 : Laboratoire Départemental d'Analyse et de Recherche de la Dordogne

Lerpaz : Laboratoire d'étude et de recherche en pathologie animale et zoonose

LB : Lymphocyte B

LJ : Löwenstein-Jensen[®] (milieu de culture)

LSI : Laboratoire Service International

LT : Lymphocyte T

MAC : *Mycobacterium avium Complex* ou Complexe *Mycobacterium avium*

M. bovis : *Mycobacterium bovis*

M. bovis monocopie : *M. bovis* présentant une seule copie d'IS6110

MNT : Mycobactérie(s) non tuberculeuse(s)

MPB70 : Protéines majeures de 70 kDa sécrétées par les cellules des bactéries du MTBC

MPB83 : Protéines majeures de 83 kDa sécrétées par les cellules des bactéries du MTBC

MRC : Maladie Réputée Contagieuse

MTBC : *Mycobacterium tuberculosis Complex* ou Complexe *Mycobacterium tuberculosis*

N : Négatif (échantillon négatif : PBS pour la stimulation cellulaire (test de dosage d'IFN γ))

NC : *Negative Control* ou Contrôle négatif d'amplification

NEG ou – : Négatif (en terme de résultat)

Non-nég. : Non-négatif

NS : Note de Service

NZ : Nouvelle Zélande

OIE : Organisation mondiale de la Santé animale (*ex* Office International des Epizooties)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBS : *Phosphate Buffer Saline* ou tampon phosphate

PCR : *Polymerase Chain Reaction* ou réaction de polymérisation en chaîne

PCR : Méthode PCR IS6110 en temps réel de LSI

PCR1 : 1^{ère} version de la PCR (testée uniquement en monocupule)

PCR2 : 2^{ème} version de la PCR (testée en monocupule et bicupule)

PCR2m : PCR2 monocupule

PCR2b : PCR2 bicupule.

PCR-Afssa : Test PCR IS6110 en temps réel développé par l'Afssa-Lerpaz.

POS ou **+** : Positif (en terme de résultat)

PPD : Dérivés Protéïniques Purifiés ou tuberculines

PPDA ou **A**: Dérivés Protéïniques Purifiés Aviaires

PPDB ou **B** : Dérivés Protéïniques Purifiés Bovins

PS : Prise de Sang

PWM : *Pokeweed mitogen*, glycoprotéine immunogène (mitogène)

R : Protéïnes recombinantes ESAT6 et CFP10 (antigènes spécifiques du test IFN γ modifié)

RIA : *Radio ImmunoAssays* ou radio-immuno-essais

Se_r (**individuelle ou du test IFN γ**) : Sensibilité relative à la confirmation *post mortem* de Tb

SIGAL : Système d'Information de la DGAI

SNGTV : Société Nationale des Groupements Techniques Vétérinaires

Sp (**individuelle ou du test IFN γ**) : Spécificité absolue, évaluée indépendamment des résultats des autres tests

Sp_r (**individuelle ou du test IFN γ**) : Spécificité opérationnelle ou relative (conditionnelle) à une IDS non-négative

SSI : Staten Serum Institute

Tb : Tuberculose bovine

TP : Témoin Positif (de l'ELISA)

TN : Témoin Négatif (de l'ELISA)

UE : Union Européenne

VNTRs : Variable Number Tandem Repeats ou Séquences répétées en tandem en nombre variable

VP : Valeur Prédictive

VPN : Valeur Prédictive Négative

VPP : Valeur Prédictive Positive

VS : Vétérinaire sanitaire

ZN : Ziehl Neelsen (*coloration*)

LEXIQUE

Abattage diagnostique : Abattage d'un animal à des fins diagnostiques c'est-à-dire en vue de rechercher la présence de lésions macroscopiques à l'abattoir et d'effectuer des prélèvements en vue d'analyse.

Bicupule : Deux cupules ou des cupules séparées.

Cheptel indemne de Tb (*d'après la réglementation*) : *Cheptel ayant régulièrement fourni des résultats favorables aux mesures de dépistage de la tuberculose bovine et dans lequel les animaux introduits proviennent d'un cheptel indemne et ont fait l'objet des mesures de contrôle réglementaires.

Cheptel indemne de Tb (*dans nos études*) : Idem à la définition tirée de la réglementation (*) et en particulier où aucun animal n'a fourni de résultat positif en bactériologie (aucun animal déclaré infecté) depuis 2001.

Cheptel infecté de Tb (*d'après la réglementation*) : **Cheptel où est détenu, ou dont provient, un bovin reconnu infecté de tuberculose bovine.

Cheptel infecté de Tb (*dans nos études*) : Idem à la définition tirée de la réglementation (**) et en particulier où au minimum un animal a fourni un résultat positif en bactériologie.

Cheptel non susceptible : Cheptel ne présentant pas de risque connu à l'égard de la Tb (pas en lien épidémiologique avec un cheptel infecté).

Cheptel susceptible : Cheptel en lien épidémiologique avec un cheptel reconnu infecté.

Contexte épidémiologique : il peut être favorable ou défavorable.

- Un animal dans un **contexte défavorable** correspond à un animal appartenant à un cheptel anciennement infecté (risque de résurgence) et/ou nouvellement infecté et/ou lié épidémiologiquement à un autre cheptel reconnu infecté de Tb.

- Un animal dans un **contexte favorable** correspond à un animal appartenant à un cheptel considéré comme indemne de Tb depuis plusieurs années (10 ans) et ne présentant aucun lien épidémiologique (voisinage, introduction) avec un cheptel infecté ou bien un cheptel provenant d'une zone indemne de Tb.

Dépistage d'une maladie consiste en la recherche systématique, à l'aide d'examens, dans un élevage, des animaux atteints par un trouble de santé donné, passé jusque là inaperçu (Toma B. *et al.*, 2001).

Diagnostic d'une maladie correspond à l'identification de la maladie chez un animal qui présente des troubles (Toma B. *et al.*, 2001).

Divergent (résultat) : Résultat du test IFN γ modifié, positif en PPD et négatif en R (PPD+ et R-) ou l'inverse négatif en PPD et positif en R (PPD- et R+).

Formule initiale des PPD : DO_{PPDB}-DO_{PPDA}.

Formule initiale des R : $DO_R - DO_N$.

Formule normalisée des PPD : $DO_{PPDB} - DO_{PPDA} / DO_{TP} - DO_{TN}$.

Formule normalisée des R : $DO_R - DO_N / DO_{TP} - DO_{TN}$.

Gold standard : Méthode de référence.

Incidence de la Tb en France en 2006 : Nombre de foyers nouveaux de Tb en France en 2006.

Monocupule : Une seule cupule ou La même cupule.

Non-négatif (résultat de l'IDS ou IDC) : Positif ou Douteux.

PCR : Méthode PCR *IS6110* en temps réel de LSI (kit TaqVet[®] MTBC).

PCR1 : Méthode PCR *IS6110* en temps réel de LSI basée sur un IPC endogène et un système d'amplification et détection des deux cibles génétiques (*IS6110* et IPC_{endo}) en monocupule.

PCR2 : Méthode PCR *IS6110* en temps réel de LSI basée sur un IPC exogène.

PCR2m : *PCR2* dont le système d'amplification et détection des deux cibles génétiques (*IS6110* et IPC_{exo}) est réalisé en monocupule.

PCR2b : *PCR2* dont le système d'amplification et détection des deux cibles génétiques (*IS6110* et IPC_{exo}) est réalisé en bicupule.

Résultats individuels du test IFN γ modifié : Résultat du test IFN γ basé sur les PPD et résultat du test IFN γ basé sur les R (le résultat individuel peut être positif ou négatif).

Résultat final du test IFN γ modifié : Résultat issu de l'association des résultats individuels du test IFN γ modifié (le résultat final peut être positif ou négatif ou divergent).

Résultat invalide : L'inhibition de l'analyse est une cause possible de l'invalidité.

Résultat PCR1 invalide (échantillon) : résultat où $Ct_{IS6110} > 40$ et $Ct_{IPC_{endo}} > 40$ (cf. Tableau I.1.5).

Résultat PCR2 invalide (échantillon) : résultat où $Ct_{IS6110} > 40$ et $Ct_{IPC_{exo}} > \text{Valeur du } Ct_{IPC_{exo}} \text{ obtenue pour le NCS majoré } 3 Ct$ ($Ct_{IPC_{exo}}$ obtenue pour le NCS ≤ 29) (cf. Tableau II.2.4).

Sensibilité d'un test : Aptitude d'un test à fournir un résultat positif chez un animal infecté. Elle s'estime par la proportion d'individus infectés fournissant une réponse positive au test (Toma B. *et al.*, 2001).

Spécificité d'un test : Aptitude d'un test à fournir un résultat négatif chez un animal indemne. Elle s'estime par la proportion d'individus indemnes fournissant une réponse négative au test (Toma B. *et al.*, 2001).

Se_r individuelle des PPD (Se_r PPD) : Pourcentage de résultats positifs en PPD dans l'étude de la sensibilité relative à la confirmation *post mortem* de Tb (Se_r) du test IFN γ modifié.

Se_r individuelle des R (Se_r R) : Pourcentage de résultats positifs en R dans l'étude de la Se_r du test IFN γ modifié.

Sp individuelle des PPD (Sp PPD) : Pourcentage de résultats négatifs en PPD dans l'étude de la spécificité absolue (Sp) du test IFN γ modifié.

Sp individuelle des R (Sp R) : Pourcentage de résultats négatifs en R dans l'étude de la Sp du test IFN γ modifié.

Sp_r individuelle des PPD (Sp_r PPD) : Pourcentage de résultats négatifs en PPD dans l'étude de la spécificité relative à l'IDS non-négative (Sp_r) du test IFN γ modifié.

Sp_r individuelle des R (Sp_r R) : Pourcentage de résultats négatifs en R dans l'étude de la Sp_r du test IFN γ modifié.

Se_r finale PPDUR (Se_r PPDUR) du test IFN γ modifié : Pourcentage de résultats finaux positifs et divergents dans l'étude de la Se_r du test IFN γ modifié.

Sp finale PPDUR (Sp PPDUR) du test IFN γ modifié : Pourcentage de résultats finaux négatifs seulement, dans l'étude de la Sp du test IFN γ modifié.

Sp_r finale PPDUR (Sp_r PPDUR) du test IFN γ modifié : Pourcentage de résultats finaux négatifs seulement dans l'étude de la Sp_r du test IFN γ modifié.

Se_r finale PPD \cap R (Se_r PPD \cap R) du test IFN γ modifié : Pourcentage de résultats finaux positifs seulement, dans l'étude de la Se_r du test IFN γ modifié.

Sp finale PPD \cap R (Sp PPD \cap R) du test IFN γ modifié : Pourcentage de résultats finaux négatifs et divergents dans l'étude de la Sp du test IFN γ modifié.

Sp_r finale PPD \cap R (Sp_r PPD \cap R) du test IFN γ modifié : Pourcentage de résultats finaux négatifs et divergents dans l'étude de la Sp_r du test IFN γ modifié.

Spécificité diagnostique opérationnelle de la PCR : Spécificité diagnostique de la PCR évaluée à partir des résultats trouvés négatifs en PCR pour des cheptels qui par la suite avaient été reconnus non infectés (bactériologie négative pour tous les bovins testés du cheptel).

Techniques (ou tests) officielles de diagnostic de la Tb : Histologie et Bactériologie.

Test Bovigam[®] modifié ou **Test IFN γ modifié** : Test de dosage d'IFN γ basé sur les PPD et R (ESAT6 & CFP10).

Tests tuberculiques : IDS et IDC.

Prévalence de la Tb en France en 2006 : Nombre total de foyers de Tb en France en 2006.

VPN : Probabilité qu'une réponse négative à un test de dépistage corresponde à un individu indemne.

VPP : Probabilité qu'une réponse positive à un test de dépistage corresponde à un individu infecté.

Méthode PPDUR : Méthode considérant les résultats finaux positifs et divergents comme positifs.

Méthode PPD∩R : Méthode considérant uniquement les résultats finaux positifs comme positifs.

Zone ou Région indemne de Tb : Zone ou région où aucun animal n'a été trouvé positif à l'IDT et aucun foyer de Tb n'a été déclaré, depuis au moins 10 ans.

Zone ou Région infectée de Tb : Zone ou région qui n'est pas indemne de Tb.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	27
Partie I : ETAT DES CONNAISSANCES SUR LA TUBERCULOSE BOVINE	31
Chapitre 1 : La Tuberculose bovine	31
I. Notions générales sur la Tuberculose	33
I.1. Définition de la Tuberculose	33
I.2. Historique des connaissances sur la maladie	33
I.3. Les mycobactéries	34
I.3.1. Le genre <i>Mycobacterium</i>	34
I.3.1.1. Définition	34
I.3.1.2. Caractéristiques bactériologiques essentielles	35
I.3.2. Différentes classifications des espèces mycobactériennes	36
I.3.2.1. Classification selon l'importance clinique	36
I.3.2.2. Classification selon la vitesse de croissance	39
II. La Tuberculose bovine	40
II.1. Définition de la Tuberculose bovine (Tb)	40
II.2. <i>Mycobacterium bovis</i>	41
II.3. Aspect zoonotique	41
II.4. Pathogénie et évolution de la Tb	43
II.4.1. Les conditions de l'infection de l'animal	43
II.4.1.1. Les conditions qualitatives	43
II.4.1.1.1. Age	43
II.4.1.1.2. Espèce, race, sexe	44
II.4.1.1.3. Etat général	44
II.4.1.1.4. Statut immunitaire	44
II.4.1.1.5. Caractéristiques génétiques	45
II.4.1.1.6. Autocontamination	45
II.4.1.2. Conditions quantitatives	45
II.4.2. Les étapes de l'infection	46
II.5. Epidémiologie de la Tb	47
II.5.1. Epidémiologie analytique	48
II.5.1.1. Les sources de contagion	48
II.5.1.2. Les modalités de contagion	50
II.5.1.2.1. Modes de transmission	50
II.5.1.2.2. Voies de pénétration	50
II.5.2. Mécanismes de diffusion de la Tb dans un élevage	51
II.5.2.1. Facteurs causaux de survenue de la Tb dans un élevage	51

II.5.2.1.1. L'introduction d'un animal	52
II.5.2.1.2. Le voisinage	53
II.5.2.1.3. La résurgence	54
II.5.2.2. Facteurs de risque en élevage	55
II.5.3. Enquêtes épidémiologiques	56
III. Les méthodes de dépistage et diagnostic de la Tb	57
III.1. Les méthodes conventionnelles de dépistage et diagnostic de la Tb	58
III.1.1. Présentation des méthodes <i>ante mortem</i> : les tests tuberculiques	58
III.1.1.1. L'IDS	59
III.1.1.1.1. Principe de l'IDS	59
III.1.1.1.2. Avantages et inconvénients de l'IDS	60
III.1.1.2. L'IDC	60
III.1.1.2.1. Principe de l'IDC	60
III.1.1.2.2. Avantages et inconvénients de l'IDC	61
III.1.2. Présentation des méthodes <i>post mortem</i> : Nécropsie, Histologie et Bactériologie	61
III.1.2.1. L'inspection <i>post mortem</i>	62
III.1.2.2. L'examen histopathologique	62
III.1.2.3. L'examen bactériologique	65
III.1.2.3.1. La Culture	65
III.1.2.3.1.1. Les traitements des échantillons	65
III.1.2.3.1.2. Les milieux de culture	66
III.1.2.3.2. L'identification de l'agent pathogène.	67
III.1.2.4. Le typage moléculaire des isolats de <i>M. bovis</i>	67
III.2. Les méthodes complémentaires et nouveaux outils de diagnostic de la Tb	67
III.2.1. Les méthodes <i>in vitro</i> de diagnostic <i>ante mortem</i>	67
III.2.1.1. Le sérodiagnostic de la Tb : généralités sur les tests sérologiques	68
III.2.1.2. La technique de dosage d'interféron gamma	70
III.2.1.2.1. L'interféron gamma	70
III.2.1.2.2. Historique et principe du test de dosage d'IFN γ	71
III.2.1.2.3. Le test IFN γ Bovigam [®]	71
III.2.1.2.3.1. Principe du test Bovigam [®]	71
III.2.1.2.3.2. Méthode Bovigam [®]	72
III.2.1.2.3.3. Conditions d'utilisation du test Bovigam [®]	73
III.2.1.2.3.4. Interprétation des résultats du test Bovigam [®]	73
III.2.1.2.3.5. Avantages du test Bovigam [®]	75
III.2.1.2.3.6. Les limites du test Bovigam [®]	77
III.2.1.2.4. Applications du test IFN γ	78
III.2.1.2.4.1. Applications du test IFN γ basé sur les PPD	78

III.2.1.2.4.2. Les effets de l'IDT sur le test IFN γ	81
III.2.1.2.4.3. Utilisation d'Ag immunodominants: ESAT6/CFP10	83
III.2.2. La technique PCR en temps réel pour le diagnostic <i>post mortem</i>	86
III.2.2.1. La PCR pour la recherche de Tb d'après la littérature	86
III.2.2.1.1. Différentes cibles génétiques spécifiques du MTBC	86
III.2.2.1.2. Différentes cibles génétiques spécifiques de <i>M. bovis</i>	88
III.2.2.2. La méthode PCR IS6110 en temps réel de LSI (étudiée dans ce travail)	89
III.2.2.2.1. Présentation du test PCR MTBC de LSI (1 ^{ère} version, 2007)	89
III.2.2.2.2. Conditions de réalisation du test	91
Chapitre 2 : Organisation de la lutte contre la Tb en France	92
I. Dispositif national règlementaire de la lutte contre la Tb	93
I.1. Evolution pertinente de la conception de la lutte contre la Tb	93
I.1.1. Evolution des mesures offensives	94
I.1.1.1. Dépistage de l'infection	94
I.1.1.2. Assainissement	95
I.1.2. Evolution des mesures défensives	95
I.1.2.1. Protection des cheptels indemnes	95
I.1.2.1.1. Maîtrise du risque lié à l'introduction	95
I.1.2.1.2. Maîtrise du risque de résurgence	96
I.1.2.1.3. Maîtrise du risque lié au de voisinage	97
I.1.2.2. Qualification des élevages	97
I.2. Organisation sanitaire de la lutte collective contre la Tb	98
I.2.1. Les Eleveurs	98
I.2.2. Les Groupements de défense sanitaire	99
I.2.3. Les Vétérinaires sanitaires	99
I.2.4. Les Directions départementales des services vétérinaires	100
I.2.5. Les Laboratoires départementaux d'analyses agréés	100
I.2.6. L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments	100
I.2.7. La Direction générale de l'alimentation	101
I.3. Procédures nationales règlementaires de dépistage et diagnostic de la Tb (au 1 ^{er} janvier 2007)	101
I.3.1. Procédures de dépistage et diagnostic <i>ante mortem</i> de la Tb	102
I.3.2. Procédure de dépistage et diagnostic <i>post mortem</i> de la Tb	106
II. Situation épidémiologique de la Tb en France jusqu'en 2007 et Stratégies nouvelles pour renforcer la lutte ?	110
II.1. La situation au niveau national	110
II.1.1. 1955-2000 : diminution historique de la Tb pour devenir indemne	111
II.1.2. 2001-2006 : la situation reste inquiétante	112
II.2. La situation dans le département de la Dordogne et la stratégie adoptée	113

II.2.1. La situation en Dordogne	113
II.2.2. La stratégie adoptée	115
II.3. Nouveaux outils stratégiques utilisés en Dordogne pour renforcer la lutte	116
Partie II : TRAVAIL EXPERIMENTAL	119
Chapitre 1 : Un test IFNγ Bovigam[®] modifié pour renforcer la lutte contre la Tb	121
<u>Introduction</u> : Mise en place stratégique d'un test IFNγ Bovigam[®] modifié en Dordogne	121
<u>Matériel et Méthodes</u>	121
I. Présentation de l'adaptation du test Bovigam[®] à un contexte de faible prévalence de Tb	121
II. Description du test IFNγ modifié : protocole d'analyse et méthode d'interprétation des résultats	122
II.1. Protocole d'analyse du test IFN γ modifié	122
II.1.1. Etape 1 : la stimulation cellulaire	122
II.1.1.1. Macro-méthode	122
II.1.1.2. Micro-méthode	123
II.1.2. Etape 2 : le dosage d'IFN γ par la méthode ELISA	124
II.2. Interprétation des résultats d'une analyse IFN γ modifiée	124
II.2.1. Critères de validation de l'analyse ELISA par les témoins	124
II.2.2. Critères de validation de la qualité de chaque échantillon	125
II.2.3. Méthodes d'interprétation des résultats d'un échantillon analysé avec la technique IFN γ modifiée	125
II.2.3.1. Interprétation des résultats individuels	125
II.2.3.1.1. Mode de calcul "initial"	126
II.2.3.1.2. Mode de calcul "normalisé"	126
II.2.3.2. Interprétation du résultat final à partir des résultats individuels	128
III. Intégration à titre expérimental en Dordogne, du test IFNγ modifié en complément des tests actuels employés pour la lutte contre la Tb	129
III.1. Modification de la séquence diagnostique de la Tb à partir du dépistage en prophylaxie (par IDS)	129
III.2. Utilisation du test IFN γ en parallèle à l'IDS lors d'enquête épidémiologique	131
IV. Les différentes études relatives à l'utilisation du test IFNγ modifié en Dordogne	132
IV.1. Etudes de la spécificité absolue, de la spécificité et la sensibilité relatives du test IFN γ modifié : description des échantillons et processus de sélection	133
IV.1.1. Etude de la sensibilité relative à la confirmation <i>post-mortem</i> de Tb (Se _r) du test IFN γ modifié	134

IV.1.2. Etude de la spécificité absolue (Sp) du test IFN γ modifié	135
IV.1.3. Etude de la spécificité relative à l'IDS non-négative (Sp _r) du test IFN γ modifié	136
IV.2. Etude comparative entre les deux modes de calcul ("initial" et "normalisé") et entre deux seuils différents à partir des estimations des Se _r , Sp et Sp _r individuelles et finales du test IFN γ modifié : <i>description de la méthode employée</i>	136
IV.2.1. Modes de calcul et critères d'interprétation des résultats individuels (des PPD et R) des échantillons de chacune des études	137
IV.2.1.1. Mode de calcul "initial" et seuils décisionnels étudiés	137
IV.2.1.2. Mode de calcul "normalisé" et seuils décisionnels étudiés	138
IV.2.2. Interprétation du résultat final à partir des résultats individuels	138
IV.2.3. Définitions des Se _r , Sp et Sp _r individuelles et finales du test IFN γ modifié	139
IV.2.3.1. Calcul des Se _r , Sp et Sp _r individuelles (R et PPD) du test	139
IV.2.3.2. Calcul des Se _r , Sp et Sp _r finales du test	139
IV.3. Evaluation des valeurs de sensibilité & spécificité individuelles optimales permettant de déterminer des seuils décisionnels normalisés et ainsi d'estimer la sensibilité et la spécificité finales du test IFN γ avec les deux méthodes d'interprétation, selon les différentes conditions d'utilisation du test en Dordogne	140
<u>Résultats et Interprétations :</u>	142
I. Résultats des études de sensibilité et spécificité (Se_r, Sp et Sp_r) du test IFNγ modifié, pour les comparaisons des deux modes de calcul et des deux types de seuils utilisés	142
I.1. Résultats de l'étude de la sensibilité relative à la confirmation <i>post mortem</i> de Tb (Se _r) du test IFN γ modifié	142
I.1.1. Contrôle de la qualité des 73 échantillons sélectionnés	142
I.1.2. Estimation des Se _r individuelles et finales du test IFN γ à partir de différents critères d'interprétation des résultats (<i>2 modes de calcul et 2 types de seuil décisionnel</i>)	142
I.1.2.1. Estimation des Se _r individuelles (Se _r PPD et Se _r R)	142
I.1.2.2. Estimation de la Se _r finale (Se _r PPD \cap R ou Se _r PPDUR)	144
I.2. Résultats de l'étude de spécificité absolue (Sp) du test IFN γ modifié	145
I.2.1. Contrôle de la qualité des 496 échantillons analysés	145
I.2.2. Estimation des Sp individuelles et finales du test IFN γ à partir de différents critères d'interprétation des résultats (<i>2 modes de calcul et 2 types de seuil décisionnel</i>)	146
I.2.2.1. Estimation des Sp individuelles (Sp PPD et Sp R)	146
I.2.2.2. Estimation de la Sp finale (Sp PPD \cap R ou Sp PPDUR)	147
I.3. Résultats de l'étude de spécificité opérationnelle ou relative à l'IDS non-négative (Sp _r) du test IFN γ modifié	148
I.3.1. Contrôle de la qualité des 578 échantillons sélectionnés	148

I.3.2. Estimation des Sp_r individuelles et finales du test $IFN\gamma$ à partir de différents critères d'interprétation des résultats (<i>2 modes de calcul et 2 types de seuil décisionnel</i>)	149
I.3.2.1. Estimation des Sp_r individuelles (Sp_r PPD et Sp_r R)	149
I.3.2.2. Estimation de la Sp_r finale (Sp_r PPD \cap R ou Sp_r PPDUR)	152
II. Combinaisons des résultats individuels des différentes études pour déterminer les seuils décisionnels, relatifs au mode de calcul "normalisé", selon les différentes conditions d'utilisation du test en Dordogne et en déduire les valeurs de sensibilité et spécificité finales de ce test	153
II.1. Evaluation des Se_r (sensibilités relatives) et Sp (spécificités absolues) individuelles optimales et, estimation des Se_r et Sp finales du test pour des valeurs de seuil donnant des Se_r et Sp individuelles optimales	153
II.1.1. Détermination des seuils permettant des Se_r et Sp individuelles optimales	153
II.1.1.1. Résultats combinés des Se_r PPD & Sp PPD	154
II.1.1.2. Résultats combinés des Se_r R & Sp R	154
II.1.2. Estimation des Se_r et Sp finales du test $IFN\gamma$ aux seuils décisionnels déterminés pour des Se_r et Sp individuelles optimales	156
II.2. Evaluation des Se_r (sensibilités relatives) & Sp_r (spécificités opérationnelles) individuelles optimales et, estimation des Se_r & Sp_r finales du test pour des valeurs de seuils donnant des Se_r & Sp individuelles optimales	157
II.2.1. Détermination des seuils permettant des Se_r & Sp_r individuelles optimales	157
II.2.1.1. Résultats combinés des Se_r PPD & Sp_r PPD	157
II.2.1.2. Résultats combinés des Se_r R & Sp_r R	158
II.2.2. Estimation des Se_r & Sp_r finales du test $IFN\gamma$ aux seuils décisionnels déterminés pour des Se_r et Sp_r individuelles optimales	159
<u>Discussion :</u>	160
I. Validité de l'échantillonnage	160
I.1. Etude de la spécificité du test $IFN\gamma$ modifié	160
I.2. Etude de la sensibilité du test $IFN\gamma$ modifié	161
II. Comparaison des sensibilités et spécificités individuelles et finales du test obtenues avec les deux modes de calcul et pour deux seuils différents selon ses différentes conditions d'utilisation	163
II.1. Application du test $IFN\gamma$ dans la population générale	163
II.1.1. Sensibilités relatives et spécificités absolues individuelles	163
II.1.2. Sensibilité relative et spécificité absolue finales du test	164
II.1.2.1. Méthode d'interprétation PPD \cap R	164
II.1.2.2. Méthode d'interprétation PPDUR	165
II.2. Application du test $IFN\gamma$ sur des animaux avec une IDS non-négative	165
II.2.1. Sensibilités relatives et spécificités opérationnelles individuelles	165
II.2.2. Sensibilité relative et spécificité opérationnelle finales du test	166
II.2.2.1. Méthode d'interprétation PPDUR	166

II.2.2.2. Méthode d'interprétation PPD \cap R	167
II.3. Conclusion de l'étude comparative entre 2 modes de calcul avec 2 seuils différents	167
III. Evaluation des valeurs de sensibilité & spécificité individuelles optimales permettant de déterminer des seuils décisionnels pour le mode de calcul normalisé et ainsi d'estimer les qualités finales du test IFNγ modifié pour les deux méthodes d'interprétation, selon les conditions d'utilisation du test	169
III.1. Application du test IFN γ modifié dans la population générale	169
III.2. Application du test IFN γ sur des animaux avec une IDS non-négative	170
<u>Conclusion :</u>	172
Chapitre 2 : Un test PCR IS6110 en temps réel pour renforcer la lutte contre la Tb	175
<u>Introduction :</u> Mise en place d'un test PCR IS6110 en temps réel en Dordogne	176
Sous-Chapitre 1 : Etude analytique du test PCR IS6110 en temps réel utilisé en Dordogne	177
<u>Matériels et Méthodes</u>	177
I. Description des échantillons pour les études de sensibilité et spécificité analytiques du test PCR IS6110	177
I.1. Etude de la sensibilité analytique du test PCR IS6110	177
I.2. Etude de la spécificité analytique du test PCR IS6110	178
I.2.1. Mycobactéries n'appartenant pas au MTBC	178
I.2.2. Bactéries n'appartenant pas au genre <i>Mycobacterium</i>	180
II. Protocole d'amplification et de détection par PCR IS6110 de la cible génétique et Méthode d'interprétation des résultats	181
II.1. Protocole d'amplification et de détection par PCR de la cible génétique IS6110	181
II.2. Méthode d'interprétation des résultats	181
<u>Résultats et Discussion</u>	182
I. Etude de la sensibilité analytique du test PCR IS6110	182
II. Etude de la spécificité analytique du test PCR IS6110	182
<u>Conclusion</u>	183
Sous-Chapitre 2 : Etude de la valeur opérationnelle de cette méthode PCR IS6110 utilisée en Dordogne	184
<u>Matériels et Méthodes</u>	184
I. Description des échantillons et processus de sélection rétrospectif	184
I.1. Etude de la sensibilité diagnostique de la 1 ^{ère} version de la PCR (PCR1)	185
I.2. Deux études comparatives entre les sensibilités diagnostiques de PCR1 et PCR2	186
I.2.1. Première étude comparative entre PCR1 et PCR2	186

I.2.2. Deuxième étude comparative entre <i>PCR1</i> et <i>PCR2b</i>	186
I.3. Etude de la sensibilité diagnostique de la <i>PCR2b</i>	187
I.4. Etude de la spécificité diagnostique « opérationnelle » de la <i>PCR</i>	187
I.5. Etude complémentaire de la spécificité de la <i>PCR2b</i> conditionnelle à l'identification de bactéries n'appartenant pas au MTBC	188
II. Description des techniques utilisées (Histologie, Bactériologie et Méthode PCR IS6110)	188
II.1. Histologie réalisée par les laboratoires agréés (LDA22 et ENV/Afssa-Lyon)	188
II.2. Bactériologie (culture selon la méthode de référence & identification) et Méthode <i>PCR</i>	189
II.2.1. Préparation des échantillons : Décontamination & Broyage des échantillons	189
II.2.2. Analyses des échantillons décontaminés	189
II.2.2.1. Recherche bactériologique des mycobactéries du MTBC	189
II.2.2.2. Méthode PCR IS6110 pour la recherche des mycobactéries du MTBC	190
II.2.2.2.1. Purification du surnageant puis Ribolyse®	190
II.2.2.2.2. Extraction d'ADN à partir de l'échantillon <i>ribolysé</i>	190
II.2.2.2.3. Analyse <i>PCR</i> des échantillons d'ADN extraits	191
II.2.2.2.3.1. Test <i>PCR</i> version 1, <i>PCR1</i>	191
II.2.2.2.3.2. Test <i>PCR</i> version 2, <i>PCR2</i>	191
II.3. Méthode d'analyse des différents résultats obtenus par animal dans les études de sensibilité diagnostique des <i>PCR1</i> et <i>PCR2b</i> et de spécificité diagnostique opérationnelle de la <i>PCR</i>	193
<u>Résultats et Interprétations</u>	194
I. Etudes de la sensibilité diagnostique de la <i>PCR</i>	194
I.1. Etude de la sensibilité diagnostique de la <i>PCR1</i>	194
I.2. Etudes comparatives entre les sensibilités diagnostiques de <i>PCR1</i> et <i>PCR2</i>	196
I.3. Etude de la sensibilité diagnostique de la <i>PCR2b</i>	200
II. Etudes de la spécificité diagnostique de la <i>PCR</i>	201
II.1. Etude de la spécificité diagnostique opérationnelle de la <i>PCR</i>	201
II.2. Etude de la spécificité de la <i>PCR2b</i> conditionnelle à l'identification de bactéries n'appartenant pas au MTBC	202
<u>Discussion</u>	203
I. La sensibilité diagnostique de la <i>PCR</i>	203
I.1. Etude de la sensibilité de la <i>PCR1</i>	203
I.2. Etude comparative entre <i>PCR1</i> et <i>PCR2</i>	204
I.3. Etude de la sensibilité de la <i>PCR2b</i>	205
I.4. Evaluation des études de sensibilités diagnostiques des <i>PCR1</i> et <i>PCR2b</i>	206
II. La spécificité diagnostique de la <i>PCR</i>	206

II.1. Etude de la spécificité opérationnelle de la <i>PCR</i>	206
II.2. Etude de la spécificité de la <i>PCR2b</i> conditionnelle à l'identification de bactéries n'appartenant pas au MTBC et comparaison avec l'étude de sa spécificité analytique	207
III. Les avantages diagnostiques de la <i>PCR2b</i> après évaluation de ses performances	208
<u>Conclusion</u>	210
Chapitre 3 : Discussion relative au bilan de l'intégration des deux tests dans le dispositif de lutte contre la Tb	211
I. Bilan de l'intégration des tests IFNγ (Bovigam[®]) modifié et PCR IS6110 en temps réel (TaqVet[®] MTBC) dans le dispositif de lutte contre la Tb en Dordogne (2007-2010)	212
I.1. Evaluation de la situation en Dordogne suite à l'utilisation du test IFN γ après une IDS non-négative (2007-2009)	212
I.1.1. Amélioration de la prophylaxie et de la détection des foyers	212
I.1.2. Rôle clé du protocole IFN γ dans le maintien des déclarations des cheptels IDS non-négatifs	215
I.1.3. Réduction du nombre d'abattages diagnostiques	216
I.2. Evaluation de l'utilisation du test PCR IS6110 en temps réel en Dordogne (2006-2009)	216
II. Evolution 2007-2010 de la réglementation relative à la lutte contre Tb en France	217
III. La situation épidémiologique en France 2007-2009	224
IV. Test IFNγ : Résultats de nos études et évolutions des modalités d'interprétation	225
IV.1. Modalités d'interprétation des résultats individuels des PPD et des R	225
IV.2. Modalités d'interprétation du résultat final du test IFN γ	226
V. Nouveaux schémas décisionnels appliqués en Dordogne suite aux modifications réglementaires de 2009	229
V.1. Nouvelles gestions des suspicions de Tb	229
V.1.1. Lors de prophylaxie	229
V.1.2. En abattoir	235
V.2. Contrôles à l'introduction et enquêtes épidémiologiques	237
V.3. Assainissement par abattage partiel	238
VI. Bilan et Travaux en perspectives	239
CONCLUSION GENERALE	242
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	246
ANNEXES	277

INDEXE DES FIGURES

Numérotation des figures : N°Partie.N°Chapitre.N°Figure.

Figure I.1.1. Représentation de la structure de la paroi des Mycobactéries.	36
Figure I.1.2. Représentation schématique de la pathogénie et évolution de la Tb (cycle de Runyon).	46
Figure I.1.3. Modèle explicatif des mécanismes de survenue de la Tb dans un élevage indemne.	52
Figure I.1.4. Représentation graphique du spectre des réponses immunes de bovins au cours de l'infection à <i>M. bovis</i> .	58
Figure I.1.5. Coloration HE montrant des lésions évocatrices de tuberculose bovine.	62
Figure I.1.6. Coloration HE montrant des lésions non tuberculeuses, un abcès.	63
Figure I.1.7. Coupe immunohistochimique montrant des lésions évocatrices de tuberculose bovine.	64
Figure I.1.8. Représentation graphique du spectre des réponses pathologique et immunitaires à médiation cellulaire (aux tests IFN γ et IDT) et à médiation humorale (aux tests sérologiques) du bétail infecté par <i>M. bovis</i> .	75
Figure I.2.1. Acteurs du dispositif de lutte contre la tuberculose bovine.	98
Figure I.2.2. Séquence diagnostique à partir du dépistage de la Tb en prophylaxie selon l'AM du 15/09/03 modifié*.	104
Figure I.2.3. Séquence diagnostique à partir du dépistage <i>post mortem</i> de la Tb selon l'AM du 15/09/03 modifié*.	109
Figure I.2.4. Evolution du taux de prévalence des élevages infectés de tuberculose bovine (pourcentage au 31/12 ; France, 1955-2006).	110
Figure II.1.1. Exemple de plan de distribution, en plaque de 24 puits, à suivre pour le dépôt de 4 échantillons (Ech 1 à 4) pour l'étape de stimulation cellulaire.	123
Figure II.1.2. Distributions des 85 valeurs de DO du traceur, transformées en suivant soit le mode de calcul initial soit le mode de calcul normalisé.	127
Figure II.1.3. Schéma décisionnel en cheptel à risque (susceptible), présentant une IDS non-négative selon le protocole expérimental utilisé en Dordogne (2007-2009).	130
Figure II.1.4. Schéma décisionnel en cheptel n'ayant aucun risque connu et présentant une IDS non-négative (suspect) selon le protocole expérimental utilisé en Dordogne (2007-2009).	131

Figure II.1.5. Courbe ROC représentant la Se_r PPD (« taux de vrai-positifs » en PPD, dans l'étude de la Se_r) en fonction de « 1-Sp PPD » (« taux de faux-positifs », dans l'étude de la Sp), obtenue pour différentes valeurs-seuils (de 0,00 à 1,25).	154
Figure II.1.6. Courbe ROC représentant la Se_r R (« taux de vrai-positifs » en R dans l'étude de la Se_r) en fonction de « 1-Sp R » (« taux de faux-positifs » dans l'étude de la Sp), obtenue pour différentes valeurs-seuils (de 0,00 à 1,70).	155
Figure II.1.7. Courbe ROC représentant la Se_r PPD (« taux de vrai-positifs » en PPD dans l'étude de la Se_r) en fonction de « 1-Sp _r PPD » (« taux de faux-positifs » dans l'étude de la Spr), obtenue pour différentes valeurs-seuils (de 0,00 à 1,25).	158
Figure II.1.8. Courbe ROC représentant la Se_r R (« taux de vrai-positifs » en R dans l'étude de la Se_r) en fonction de « 1-Sp _r R » (« taux de faux-positifs » en R dans l'étude de la Spr), obtenue pour différentes valeurs-seuils (de 0,00 à 1,70).	159
Figure II.3.1. Evolution des modes de détection (prophylaxie, liens épidémiologiques, abattoirs et achats (introduction)) des cheptels infectés de Dordogne entre janvier 2002 et mai 2010	214
Figure II.3.2. Evolution du nombre de cheptels suspectés, infectés et abattus en Dordogne entre janvier 2002 et mai 2010	215
Figure II.3.3. Nouveau schéma décisionnel appliqué en Dordogne en 2010 suite à l'Arrêté du 19/08/09, pour tout type de cheptel (à risque ou pas) avec une IDS non-négative (dépistage Tb en prophylaxie)	232
Figure II.3.4. Nouveau schéma décisionnel à partir d'une suspicion de Tb en abattoir, appliqué en Dordogne en 2010 suite à l'Arrêté du 19/08/09.	236

INDEXE DES TABLEAUX

Numérotation des tableaux : N°Partie.N°Chapitre.N°Tableau.

Tableau I.1.1. Grille de lecture de l'IDC.	61
Tableau I.1.2. Critères d'interprétation des résultats du test.	74
Tableau I.1.3. Résultats exposés par plusieurs auteurs, concernant des études de sensibilité (Se) et /ou de spécificité (Sp), obtenus pour les IDT, le test IFN γ (basé sur PPD) après une IDT (IDT & IFN γ) ou indépendamment de l'IDS (test IFN γ) et les tests sérologiques.	80
Tableau I.1.4. Résultats exposés par plusieurs auteurs, concernant des études de sensibilité (Se) et /ou de spécificité (Sp), obtenus pour le test IFN γ basé sur PPD, sur ESAT6 et CFP10 (en individuel et en mélange), puis sur PPD et mélange peptidique.	85
Tableau I.1.5. Interprétation des résultats des échantillons analysés avec la 1 ^{ère} version de la méthode PCR IS6110 étudiée, en fonction des valeurs de Ct obtenues avec les détecteurs IS6110 (Ct IS6110) et IPC _{endo} (Ct IPC _{endo}).	91
Tableau I.2.1. Catégories d'animaux définies par les textes règlementaires de la lutte contre la Tb chez les bovinés (AM 15/09/03 modifié*).	101
Tableau I.2.2. Catégories de troupeaux (cheptels) définies par les textes règlementaires de la lutte contre la Tb chez les bovinés (AM 15/09/03 modifié*).	102
Tableau I.2.3. Evolution du nombre de foyers, des taux d'incidence et de prévalence de la Tb en France de 2001 à 2006.	113
Tableau I.2.4. Données chiffrées de l'évolution de Tb en Dordogne de 2002 à 2006.	114
Tableau II.1.1. Critères d'interprétation des résultats individuels des échantillons, obtenus avec les PPD et avec les R calculés selon le mode de calcul "initial".	126
Tableau II.1.2. Critères d'interprétation des résultats individuels des échantillons, obtenus avec les PPD et avec les R calculés selon le mode de calcul "normalisé".	128
Tableau II.1.3. Les différents types de résultat final du test IFN γ modifié.	128
Tableau II.1.4. Les différentes actions menées sur le cheptel en fonction du résultat du test IFN γ modifié (au niveau cheptel).	132
Tableau II.1.5. Description des 73 bovins présentant des lésions suspectes de Tb à l'abattoir et issus de cheptels infectés et sélectionnés pour l'étude de la Se _r du test IFN γ modifiée selon la période de dépistage de la Tb, la méthode utilisée pour la stimulation cellulaire, le nombre (Nb) de bovins testés en IFN γ , le nombre de bovins analysés par 3 méthodes de diagnostic direct et ceux positifs (Pos) en bactériologie (identification <i>M. bovis</i>), en histologie (lésions évocatrices de Tb avec ou sans BAAR), en PCR MTBC.	135
Tableau II.1.6. Formules de calcul des résultats individuels des échantillons analysés avec les PPD et avec les R selon les modes de calcul "initial" et "normalisé" et critères de positivité selon le type de seuil choisi.	137

Tableau II.1.7. Sensibilités individuelles relatives à la confirmation <i>post mortem</i> de Tb (Se_r) du test IFN γ modifié selon le mode de calcul et le seuil choisis (n=60).	144
Tableau II.1.8. Etude de la sensibilité relative à la confirmation <i>post mortem</i> de Tb (Se_r) du test IFN γ modifié : Résultats finaux issus de l'association des résultats des PPD et des R selon le mode de calcul et le seuil choisis et estimation de la Se_r finale du test selon la méthode d'interprétation des résultats finaux choisie (n=60).	145
Tableau II.1.9. Spécificités absolues (Sp) individuelles du test IFN γ modifié selon le mode de calcul et le seuil choisis (n=492).	147
Tableau II.1.10. Etude de la spécificité absolue (Sp) du test IFN γ modifié : Résultats finaux issus de l'association des résultats des PPD et des R selon le mode de calcul et le seuil choisis et estimation de la Sp finale du test selon la méthode d'interprétation des résultats finaux choisie (n=492).	148
Tableau II.1.11. Spécificités opérationnelles (Sp_r) individuelles du test IFN γ modifié selon le mode de calcul et le seuil choisis (n=547).	151
Tableau II.1.12. Etude de la spécificité opérationnelle (Sp_r) du test IFN γ modifié : Résultats finaux issus de l'association des résultats des PPD et des R selon le mode de calcul et le seuil choisis et estimation de la Sp_r finale du test selon la méthode d'interprétation des résultats finaux choisie (n=547).	152
Tableau II.1.13. Résultats des Sensibilités relatives (Se_r) (n=60) et Spécificités absolues (Sp) (n=492) individuelles du test IFN γ pour différentes valeurs de seuils décisionnels (de 0,01 à 0,08) des formules "normalisées" de calcul des résultats des PPD et des R.	153
Tableau II.1.14. Résultats finaux de l'étude de la sensibilité relative (Se_r) (n=60) et de l'étude de la spécificité absolue (Sp) (n=492) du test IFN γ , issus de l'association des résultats des PPD et des R obtenus pour des seuils de positivité de 0,02 et 0,01 respectivement ; Estimation de la Se_r et de la Sp finales à partir de deux méthodes d'interprétation des résultats finaux.	156
Tableau II.1.15. Résultats des Sensibilités relatives (Se_r) (n=60) et Spécificités opérationnelles (Sp_r) (n=547) individuelles du test IFN γ pour différentes valeurs de seuils décisionnels (de 0,01 à 0,08) des formules "normalisées" de calcul des résultats des PPD et des R.	157
Tableau II.1.16. Résultats finaux de l'étude de la sensibilité relative (Se_r) (n=60) et de l'étude de la spécificité opérationnelle (Sp_r) (n=547) du test IFN γ , issus de l'association des résultats des PPD et des R obtenus pour des seuils de positivité de 0,05 et 0,03 respectivement ; Estimation de la Se_r et de la Sp_r finales à partir de deux méthodes d'interprétation des résultats finaux.	160
Tableau II.1.17. Synthèse des principales recommandations pour une utilisation appropriée du test IFN γ modifié en région à faible prévalence de Tb et présentant pas* ou peu** de réactions non-spécifiques (Dordogne).	173
Tableau II.2.1. Etude de la spécificité analytique du test PCR IS6110 – Liste des mycobactéries n'appartenant pas au MTBC à tester et effectivement disponibles.	179
Tableau II.2.2. Etude de la spécificité analytique du test PCR IS6110 – Liste des bactéries testées n'appartenant pas au genre <i>Mycobacterium</i> .	180

Tableau II.2.3. Caractéristiques des échantillons utilisés pour la seconde étude comparative entre <i>PCR1</i> et <i>PCR2b</i> .	186
Tableau II.2.4. Système d'interprétation des résultats des échantillons (analysés avec la <i>PCR2</i>) en fonction des valeurs de Ct obtenues avec les détecteurs <i>IS6110</i> (Ct_{IS6110}) et IPC_{exo} ($Ct_{IPC_{exo}}$).	193
Tableau II.2.5. Critères d'interprétation des résultats bactériologiques et <i>PCR</i> des échantillons par animal, employés pour les études de sensibilité et spécificité diagnostiques de la <i>PCR</i> .	194
Tableau II.2.6. Résultats de la <i>PCR1</i> , de l'histologie (<i>Hist.</i>) et de la bactériologique (<i>Bact.</i>) obtenus dans l'étude de la sensibilité diagnostique de la <i>PCR1</i> (n=77).	195
Tableau II.2.7. Résultats bactériologiques (<i>Bact.</i>) en fonction des résultats positifs ($Ct_{IS6110} < 40$) des différents tests <i>PCR</i> (<i>PCR1</i> , <i>PCR2m</i> et <i>PCR2b</i>) dans l'étude comparative 1 entre <i>PCR1</i> et <i>PCR2</i> (monocupule et bicupule) (n=42).	196
Tableau II.2.8. Résultats des échantillons analysés par <i>PCR1</i> ($Ct_{IPC_{endo}}$ & Ct_{IS6110}) et par <i>PCR2m</i> et <i>PCR2b</i> ($Ct_{IPC_{exo}}$ & Ct_{IS6110}) avant toute dilution au 1/10 (si nécessaire), dans l'étude comparative 1 entre <i>PCR1</i> (monocupule) et la <i>PCR2</i> (monocupule et bicupule) (n=42).	197
Tableau II.2.9. Résultats de <i>PCR1</i> & <i>PCR2b</i> , <i>PCR1</i> & <i>Bact.</i> et <i>PCR2b</i> & <i>Bact.</i> dans l'étude comparative 1 entre <i>PCR1</i> (monocupule) et <i>PCR2</i> (n=42).	198
Tableau II.2.10. Résultats de la <i>PCR2</i> bicupule (<i>PCR2b</i>), de l'histologie (<i>Hist.</i>) et de la bactériologie (<i>Bact.</i>) obtenus dans l'étude de la sensibilité diagnostique de la <i>PCR2b</i> (n=67).	200
Tableau II.2.11. Résultats de la <i>PCR</i> (<i>PCR1</i> ou <i>PCR2b</i>), de l'histologie (<i>Hist.</i>) et de la bactériologie (<i>Bact.</i>) obtenus dans l'étude de la spécificité diagnostique opérationnelle de la <i>PCR</i> (n=38).	201
Tableau II.2.12. Résultats des échantillons analysés par <i>PCR2b</i> en fonction des différents résultats bactériologiques (janvier 2007-mai 2010) pour l'étude de la spécificité de la <i>PCR2b</i> conditionnelle à l'identification de bactéries n'appartenant pas au MTBC (n=68).	202
Tableau II.3.1. Données chiffrées de l'évolution de Tb en Dordogne de 2006 à mai 2010	212
Tableau II.3.2. Cheptels suspendus (nombre) détectés en prophylaxie ou abattoir puis requalifiés ou déclarés infectés de Tb entre 2005 et 2010* (<i>janvier à mai 2010</i>), en Dordogne	213
Tableau II.3.3. Catégories d'animaux redéfinies par les nouveaux textes règlementaires de la lutte contre la Tb chez les bovinés (AM du 19/08/2009 modifiant l'AM du 15/09/2003 modifié* (article 12) et NS du 12/10/09).	219
Tableau II.3.4. Evolution du nombre de foyers, des taux d'incidence et de prévalence de la Tb en France de 2006 à 2009	224

INDEXE DES ANNEXES

ANNEXE I : Les principaux agents chimiques utilisés pour la décontamination des échantillons avant leur mise en culture	278
ANNEXE II : Les milieux pour la culture des bacilles tuberculeux	279
ANNEXE III : Méthode de recherche des bacilles tuberculeux par culture sur milieu solide (selon la norme NF U 47-104, version en vigueur de 2003)	280
ANNEXE IV : Méthodes d'identification de l'agent pathogène à partir de colonies sur milieu de primo-culture (selon Afssa-Lerpaz)	281
ANNEXE V : Les techniques moléculaires pour le typage des isolats de <i>M. bovis</i> : Principe du spoligotypage et de la technique VNTR	284
ANNEXE VI : Présentation de la technique ELISA indirecte	285
ANNEXE VII : Mode Opérateur du test IFN γ Bovigam [®]	286
ANNEXE VIII : La technique PCR en temps réel	289
ANNEXE IX : Mode Opérateur du test PCR IS6110 de LSI (1 ^{ère} version)	293
ANNEXE X : Validation de la qualité d'un échantillon analysé avec le test IFN γ Bovigam [®] modifié	295
ANNEXE XI : Examen des échantillons présentant des résultats invalides pour les PPD en raison d'une saturation d'absorbance (concernant les études de Se _r et Sp _r du test IFN γ)	297
ANNEXE XII : Méthode pour déterminer le nombre de copies d'IS6110 présentes dans une solution de 0,01 ng/ μ l d'ADN purifié de <i>M. bovis</i> (monocopie IS6110)	299
ANNEXE XIII : Etude de la limite de détection au seuil de confiance de 95 % du test PCR (PCR IS6110 en temps réel de LSI)	300
ANNEXE XIV : Etude comparative des résultats obtenus avec les méthodes histologiques employées par les deux laboratoires agréés.	304
ANNEXE XV : Etude comparative entre la PCR2b et la PCR IS6110 de l'Afssa-Lerpaz.	307
ANNEXE XVI : Articles	308
XVI -1 : Faye S. <i>et al.</i> , 2008, Renc. Rech. Ruminants	308
XVI -2 : Faye S. <i>et al.</i> , sous presse, Vet. Microbiol.	312

INTRODUCTION GENERALE

La tuberculose bovine est un des fléaux majeurs de l'élevage : en l'absence de lutte organisée, cette maladie infectieuse et contagieuse touche un pourcentage élevé d'élevages et d'animaux, ce qui engendre des conséquences économiques et hygiéniques très importantes. Elle est transmissible à l'Homme : sans mesure de prévention adaptée, elle peut être responsable d'une proportion notable des cas de tuberculose humaine (jusqu'à 30%).

En France, elle a fait l'objet d'un plan de lutte dirigé par l'Etat à partir de 1955 et le pays a été reconnu officiellement indemne de tuberculose bovine en 2001 par l'Union Européenne.

L'incidence annuelle de l'infection en France est actuellement très basse puisque le nombre total de cheptels bovins infectés est de l'ordre de quelques dizaines (58 en 2005, soit 2,5 p. dix mille), alors qu'il était autrefois de plusieurs centaines de mille.

L'objectif en France, comme dans de nombreux pays, est de parvenir à son éradication. En l'absence de mesures médicales efficaces, la lutte est exclusivement sanitaire. Celle-ci repose, d'une part, sur la détection des élevages infectés par tuberculination des animaux et sur l'inspection systématique des carcasses à l'abattoir, et, d'autre part, sur la mise en œuvre des mesures de maîtrise des facteurs de risque d'infection des élevages reconnus indemnes.

Même si le taux de prévalence est faible, l'éradication des derniers foyers se heurte aux limites actuelles des moyens de dépistage conventionnels, tests tuberculiques en prophylaxie et inspection de salubrité en abattoir (complétées en cas d'observation de lésions par l'histologie et la bactériologie) (Badin de Montjoye *et al.*, 2004). En effet, les cas de tuberculose étant rares, toutes ces méthodes sont responsables d'erreurs de diagnostic par excès, avec une proportion élevée de résultats faussement positifs. Il est néanmoins nécessaire de détecter l'infection le plus précocement possible, pour en éviter sa propagation. Ces deux objectifs contradictoires sont incompatibles avec les méthodes de détection en usage jusqu'à récemment.

Bien que la France ait été reconnue indemne de tuberculose bovine en 2001, l'incidence de l'infection a augmenté de façon préoccupante dans certains départements comme la Dordogne à partir de 2004 (2003 : 3 foyers, 2004 : 9, 2005 : 13, 2006 : 29), laquelle est apparue en 2006 comme le département le plus infecté de France. Les répercussions de cette évolution étaient donc inquiétantes d'un point de vue sanitaire (source de contamination pour les cheptels indemnes et pour l'Homme) mais également économique et commercial dépassant les seuls élevages abattus (vendeurs de reproducteurs touchés par l'image de « région infectée » ; impact sur le commerce international des bovins de boucherie).

Face à cette recrudescence et du fait de l'insuffisance des méthodes d'intervention classiques, il était nécessaire de tester en complément des tests conventionnels, de nouveaux outils disponibles, le test de dosage d'interféron gamma (IFN γ) Bovigam[®] et une méthode PCR en temps réel basée sur la détection de la séquence d'insertion IS6110, dont les qualités intrinsèques (sensibilité et spécificité) n'étaient pas suffisamment connues ni leurs valeurs prédictives en situation de faible prévalence actuelle.

L'objectif de ce travail était d'adapter et d'évaluer ces outils pour le diagnostic de la tuberculose bovine en Dordogne, par rapport aux techniques actuelles, et de définir leurs conditions d'emploi dans le dispositif de lutte déjà en place. Il s'agissait ensuite de réaliser un bilan de l'intégration de ces deux tests dans les schémas décisionnels en vue d'une éventuelle validation réglementaire.

Ce travail de thèse a été effectué à temps plein au Laboratoire Départemental d'Analyse et de Recherche de la Dordogne (LDAR24). Il a été codirigé par Monsieur Jean-Jacques Bénét, Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA) dans l'unité Epidémiologie des Maladies Animales Infectieuses (unité Epi-MAI, *ex* unité des Maladies Contagieuses) et, Monsieur Bruno Garin-Bastuji, Chef de l'unité des Zoonoses Bactériennes du Laboratoire d'étude et de recherche en pathologie animale et zoonose (Lerpaz) de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa)^{*}. De plus, ce travail de thèse a été suivi régulièrement par Madame María-Laura Boschioli, en charge de l'équipe Mycobactéries de l'unité des Zoonoses Bactériennes de l'Afssa-Lerpaz et par Monsieur Jean-Louis Moyen, Directeur du LDAR 24.

Cette thèse a été financée par l'intermédiaire d'une Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE), établie entre l'Association Nationale de Recherche Technique (ANRT) et le Conseil Général de la Dordogne pour le LDAR24. Ce projet a été également subventionné par l'Europe (le FEDER) et la région Aquitaine.

Ce manuscrit est divisé en deux parties. Une revue de la littérature, concernant l'état des connaissances sur la tuberculose bovine est présentée dans la première partie, elle-même également scindée en deux chapitres.

* Depuis le 1^{er} juillet 2010, l'AFSSA est devenue l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) et le Lerpaz a été renommé Laboratoire de Santé Animale de Maisons-Alfort.

Le premier chapitre fait état de la maladie (étiologie, pathogénie, aspect zoonotique, épidémiologie), des techniques conventionnelles de dépistage et diagnostic et des nouveaux outils non règlementés.

Le second chapitre présente l'organisation de la lutte contre la tuberculose bovine en France et décrit plus particulièrement le dispositif réglementaire et la situation épidémiologique de cette infection en France jusqu'à la fin d'année 2006 ainsi que les stratégies adoptées pour renforcer la lutte notamment par la mise en place en Dordogne de deux nouveaux outils supplémentaires à partir de la campagne prophylactique 2006-2007.

Notre travail de recherche est exposé dans la seconde partie du manuscrit. Il est organisé en trois chapitres.

Les deux premiers correspondent à l'évaluation des deux nouveaux outils de diagnostic pour renforcer la lutte contre la tuberculose bovine ; le premier étudié est le test de dosage d'IFN γ et le second la méthode PCR IS6110 en temps réel.

Le dernier chapitre présente le bilan de l'intégration des deux techniques dans le dispositif de lutte ainsi que les nouveaux textes réglementaires appliqués en 2010.

PARTIE I :

ETAT DES CONNAISSANCES

SUR LA TUBERCULOSE BOVINE

Chapitre 1 :
La Tuberculose bovine

I. Notions générales sur la Tuberculose

I.1. Définition de la Tuberculose

La tuberculose est une maladie infectieuse, contagieuse, commune à l'Homme et à de nombreuses espèces animales. Elle est causée par diverses espèces bactériennes appartenant au genre *Mycobacterium* : toutes les espèces appartenant au groupe « *tuberculosis* » ainsi que *Mycobacterium avium* ssp. *avium* (Haddad M., Masselot M. et Durand B., 2004a).

Elle est caractérisée cliniquement, par une évolution le plus souvent chronique et un grand polymorphisme et anatomiquement, par des lésions inflammatoires, les tubercules (Bénet J.J., 2008). En effet, le nom de tuberculose vient des nodules appelés « tubercules » qui se forment dans les ganglions lymphatiques des individus atteints.

I.2. Historique des connaissances sur la maladie

La tuberculose est une maladie connue depuis la plus haute antiquité. En effet, des signes cliniques pathologiques (lésions osseuses du mal de Pott) révélateurs d'une dégénérescence tuberculeuse ont été retrouvés dans la colonne vertébrale de momies égyptiennes. L'origine des infections était principalement due à *M. bovis* associé à des infections osseuses (Crubézy *et al.*, 1998).

En 1810, Laennec R. découvre le stéthoscope pour l'auscultation et en 1819, il effectue une étude clinique et nécropsique complète de la maladie qui lui permet d'affirmer l'unicité de la tuberculose. Il a également le mérite de penser que « la maladie perlière ou pomelière » des bovidés était de nature tuberculeuse (Thorel M.F., 2003).

En 1865, Villemin J.A. montre que la tuberculose est contagieuse (Villemin J.A., 1865). Puis, le bacille tuberculeux est mis en évidence à partir de lésions d'origine humaine, bovine et aviaire par Koch R., en 1882. Pour Koch R., un même bacille est responsable des trois formes de la maladie (Thorel M.F., 2003). En 1882, Ehrlich met en évidence son acido-alcool-résistance qui est révélée dès 1883 par la méthode de coloration de Ziehl et Neelsen (Site web [1]).

Les travaux de Rivolta en 1889 et de Mafucci en 1890 montrèrent la spécificité de l'infection due au bacille d'origine aviaire (Thorel M.F., 2003). Par ailleurs, Koch R. mit au point, en 1890 également, la « lymphe tuberculeuse » ou vieille tuberculine dont l'application au

diagnostic allergique de la maladie, proposée par Guttman l'année suivante, devait se révéler intéressante (Bénet J.J., 2008).

En 1896, Smith T. différencie le bacille tuberculeux humain du bacille tuberculeux bovin (Site web [1]). Dès lors, les trois bacilles tuberculeux furent individualisés (nommés ultérieurement par des noms différents d'espèce). Le genre *Mycobacterium* fut créé par Neumann en 1896 (Thorel M.F., 2003). Le bacille bovin fut nommé *Mycobacterium bovis* par Karlson A.G. et Lessel E.F. en 1970.

La tuberculose a été définie par les experts de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) au congrès de Vienne en 1952 comme «une maladie ou une infection qui se transmet naturellement des animaux vertébrés à l'Homme et inversement».

I.3. Les mycobactéries

L'ensemble des mycobactéries fait partie de la famille de *Mycobacteriaceae* qui est composée d'un seul genre *Mycobacterium* (Euzéby J.P., Site web [2a]).

Cette famille est elle-même issue du sous-ordre des *Corynebacterineae* composé également des familles telles que *Corynebacteriaceae*, *Gordoniaceae*, *Nocardiaceae*, etc. (Euzéby J.P., site web [2b]).

Les *Corynebacterinae* appartiennent à l'ordre des Actinomycétales également composé d'autres subdivisions (telles les *Actinomycineae*, *Micrococcineae*, *Pseudonocardineae*, *Streptomycineae*, etc.).

De plus, cet ordre est issu de la sous-classe des *Actinobacteridae* et de la classe des *Actinobacteria* (Euzéby J.P., Sites web [2c] et [2d]).

I.3.1. Le genre *Mycobacterium*

I.3.1.1. Définition

La définition du genre *Mycobacterium* repose sur les trois critères suivants : l'acido-alcool-résistance, la présence d'acides mycoliques de 60 à 90 atomes de carbone (C) libérant des esters de pyrolyse de 22 à 26 C et un contenu en Guanine-Cytosine (GC %) de l'ADN compris entre 61 et 71% (Vincent Levy-Frébault V. et Portaels F., 1992 ; Shinnick T.M. et Good R.C., 1994 ; Vincent V., 1995).

I.3.1.2. Caractéristiques bactériologiques essentielles

Les mycobactéries sont aérobies ou micro-aérophiles. Morphologiquement, elles sont définies comme des bacilles droits ou légèrement incurvés, de 0,2 à 0,6 µm de diamètre sur 1 à 10 µm de long (Vincent V., 1995 ; Euzeby J.P., Site web [2e]). Ces bacilles sont immobiles, non sporulés, ni capsulés, parfois ramifiés (Coetzer J.A.W. et Tustin R.C., 2004). Suivant l'espèce mycobactérienne, les colonies, isolées sur un milieu de culture donné, sont dysgoniques (de petite taille) ou eugoniques (de grande taille), lisses ou rugueuses et pigmentées ou pas.

Les mycobactéries sont liées phylogénétiquement aux bactéries à Gram positif, même si leur coloration de Gram est souvent faible ou variable (Coetzer J.A.W. et Tustin R.C., 2004).

Cependant, le genre *Mycobacterium*, comme un certain nombre de genres de l'ordre des Actinomycétales, présente une propriété tinctoriale particulière: l'acido-alcool-résistance qui est due à une forte proportion de lipides, les acides mycoliques présents dans leur paroi (Figure I.1.1).

Les autres genres de l'ordre des Actinomycétales possèdent des acides mycoliques plus courts parfois responsables d'une acido-alcool-résistance (AAR) partielle (Vincent V., 1995 ; Panteix G., 2007a). Néanmoins, ces autres genres synthétisant des acides mycoliques présentent sensiblement les mêmes valeurs pour leur contenu en GC % que le genre *Mycobacterium* (Vincent V., 1995).

Le phénomène d'AAR repose sur le fait que, liés au peptidoglycane par l'intermédiaire de l'arabinogalactane, ces acides gras à longues chaînes carbonées constituent une barrière hydrophobe tout autour de la cellule (Vincent V., 1995). Ils gênent ainsi la libération par traitements acide et alcool puissants, des colorants une fois absorbés. Les mycobactéries sont donc qualifiées de bacilles acido-alcool-résistants (BAAR).

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour mettre en évidence ce phénomène, soit en microscopie à lumière transmise (par exemple, la méthode à chaud de Ziehl-Neelsen) ou en fluorescence (par exemple, la méthode à l'auramine / O rhodamine) (Vincent V., 1995).

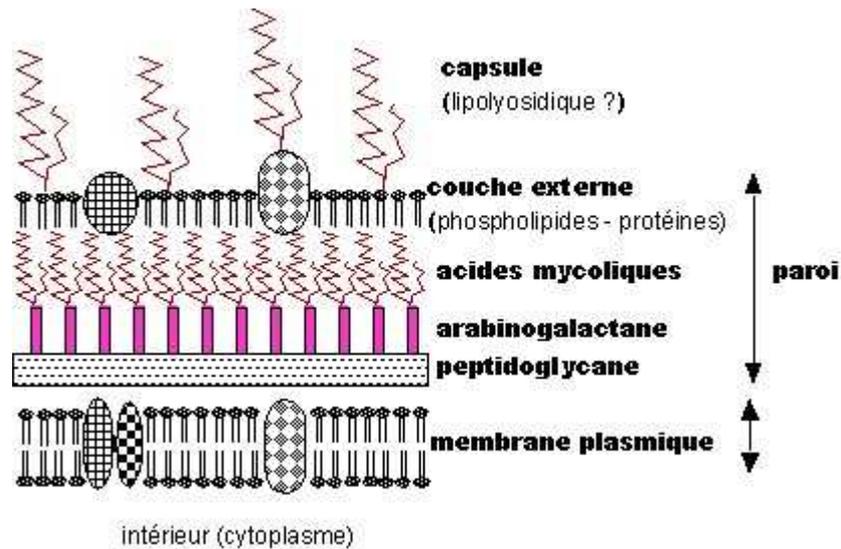


Figure I.1.1. Représentation de la structure de la paroi des Mycobactéries (Site web [3]).

Outre, l'AAR, les mycobactéries résistent au froid (même la congélation, Corner L.A., 1994) et à la dessiccation. De plus, elles sont résistantes aux antibiotiques usuels (pénicilline, tétracycline...). Cependant, elles sont sensibles à la chaleur (20 minutes à 60°C, 20 secondes à 75°C), aux rayons ultra-violet et à la lumière (Goodchild A.V. et Clifton-Hadley R.S., 2001 ; Bénet J.J., 2008).

Par ailleurs, la culture des mycobactéries, excepté certaines mycobactéries dites « atypiques », n'est pas réalisable sur des milieux bactériologiques usuels et nécessite l'emploi de milieux spéciaux (Bénet J.J., 2008). Il existe une autre exception, *Mycobacterium leprae* qui est non cultivable sur milieu synthétique.

I.3.2. Différentes classifications des espèces mycobactériennes

Actuellement, le genre *Mycobacterium* comporte 148 espèces (Euzéby J.P., Site web [2f]). Elles peuvent être classées soit selon leur importance clinique soit en fonction de leur vitesse de croissance.

I.3.2.1. Classification selon l'importance clinique

Les mycobactéries sont réparties en trois groupes selon leur importance clinique : les mycobactéries pathogènes, les mycobactéries opportunistes et les mycobactéries saprophytes ou commensales. Les deux dernières catégories sont qualifiées d'atypiques (Coetzer J.A.W. et Tustin R.C., 2004 ; Bénet J.J., 2008).

- Les mycobactéries pathogènes stricts (ou obligatoires)

Le groupe des mycobactéries strictement pathogènes pour l'Homme et/ou les animaux est composé de mycobactéries responsables de tuberculoses humaine, bovine, aviaire et caprine (mycobactéries tuberculeuses), de l'entérite hypertrophiante des ruminants ou paratuberculose (*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*), de lèpre humaine (*Mycobacterium leprae*), de lèpre murine (*Mycobacterium lepraemurium*) ou de farcin du bœuf (*Mycobacterium farcinogenes*) (Coetzer J.A.W. et Tustin R.C., 2004 ; Bénet J.J., 2008).

Les mycobactéries tuberculeuses sont donc *Mycobacterium avium* ssp. *avium* qui est à l'origine de la tuberculose aviaire – responsable également d'infections chez le porc (surtout ganglionnaires), l'Homme (disséminées), les bovins, les chevaux, les chats, les chiens,...) – ainsi que toutes les mycobactéries du groupe « *tuberculosis* » (Haddad M., Masselot M. et Durand B., 2004a ; Panteix G., 2007b).

Ce groupe « *tuberculosis* » également appelé complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) inclut les espèces bactériennes suivantes :

- *Mycobacterium tuberculosis* : c'est l'agent principal de la tuberculose humaine ;
- *Mycobacterium bovis* : c'est l'agent essentiellement responsable de la tuberculose bovine (décrit ultérieurement dans ce manuscrit) ;
- *Mycobacterium africanum* : c'est un agent responsable de la tuberculose humaine en Afrique qui a été initialement identifié par Castets M., Rist N. et Boisvert H., en 1969 ;
- *Mycobacterium canetti* : c'est un agent également responsable de tuberculose humaine en Afrique ; il a été initialement découvert en 1969 par Canetti G. à partir de colonies lisses et brillantes de *Mycobacterium tuberculosis*, isolées d'un fermier français. En 1997, il est considéré comme un nouveau taxon du MTBC et est désigné comme *Mycobacterium canetti* par Van Soolingen D. et ses collègues ;
- *Mycobacterium microti* : découvert par Wells A.Q. en 1937 sur la chauve-souris, c'est l'agent principal de la tuberculose des petits rongeurs mais il est retrouvé occasionnellement chez le chat (Huitema H. et Jaartsveld. F.H.J., 1967), et plus rarement encore dans d'autres espèces (p. ex. bovins, porcs, chiens, blaireaux (Smith N.H. *et al.*, 2009). Des infections chez l'Homme sont également décrites (Van Soolingen D. *et al.*, 1998) ;

▪ *Mycobacterium caprae* : c'est un agent principalement responsable de tuberculose caprine mais aussi bovine ; il a été initialement identifié à partir d'un isolat de chèvre en 1999 par Aranaz A. *et al.* qui l'avaient identifié comme *Mycobacterium tuberculosis* ssp. *caprae*. En 2003, il est élevé au rang d'espèce, soit *Mycobacterium caprae* par Aranaz A. et ses collègues. En effet, de nombreuses souches identifiées comme *Mycobacterium bovis*, en provenance de bovins, isolées préalablement à la désignation de cette nouvelle espèce, ont pu être caractérisées *a posteriori* comme *Mycobacterium caprae* aussi bien en France que dans d'autres pays européens (Prodinger W.M. *et al.*, 2005);

▪ *Mycobacterium pinnipedii* : isolé et décrit chez des mammifères marins pinnipèdes (phoques, morses, léopards de mer,...), il est également pathogène pour les cobayes, les lapins, l'Homme, le tapir brésilien et éventuellement les bovins (Cousins D.V. *et al.*, 2003).

Génétiquement, tous les membres du MTBC ont 99,9 % de similarité au niveau des nucléotides et des séquences d'acide ribonucléique ribosomal 16S (ARNr 16S) identiques (Brosch R. *et al.*, 2002 ; Haddad M., Masselot M. et Durand B., 2004a ; Coetzer J.A.W. et Tustin R.C., 2004).

- Les mycobactéries opportunistes ou pathogènes potentiels

Les mycobactéries opportunistes provoquent des infections peu ou pas contagieuses (chez l'Homme, les bovins, les porcs,...), cliniquement identiques à la tuberculose (localisations pulmonaires, ganglionnaires, mammaires, cutanées,...) mais habituellement bénignes (sauf exceptions). Par ailleurs, elles sont responsables de réactions positives par excès lors du dépistage allergique de la tuberculose par tuberculination (réactions atypiques) (Coetzer J.A.W. et Tustin R.C., 2004 ; Cousin D.V. *et al.*, 2004 ; Bénet J.J., 2008).

Voici quelques exemples d'espèces présentes dans ce groupe (Bénet J.J., 1991 et 2008 ; Coetzer J.A.W. et Tustin R.C., 2004 ; Biet F. *et al.*, 2005 ; Panteix G., 2007b ; Site web [4]) :

▪ *Mycobacterium intracellulare*, responsable de maladies pulmonaires ressemblant à la tuberculose chez l'Homme, de lymphadénites du porc mais également chez l'Homme, de lésions ganglionnaires (mésentériques) chez les veaux et porcs,... ;

▪ *Mycobacterium kansasii*, à l'origine d'affections majoritairement pulmonaires et ganglionnaires chez les bovins, porc et l'Homme,... ;

- *Mycobacterium xenopi*, provoquant des infections respiratoires chez l'Homme (nosocomiales), les poissons,... ;
- *Mycobacterium fortuitum*, à l'origine de nodules cutanés tuberculoïdes et de mammites des bovins, d'adénites du porc, de mycobactérioses des poissons d'eau douce, d'infections cutanées chez l'Homme,... ;
- *Mycobacterium gordonae*, responsable de thélites nodulaires de la vache laitière, de mycobactérioses des reptiles, amphibiens et poissons mais aussi du porc,... ;
- *Mycobacterium marinum* et *Mycobacterium chelonae*, provoquant des mycobactérioses des poissons, reptiles et amphibiens mais également des infections cutanées chez l'Homme,...

- Les mycobactéries saprophytes (non pathogènes)

Les mycobactéries saprophytes sont présentes dans l'environnement (la terre, l'eau, la végétation, les poussières, l'alimentation (lait,...)) et dans des réservoirs animaux (tube digestif, peau, muqueuses). Elles ne sont pas habituellement pathogènes (très rarement responsables d'infection). Elles peuvent également provoquer des réactions atypiques suite à des tuberculinations (Coetzer J.A.W. et Tustin R.C., 2004).

Cette catégorie est composée de nombreuses espèces mycobactériennes, telles que *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium vaccae*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium triviale*, *Mycobacterium flavescens*, *Mycobacterium gordonae*,... (Coetzer J.A.W. et Tustin R.C., 2004 ; Bénet J.J., 2008).

I.3.2.2. Classification selon la vitesse de croissance

En fonction de leur vitesse de croissance en conditions optimales de culture, les espèces du genre *Mycobacterium* sont réparties en deux groupes taxonomiques (Vincent V., 1995 ; Thorel M.F., 2003 ; Site web [2e]) :

- Les mycobactéries à croissance rapide, ayant un temps de génération de 2 à 5 heures et, formant des colonies visibles en moins de 7 jours et étant aptes à se développer sur gélose nutritive : *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium vaccae*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*,... (Bourgoin A. et Agius G., 1995).

- Les mycobactéries à croissance lente, ayant un temps de génération moyen de 20 heures et, ne formant des colonies qu'après au moins 7 jours de culture et étant incapables de se

développer sur des milieux bactériologiques standards : toutes les mycobactéries tuberculeuses, mais aussi *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium nonchromogenicum*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium xenopi*,... (Bourgoin A. et Agius G., 1995).

Par ailleurs, dans la classification de Runyon, les mycobactéries non tuberculeuses sont divisées en quatre groupes selon deux critères phénotypiques, la vitesse de croissance et la synthèse de pigments (Coetzer J.A.W. et Tustin R.C., 2004). Les trois premiers groupes comprennent les mycobactéries à croissance lente – le groupe I photochromogène (pigmentées à la lumière seulement), le groupe II scotochromogène (pigmentées avec ou sans lumière) et le groupe III non chromogène (non pigmentées) – alors que le groupe IV ne renferme que celles à croissance rapide (pigmentées ou non) (Runyon E.H., 1959 ; Shinnick T.M. et Good R.C., 1994).

II. La Tuberculose bovine

II.1. Définition de la Tuberculose bovine

La Tuberculose bovine (Tb) est une maladie animale infectieuse, d'évolution chronique. Elle est due à *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) principalement mais aussi *M. tuberculosis* (OIE, 2008a). Elle atteint préférentiellement les bovins mais peut être transmise à d'autres espèces de mammifères dont l'Homme (zoonose).

Dans les pays infectés, cette maladie engendre, quelle que soit sa prévalence, des difficultés socio-économiques, avec un impact sur les échanges internationaux d'animaux et de produits d'origine animale. Si la prévalence est élevée, cette maladie peut également provoquer d'importants problèmes de santé publique.

La maladie due à *M. bovis* ou *M. tuberculosis* est donc inscrite sur la liste unique des maladies réputées contagieuses (MRC) fixée selon l'article 223-21 du code rural. C'est une MRC chez toutes les espèces de mammifères (Décret n° 2006-177 du 17 février 2006 modifiant le code rural). En effet, le classement d'une maladie en tant que MRC se fonde sur son impact sur la santé publique, l'économie de l'élevage ou le commerce international (NS 6 mars 2006).

La Tb doit être déclarée à l'organisation mondiale de la santé animale, anciennement Office International des Epizooties (OIE) selon le code sanitaire pour les animaux terrestres (Site web [5] ; OIE, 2010a).

II.2. *Mycobacterium bovis*

M. bovis est un bacille petit, trapu et granuleux (Thorel M.F., 2003). C'est un pathogène intracellulaire obligatoire (des macrophages et autres cellules de type monocytique) bien qu'il puisse persister assez longtemps dans le milieu extérieur (Coetzer J.A.W. et Tustin R.C., 2004 ; Biet F. *et al.*, 2005 ; De la Rúa-Domenech R. *et al.*, 2006a). Il est micro-aérophile avec une croissance lente (temps de génération 16-20 heures (Site web [6])) et sa température optimale de croissance est de 37°C (Coetzer J.A.W. et Tustin R.C., 2004).

Sur milieu de culture de Löweinstein-Jensen, les colonies de *M. bovis* sont dysgoniques, non pigmentées et à la surface lisse, d'abord plates elles deviennent ensuite bombées et brillantes (en « gouttelette ») sans dépasser la taille d'une tête d'épingle (Thorel M.F., 2003). Par comparaison, les colonies de *M. tuberculosis* sont eugoniques avec un aspect en « chou-fleur », non pigmentées et à la surface rugueuse et sèche (Bourgoin A. et Agius G., 1995).

II.3. Aspect zoonotique

La tuberculose due à *M. bovis* est une zoonose qui sévit dans le monde entier (Sauret J. *et al.*, 1992 ; Moda G. *et al.*, 1996 ; Cosivi O. *et al.*, 1998 ; Thoen C., LoBue P. et de Kantor I., 2006 ; De la Rúa-Domenech R., 2006c ; De Kantor I.N. *et al.*, 2008 ; Michel A.L., Müller B. et Van Helden P.D., 2010).

Dans les pays où la Tb est endémique et en l'absence de programme de lutte, le risque de cas humains infectés par *M. bovis* est élevé. Au contraire, dans les pays où le dispositif de lutte s'est avéré efficace, la prévalence de Tb est faible et le risque de zoonose est alors rare, tel est le cas des pays industrialisés comme la France (Fritsche A. *et al.*, 2004 ; Biet F. *et al.*, 2005).

Ainsi, en France, avant l'obligation de pasteurisation du lait (1955) et d'abattage systématique des bovidés réagissant positivement à la tuberculine (1963), 25 % des élevages, soit 10 % des animaux étaient tuberculeux, et par conséquent, la tuberculose humaine due à *M. bovis* était très fréquente (en 1928, estimée à 10,7 % des cas de tuberculose humaine dont 23 % chez les enfants de moins de 16 ans). Par la suite, en raison de l'efficacité du dispositif français de lutte contre la Tb, sa prévalence a fortement diminué (0,1 % en 1994, 0,04 % en 2006) et par conséquent, la fréquence de tuberculose humaine due à *M. bovis* a également progressivement diminué. En effet, seuls des cas sporadiques sont désormais observés : de l'ordre de 0,5 % des cas de tuberculose humaine à culture positive en 1995 (Boulaïbal F. *et al.*, 1998) ; à Lyon entre 2000 et 2005, 11 souches ont été identifiées comme *M. bovis* parmi

les 555 souches du MTBC isolées d'échantillons humains (Mignard S., Pichat C. et Carret G., 2006). En outre, la majorité des cas français de tuberculose d'origine bovine est constatée chez des sujets âgés de plus de 50 ans, signe d'une infection ancienne qui se réactive avec l'âge (Mignard S., Pichat C. et Carret G., 2006). De plus, dans la majorité des cas, la localisation des lésions est extra-pulmonaire (Bouhbal F. *et al.*, 1998 ; Bénet J.J, 2008 ; Site web [8]). En 1994, Grange J.M. et Yates M.D. ont écrit que les voies génito-urinaires étaient le site de prévalence de ces lésions extra-pulmonaires.

La tuberculose humaine due à *M. bovis* a une évolution lente. D'abord sans symptôme, elle se signale tardivement par une fièvre modérée, une fatigue générale, un amaigrissement et des symptômes qui dépendent de la localisation infectieuse.

La transmission de *M. bovis* à l'homme s'effectue par inhalation d'aérosols contaminés (voie respiratoire) ou, par ingestion de lait cru ou produits au lait cru contaminés (voie orale) conduisant à des tuberculoses extra-pulmonaires (O'Reilly L.M. et Dabornb C.J., 1995; Biet F. *et al.*, 2005 ; Thoen C., LoBue P. et de Kantor I., 2006 ; De la Rua Domenech R., 2006c ; De Kantor I.N. *et al.*, 2008).

Ainsi, dans les pays où la Tb n'est pas contrôlée, ou dans les pays développés en l'absence de campagne de contrôle strict et de pasteurisation du lait, beaucoup de cas humains sont recensés chez les personnes jeunes (principalement des formes extra-pulmonaires), résultant principalement de l'ingestion de lait contaminé (Biet F. *et al.*, 2005 ; Thoen C., LoBue P. et de Kantor I., 2006 ; De la Rua Domenech R., 2006c ; De Kantor I.N. *et al.*, 2008).

En outre, la transmission de *M. bovis* à l'homme par aérosols peut survenir lors de contacts étroits avec des animaux domestiques ou sauvages contaminés (surtout dans les pays en voie de développement (Cosivi O. *et al.*, 1998)). De plus, ce risque concerne principalement les personnes présentant des déficiences immunologiques et les personnes dont la profession est dite « à risque » (risque d'exposition répétée des éleveurs, selon le niveau et la durée d'infection du cheptel), des vétérinaires sanitaires, des personnels d'abattoir (carcasse avec lésions ouvertes) ou de laboratoire (risque faible) (Bouhbal F. *et al.*, 1998 ; Cosivi O. *et al.*, 1998 ; Biet F. *et al.*, 2005 ; De la Rua Domenech R., 2006c ; De Kantor I.N. *et al.*, 2008 ; Wilkins M.J. *et al.*, 2008 ; Sunder S. *et al.*, 2009 ; Site web [7]).

Par ailleurs, la transmission de *M. bovis* de l'animal à l'Homme avec un retour à l'animal est connue depuis les années 1950. Par la suite, elle a été présentée dans la littérature (Fritsche A. *et al.* en 2004 ; Grange J.M. et Yates M.D., 1994 ; De la Rua Domenech R., 2006c).

Quant à la transmission interhumaine de la tuberculose à *M. bovis*, elle est possible (dans le cas d'hôte immunodéficient) mais rare (Grange J.M. et Yates M.D., 1994 ; Van Soolingen D. *et al.*, 1994 ; Biet F. *et al.*, 2005 ; Thoen C., LoBue P. et de Kantor I., 2006 ; Evans J.T. *et al.*, 2007 ; Sunder S. *et al.*, 2009 ; Michel A.L., Müller B. et Van Helden P.D., 2010).

II.4. Pathogénie et évolution de la Tb

II.4.1. Les conditions de l'infection d'un animal

Les conditions de l'infection d'un animal sont qualitatives et quantitatives.

II.4.1.1. Conditions qualitatives

M. bovis est un exemple typique d'agent pathogène de type généraliste, infectant un large spectre d'hôtes : la faune sauvage en captivité ou liberté, les animaux domestiques d'élevage ou pas, les primates non-humains et les humains (O'Reilly L.M. et Dabornb C.J., 1995 ; Wedlock D.N. *et al.*, 2002 ; Artois M. *et al.*, 2004). *M. bovis* est la seule espèce mycobactérienne parmi celles du MTBC, capable d'infecter le plus grand nombre d'espèces animales (O'Reilly L.M. et Dabornb C.J., 1995).

Outre le pouvoir pathogène de *M. bovis*, les conditions de l'infection dépendent de la réceptivité et la sensibilité de l'hôte qui varient selon plusieurs facteurs (âge, prédisposition génétique, état physiologique) (Humblet M.F., Boschioli M.L. et Saegerman C., 2009).

II.4.1.1.1. Age

L'un des principaux facteurs de risque individuel identifié par de nombreuses études est l'âge de l'animal. En effet, le risque d'infection s'accroît avec l'âge puisque la probabilité d'exposition augmente.

De plus, des animaux peuvent avoir été infectés très jeunes mais n'exprimer cliniquement la maladie qu'à l'âge adulte. Les mycobactéries sont donc capables de subsister à l'état latent pendant une longue période et se réactiver avec le vieillissement (Griffin J.M. *et al.*, 1996 ; Pollock J.M. et Neill S.D., 2002 ; Delafosse A., Goutard F. et Thébaud E., 2002 ; Humblet M.F., Boschioli M.L. et Saegerman C., 2009). Cependant, les scientifiques n'ont pas encore démontré qu'un état réel de latence existait dans la Tb (Van Rhijn I. *et al.*, 2008 ; Humblet M.F., Boschioli M.L. et Saegerman C., 2009).

II.4.1.1.2. Espèce, race, sexe

Toutes les espèces de mammifères terrestres sont sensibles à l'infection par *M. bovis*. Cependant, les bovins et caprins et, les cervidés, mustélidés et suidés (Artois M. *et al.*, 2004) seraient plus réceptifs (puisque ce sont les plus fréquemment infectés).

Par ailleurs, le caractère racial chez les bovins n'est pas évoqué avec certitude.

Enfin, l'analyse de la littérature ne montre pas de prédilection quelconque de *M. bovis* pour un sexe donné. Néanmoins, le mode d'élevage appliqué aux vaches laitières (stabulation et confinement prolongés) ainsi que le stress de la lactation et de la gestation les rendent plus vulnérables à l'infection par *M. bovis* que les mâles. De plus, elles sont conservées en général jusqu'à un âge plus avancé que les mâles dans l'élevage (Humblet M.F., Boschioli M.L. et Saegerman C., 2009).

II.4.1.1.3. Etat général

Certains auteurs ont montré que la résistance des animaux à *M. bovis* était réduite par des carences alimentaires et/ou une alimentation non équilibrée (Griffin J.M. *et al.*, 1996 cité par Humblet M.F., Boschioli M.L. et Saegerman C., 2009 ; Goodchild A.V. et Clifton-Hadley R.S., 2001)

Néanmoins, ces résultats sont controversés par d'autres auteurs qui ont montré qu'il n'était pas certain que les restrictions alimentaires aient un effet sur la transmission de la maladie (Costello E. *et al.*, 1998).

Il n'est donc pas possible de savoir à ce jour, si un faible état d'engraissement de l'animal (en anglais « *body condition score* ») est un facteur de risque ou plutôt une conséquence de la progression clinique de la Tb (Humblet M.F., Boschioli M.L. et Saegerman C., 2009).

Par ailleurs, comme nous l'avons dit précédemment, les animaux sont plus vulnérables à *M. bovis* en cas de modification de leur état physiologique (due à la lactation, à la gestation ou au stress) (Goodchild A.V. et Clifton-Hadley R.S., 2001 ; Pollock J.M. et Neill S.D., 2002).

II.4.1.1.4. Statut immunitaire

L'immunosuppression est un facteur de prédisposition à de nombreuses maladies. En effet, des bovins infectés par des virus immunosuppresseurs ou à immunodéficience seraient plus sensibles à *M. bovis*. Toutefois, ces effets relatifs au dysfonctionnement immunologique des

bovins n'ont pas été scientifiquement prouvés (Menzies F.D. et Neill S.D., 2000 ; Goodchild A.V. et Clifton-Hadley R.S., 2001 ; Pollock J.M. et Neill S.D., 2002 ; De la Rúa-Domenech R. *et al.*, 2006a ; Humblet M.F., Boschioli M.L. et Saegerman C., 2009).

II.4.1.1.5. Caractéristiques génétiques

L'importance d'une prédisposition génétique relative à la résistance contre la Tb commence seulement à être étudiée chez les bovins. En effet, des mécanismes d'immunité non spécifique pourraient détruire de faibles doses de *M. bovis* (macrophages non spécifiques actifs) et ainsi éviter l'infection par voie respiratoire (Menzies F.D. et Neill S.D., 2000 ; Phillips C.J. *et al.*, 2002 ; Meade K.G. *et al.*, 2007 ; Humblet M.F., Boschioli M.L. et Saegerman C., 2009).

II.4.1.1.6. Auto-contamination

Il est possible qu'un animal puisse s'auto-contaminer. En effet, un animal infecté par voie orale peut émettre des aérosols contaminés pendant le processus de rumination (Neill S.D. *et al.*, 1988 cité par Humblet M.F., Boschioli M.L. et Saegerman C., 2009). Ensuite, l'animal peut inhaler ces aérosols contaminés ce qui pourrait alors entraîner une infection respiratoire (Phillips C.J.C. *et al.*, 2003 cité par Humblet M.F., Boschioli M.L. et Saegerman C., 2009).

II.4.1.2. Conditions quantitatives

Le développement de l'infection dépend aussi de la dose minimale infectante de bacilles, variant principalement selon la voie de pénétration et l'espèce animale inoculée et, de la répétition des doses (Francis J., 1958 & 1971 ; Neill S.D., O'Brien J.J. et Hanna J., 1991 ; Buddle B.M. *et al.*, 1994 ; Menzies F.D. et Neill S.D., 2000 ; Goodchild A.V. et Clifton-Hadley R.S., 2001 ; Neill S.D., Bryson D.G. et Pollock J.M., 2001 ; Pollock J.M. et Neill S.D., 2002 ; Palmer M.V., Waters W.R. et Whipple D.L., 2002 ; Phillips C.J.C. *et al.*, 2003 ; Biet F. *et al.*, 2005 ; Palmer M.V. et Waters W.R., 2006b ; Van Rhijn I. *et al.*, 2008 ; Bénét J.J., 2008).

En effet, la dose infectante par voie respiratoire est largement plus faible que celle par voie orale/alimentaire (digestive). Lors de contamination par voie respiratoire, seuls quelques bacilles (< 6 contenus dans les aérosols) peuvent conduire chez de nombreuses espèces à une infection tuberculeuse. Au contraire, la dose nécessaire pour infecter des veaux par voie orale est de 4×10^8 bacilles selon Neill S.D., O'Brien J.J. et Hanna J. en 1991 (Menzies F.D. et Neill

S.D., 2000 ; Goodchild A.V. et Clifton-Hadley R.S., 2001 ; Neill S.D., Bryson D.G. et Pollock J.M., 2001 ; Gannon B.W., Hayes C.M. et Roe J.M., 2007).

En outre, alors que l'inoculation d'une dose unique de bacilles tuberculeux peut n'entraîner que des lésions bénignes évoluant vers la stabilisation, des doses plus faibles mais répétées dans le temps, loin de susciter le développement d'une immunité, favorisent l'apparition d'une tuberculose évolutive (Bénet J.J., 2008).

II.4.2. Les étapes de l'infection

D'un point de vue pathogénique, la Tb a une incubation lente, d'évolution chronique et est habituellement caractérisée par la formation de granulomes nodulaires ou tubercules.

La **primo-infection** (Figure I.1.2) correspond à la première contamination d'un individu non immunisé, c'est-à-dire à la pénétration dans l'organisme de bacilles tuberculeux qui sont ensuite rapidement phagocytés par les macrophages (*réponse non spécifique*). Alors qu'une partie seulement des bacilles est détruite, l'autre partie se multiplie dans les cellules qui les ont phagocytés (Thorel M.F., 2003 ; Bénet J.J., 2008).

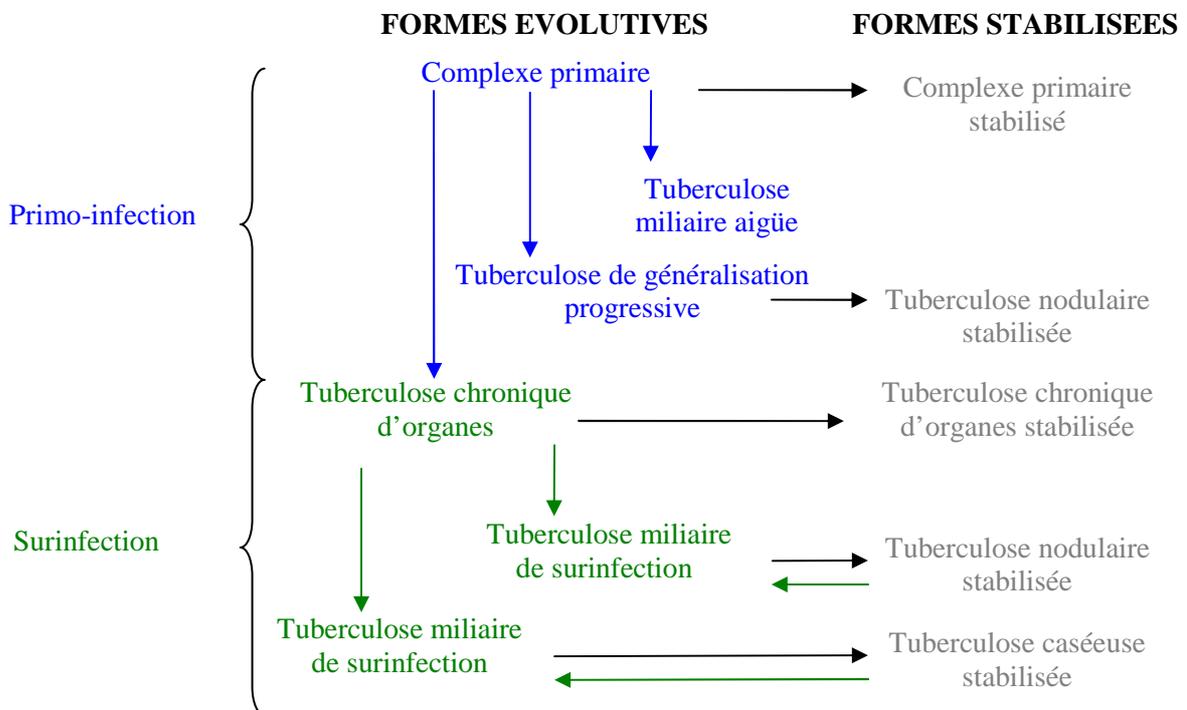


Figure I.1.2. Représentation schématique de la pathogénie et évolution de la Tb (cycle de Runyon), d'après Thorel M.F., 2003.

Cette primo-infection se caractérise par un « complexe primaire » qui comprend une lésion initiale, le chancre d'inoculation (visible à 8-15 jours) diversement localisé selon la voie de l'infection puis, l'adénopathie du nœud lymphatique correspondant. Les trois évolutions possibles de ce complexe primaire sont : une guérison, une stabilisation ou une généralisation précoce. (Radostits O.M., Blood D.C. et Gay C.C., 1994 ; Thorel M.F., 2003 ; Bénet J.J., 2008).

En effet, dans certains cas défavorables, comme le passage par la voie lympho-hématogène des bacilles, une tuberculose de généralisation apparaît alors précocement. Elle se traduit par une *tuberculose miliaire aiguë* et disséminée rapidement ou bien une *tuberculose de généralisation progressive* (d'évolution lente) par poussées aiguës (Thorel M.F., 2003; Panteix G., 2007).

Cependant, ces formes peuvent passer à l'état quiescent, caractérisé soit par une calcification des lésions (visible à 2 semaines), soit par un enkystement, soit par un remaniement fibreux. Ces formes peuvent demeurer en l'état toute la vie de l'animal ou donner lieu à une généralisation tardive (Radostits O.M., Blood D.C. et Gay C.C., 1994 ; Thorel M.F., 2003; De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006a).

Chez les bovins, la primo-infection est généralement asymptomatique et sera révélée par une réaction tuberculique positive (résultant d'une *réponse immune acquise*) (Panteix G., 2007).

Après cette primo-infection, une **surinfection** endogène ou exogène (Figure I.1.2) peut donner lieu à une *tuberculose chronique d'organes* si les défenses de l'organisme sont efficaces. Dans le cas d'un affaiblissement général, la surinfection se propage traduisant une tuberculose de généralisation tardive : *tuberculose miliaire aiguë* ou *tuberculose caséuse de surinfection*. Cependant, ces deux formes sont susceptibles de stabilisation définitive ou d'une poussée évolutive (Thorel M.F., 2003).

Les signes cliniques observés chez les animaux atteints de Tb ne sont pas pathognomoniques (De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006a).

II.5. Epidémiologie de la Tb

L'épidémiologie est l'étude des maladies et des facteurs de santé dans une population. L'étude épidémiologique de la Tb comprend une démarche (descriptive, analytique et synthétique) visant à lutter contre la maladie (Toma B. *et al.*, 2001).

II.5.1 Epidémiologie analytique

La Tb peut être transmise à partir de multiples sources de contagion et selon différents modes de contamination (MRC).

II.5.1.1. Les sources de contagion

➤ La principale source de contagion de la Tb est un animal infecté qu'il soit malade ou non. Le rejet de *M. bovis* est précoce, durable (durant toute l'évolution de la maladie), important (surtout si lésions « ouvertes ») et irrégulier (varie en intensité dans le temps).

Toutefois, l'importance épidémiologique des types d'excrétion et de sécrétion dépend en principe de la localisation de l'infection.

En effet, le jetage, la salive et les expectorations provoquent la dispersion dans l'atmosphère de gouttelettes contenant quelques bacilles tuberculeux responsables d'une transmission aérienne. Les aérosols constituent la plus importante source de contagion ; la localisation de l'infection étant pulmonaire dans la majorité des cas de Tb chez les bovins et petits ruminants (Francis J., 1958 & 1972 ; McIlroy S.G., Neill S.D. et McCracken R.M., 1986 ; Neill S.D. *et al.*, 1988 & 1989 ; Menzies F.D. et Neill S.D., 2000 ; Neill S.D., Bryson D.G. et Pollock J.M., 2001 ; Pollock J.M. et Neill S.D., 2002 ; Palmer M.V., Waters W.R. et Whipple D.L., 2002 ; Biet F. *et al.*, 2005 ; Gannon B.W., Hayes C.M. et Roe J.M., 2007 ; Van Rhijn I. *et al.*, 2008 ; Bénet J.J. *et al.*, 2008). Les aérosols ont donc un rôle épidémiologique très important.

En outre, les fèces et les urines sont des sources de contagion dans le cas de tuberculose digestive et rénale respectivement (Morris R.S., Pfeiffer D.U. et Jackson R., 1994 ; Menzies F.D. et Neill S.D., 2000 ; Goodchild A.V. et Clifton-Hadley R.S., 2001 ; Pollock J.M. et Neill S.D., 2002 ; Bénet J.J. *et al.*, 2008 ; Humblet M.F., Boschioli M.L. et Saegerman C., 2009).

Parmi les sécrétions à l'origine de contamination, on retrouve le lait lors d'infection mammaire (Morris R.S., Pfeiffer D.U. et Jackson R., 1994 ; Menzies F.D. et Neill S.D., 2000 ; Pollock J.M. et Neill S.D., 2002 ; Bénet J.J. *et al.*, 2008). Cependant, une excrétion de bacilles tuberculeux dans le lait est possible même en l'absence de lésion macroscopique (sans mammite tuberculeuse). Bien que la quantité bacillaire soit irrégulière et plus faible que dans le cas d'une mammite tuberculeuse, elle joue un rôle significatif dans la transmission de l'infection aux veaux et à l'homme.

En outre, les sécrétions génitales peuvent également constituer des éléments de contagion en cas d'infection génitale (virulence du sperme lors d'infection du testicule ou des sécrétions utérines lors de métrites contagieuses) (Francis J., 1958 ; Bénet J.J. *et al.*, 2008).

Par ailleurs, la contamination peut se produire directement à partir des tissus lésés, en particulier les ganglions et organes. La contagiosité du sang est rare et transitoire (lors d'épisodes aigus et surtout à la phase terminale de la maladie). Les muscles (viande) ne sont considérés comme à risque dès lors que les lésions sont généralisées ou une lésion ganglionnaire est à proximité ou bien si l'animal est en phase de bacillémie. Ceci conduit à des saisies partielles ou totales des carcasses à l'abattoir dans les règles européennes d'inspection. Le risque est donc négligeable tout au moins en Europe (Food Safety Authority of Ireland, 2008).

Il faut enfin souligner que la dangerosité de la contagion dépend aussi de la nature des lésions. En effet, les formes dites ouvertes (tuberculose du poumon, de l'intestin, de l'utérus, de la mamelle) sont plus dangereuses. Néanmoins, il est possible qu'un animal tuberculeux puisse excréter des quantités faibles de bacilles mais en quantité suffisante pour assurer la contagion, en dehors de toute localisation d'une forme ouverte.

➤ les sources secondaires de contamination sont présentes dans le milieu extérieur.

Il s'agit le plus souvent d'éléments en relation avec l'alimentation. En effet, le front d'ensilage, le bol de complément minéral vitaminé, la palette d'un abreuvoir automatique, la pierre à sel sont autant d'éléments jouant un rôle très important dans la diffusion de la maladie dans un élevage bovin. Il en est de même pour les parois (murs de locaux, bétailières), le fumier, les pâturages (Goodchild A.V. et Clifton-Hadley R.S., 2001 ; Phillips C.J.C. *et al.*, 2003 ; Humblet M.F., Boschioli M.L. et Saegerman C., 2009).

Cependant, le rôle du milieu extérieur dans la contagion dépend de la durée de survie des mycobactéries : bien qu'il s'agisse de bactéries non sporulées, elles peuvent survivre des mois (Duffield B.J. et Young D.A., 1985 ; O'Reilly L.M. et Daborn C.J., 1995 ; Goodchild A.V. et Clifton-Hadley R.S., 2001 ; Phillips C.J.C. *et al.*, 2003 ; Humblet M.F., Boschioli M.L. et Saegerman C., 2009).

En effet, *M. bovis* peut survivre six mois dans la terre, jusqu'à quatre cent jours approximativement dans l'eau courante, de sept à vingt huit jours dans les pâturages selon la température (effet négatif pour des températures élevées). De même, les bouses de bovins contaminés peuvent rester infectieuses jusqu'à six mois l'été mais seulement deux mois

l'hiver, selon la température extérieure et la concentration en pathogènes des fèces (Phillips C.J.C, 2003).

II.5.1.2. Les modalités de contagion

La Tb est transmise selon différents modes de contagion et par diverses voies de pénétration.

II.5.1.2.1. Modes de transmission

La *transmission verticale* est la transmission de la mère tuberculeuse au fœtus (ou congénitale). Elle n'a jamais été réellement prouvée bien qu'on pense qu'elle soit en cause lors de découverte de cas graves de tuberculose hépatique chez de très jeunes veaux (Thorel M.F., 2003). Une transmission pseudo-verticale, par contact étroit entre la mère infectée et le jeune sain, ainsi que via l'ingestion de colostrum et/ou de lait maternel, expliquerait la contamination des jeunes animaux (Phillips C.J.C., 2003).

La *transmission horizontale* peut être *directe* ou *indirecte*.

La *transmission directe* s'opère par des contacts étroits et prolongés entre un individu sain et un individu infecté, par exemple, lors de confinement d'animaux (Costello E. *et al.*, 1998). En effet, lors de la cohabitation à l'étable, le contact muflé à muflé joue un rôle crucial dans la transmission de la maladie. Dans le cas d'une stabulation entravée, ce sont les vaches voisines qui sont infectées alors qu'en stabulation libre, les contacts sont très nombreux et le risque est donc plus élevé.

Par ailleurs, les comportements des bovins au pâturage, comme le phénomène de reconnaissance des bovins par des contacts muflé à muflé, peuvent accroître le risque de diffusion de l'infection.

La *transmission indirecte* s'effectue par l'intermédiaire du milieu extérieur contaminé (locaux, pâturages, fèces, eaux, aliments, lait).

II.5.1.2.2. Voies de pénétration

La voie d'entrée de *M. bovis* peut être déduite du type de lésions observées sur l'animal *post mortem* (à l'abattoir). En effet, des animaux portant seulement des lésions sur la cavité thoracique sont supposés avoir été infectés par inhalation d'aérosols tandis ceux avec des lésions au niveau des ganglions mésentériques laissent penser qu'ils auraient été infectés par ingestion. Or la majorité des lésions est détectée au niveau du tractus respiratoire et aux ganglions associés (Francis J., 1958 & 1972 ; Menzies F.D. et Neill S.D., 2000 ; Neill S.D.,

1988 & 1989 ; Neill S.D., Bryson D.G. et Pollock J.M., 2001 ; Pollock J.M. et Neill S.D., 2002 ; Biet F. *et al.*, 2005 ; Bénet J.J. *et al.*, 2008).

La *voie respiratoire* est donc considérée comme la voie de pénétration la plus fréquente et redoutable chez les bovins et l'Homme (Francis J., 1958 & 1972 ; Neill S.D. *et al.*, 1994b ; O'Reilly L.M. et Dabornb C.J., 1995 ; Menzies F.D. et Neill S.D., 2000 ; Pollock J.M. et Neill S.D., 2002 ; Biet F. *et al.*, 2005 ; Palmer M.V. et Waters W.R., 2006b ; Van Rhijn I. *et al.*, 2008 ; Bénet J.J. *et al.*, 2008). L'introduction du bacille se fait par inhalation de microparticules (aérosols de 3 à 7µm comportant les bacilles) qui se déposent dans les alvéoles pulmonaires où les défenses immunitaires sont les plus faibles et par conséquent où les bacilles vont se multiplier (Pollock J.M. et Neill D., 2002 ; Bénet J.J., 2008).

La *voie alimentaire (ou digestive)* est considérée comme secondaire, avec des formes de lésions mésentériques retrouvées en nombre faible dans les cas bovins (Neill S.D. *et al.*, 1994b ; Menzies F.D. et Neill S.D., 2000 ; Neill S.D., Bryson D.G. et Pollock J.M., 2001 ; Pollock J.M. et Neill S.D., 2002 ; Biet F. *et al.*, 2005 ; Thoen C., LoBue P. et de Kantor I., 2006). La contamination s'effectue par ingestion d'aliments, comme le lait, l'herbe, contaminés par des doses bacillaires massives.

Enfin, la littérature concernée présente d'autres voies de pénétration telles que les *voies vénérienne* (notamment par les inséminations artificielles ou le transfert d'embryon (Roumy B., 1966 ; OIE, 2010cd)), *cutanée* (par piqûre ou souillure de plaies) (Francis J., 1958) et *conjonctivale* (Liesegang T.J. et Cameron J.D., 1980).

II.5.2. Mécanisme de diffusion de la Tb dans un élevage

II.5.2.1. Facteurs causaux de survenue de la Tb dans un élevage

De manière générale, la contamination d'un troupeau résulte de l'un et/ou l'autre des trois mécanismes suivants (Toma B. *et al.*, 2001 ; Bénet J.J., 2008), représentés par la figure I.1.3 :

- la contamination par **introduction** d'un animal,
- la contamination de **voisinage**,
- la **résurgence**.

L'importance respective de chacun des facteurs causaux dépend des conditions épidémiologiques locales (Bénet J.J., 2008).

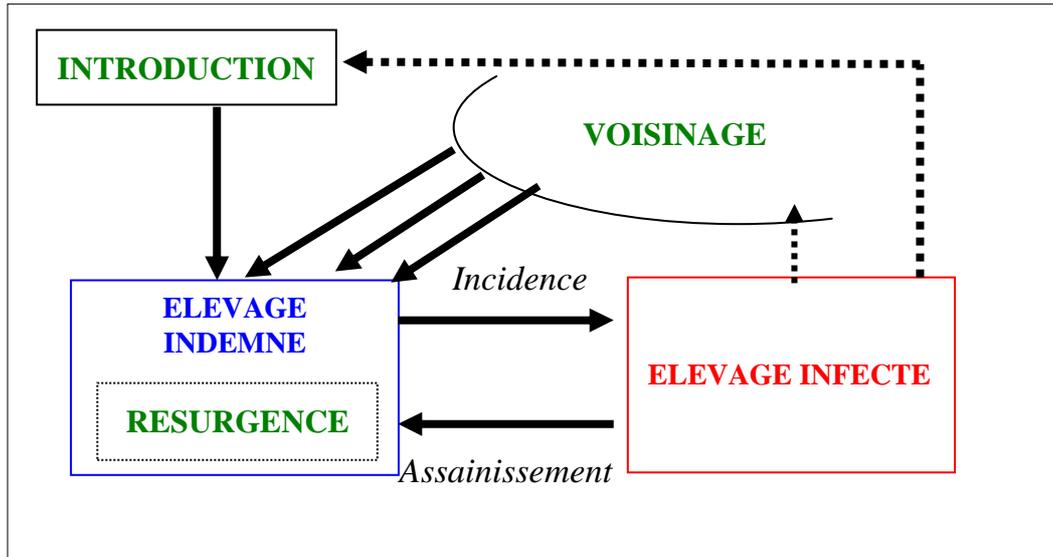


Figure I.1.3. Modèle explicatif des mécanismes de survenue de la Tb dans un élevage indemne (Bénet J.J., 2008).

II.5.2.1.1. L'introduction d'un animal

L'introduction dans le cheptel d'un animal infecté peut se produire lors d'un achat mais aussi d'un prêt ou d'une prise en pension (Griffin J.M. *et al.*, 1996 ; Menzies F.D. et Neill S.D., 2000 ; Goodchild A.V. et Clifton-Hadley R.S., 2001 ; Bénet J.J. 2008 ; Humblet M.F., Boschioli M.L. et Saegerman C., 2009). Dans ce cas l'animal infecté introduit peut avoir été contaminé dans son cheptel d'origine ou bien lors de son transfert (mouvement décrit par Phillips C.J.C. *et al.*, 2003 ; Humblet M.F., Boschioli M.L. et Saegerman C., 2009) et en particulier si le trajet n'est pas direct. Par exemple, l'animal peut avoir été stocké dans un centre de rassemblement et, ainsi, avoir été contaminé par d'autres animaux infectés d'un autre cheptel.

En outre, il faut également souligner le risque de contamination par réintroduction d'un animal. En effet, on peut donner l'exemple suivant : lorsqu'un animal d'un cheptel indemne quitte l'exploitation le matin en raison d'un concours agricole ou d'une mise en pension ou de transhumance [rassemblement avec d'autres animaux (qui peuvent être infectés) provenant d'autres cheptels] et retourne dans l'exploitation le soir, il peut avoir été infecté et peut alors contaminer le cheptel ensuite.

Le risque de contamination par introduction est à la fois proportionnel à la prévalence de la maladie dans la zone ou le pays concerné et inversement proportionnel à l'intensité des mesures de prévention appliquées pour contrôler tous les flux entrants (Toma B. *et al.*, 2001).

II.5.2.1.2. Le voisinage

Le voisinage, c'est-à-dire la proximité et le « bon voisinage », constitue également un mécanisme majeur de la survenue de Tb dans un élevage indemne.

➤ La proximité :

En effet, la proximité avec un cheptel bovin voisin infecté constitue un facteur de risque important. La contamination se produit alors par contacts directs entre animaux (pâtures mitoyennes ou communes) ou indirects (diffusion par l'air ou par l'eau (ruisseau « commun » traversant ou séparant deux exploitations)) (Denny G.O. et Wilesmith J.W., 1999 ; Goodchild A.V. et Clifton-Hadley R.S., 2001 ; Phillips C.J.C. *et al.*, 2003 ; Humblet M.F., Boschioli M.L. et Saegerman C., 2009).

De même, les animaux sauvages et les animaux domestiques autres que les bovidés infectés peuvent également être à l'origine de la contamination (par contacts directs ou indirects) d'un élevage indemne.

En effet, il existe un risque de transmission du bacille tuberculeux à un élevage indemne par contact avec des animaux domestiques infectés, autres que les bovidés, provenant de la même exploitation ou d'une exploitation voisine. Dans les pays développés, la surveillance doit s'orienter sur les chiens et chats, les élevages caprins, de cervidés (Nouvelle Zélande (Lugton I.W. *et al.*, 1997 ; Griffin J.F.T. et Mackintosh C.G., 2000), équins (en Camargue par exemple), alors que dans les pays en développement, elle devrait porter sur toutes les espèces domestiques (mammifères) (Humblet M.F., Boschioli M.L. et Saegerman C., 2009).

En outre, les populations sauvages sont considérées comme des réservoirs non négligeables de Tb dans le monde (Morris R.S., Pfeiffer D.U. et Jackson R., 1994 ; Artois M. *et al.*, 2004 ; Haddad M., Masselot M. et Durand B., 2004a ; Corner L.A.L., 2006 ; Hénault S., Karoui C. et Boschioli M.L., 2006 ; Site Web [5]).

En effet, bien que l'infection ait été contrôlée dans la plupart des pays développés, l'élimination complète est compliquée par l'infection persistante chez les animaux sauvages tels que :

- le blaireau (*Meles meles*) au Royaume-Uni et en République d'Irlande (Savey M., 2004 ; Scantlebury M. *et al.*, 2004),

- le cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus*) aux Etats-Unis, dans l'Etat du Michigan (Palmer M.V, Waters W.R. et Whipple D.L., 2004),

- le possum (*Trichosurus vulpecula*) ou phalanger renard en Nouvelle-Zélande (Wedlock D.N. *et al.*, 2002),
- le cerf (*Cervus elaphus*), le daim (*Dama dama*) et le sanglier (*Sus scrofa*) en Espagne (Aranaz A. *et al.*, 2004),
- le sanglier en Italie (Serraino A. *et al.*, 1999).

Concernant la France, le premier foyer sauvage de tuberculose à *M. bovis* a été découvert en 2001 chez les ongulés sauvages, en forêt de Brotonne, en Seine-Maritime (Hars J., 2002 ; Hars J. *et al.*, 2004 ; Zanella G., 2007 ; Zanella G. *et al.*, 2008). Ensuite, d'autres foyers ont été découverts en Corse, en Côte d'Or et dans les Pyrénées Atlantiques. Néanmoins, face à cette émergence de la tuberculose dans la faune sauvage, la prévalence nationale dans les cheptels bovins est faible (Hars J. *et al.*, 2006).

Le risque de contamination de voisinage dépend exclusivement de l'état sanitaire de la faune sauvage environnante ou des élevages voisins de l'élevage considéré (Toma B. *et al.*, 2001).

➤ Le « bon voisinage »

Il faut également souligner le risque lié au « bon voisinage » dans lequel l'Homme joue un rôle actif : prêt, échange de services, de matériels et d'animaux, fourniture d'aliments, visites (Toma B. *et al.*, 2001 ; Bénét J.J., 2008).

II.5.2.1.3. La résurgence

La résurgence d'une infection ancienne, c'est-à-dire la réapparition de la Tb dans un élevage anciennement atteint puis assaini sans nouvelle introduction de *M. bovis*, constitue un facteur de risque important pour ce dernier (Griffin J.M. *et al.*, 1996). Ainsi, après un précédent foyer de tuberculose, la récurrence est liée à la persistance à bas bruit du bacille sur des animaux contemporains de l'infection (sans révélation allergique ou clinique car infection latente) ou la présence de sources secondaires contaminées malgré la désinfection (fumier, ensilage, pâture) voire à un réservoir humain (Humblot M.F., Boschioli M.L. et Saegerman C., 2009).

La résurgence de la maladie est le signe d'un manque d'efficacité des procédés d'assainissement.

II.5.2.2. Facteurs de risque en élevage

Le type, la taille et la conduite des élevages constituent des facteurs de risque interagissant sur les trois mécanismes (introduction, voisinage, résurgence) de survenue de l'infection dans un élevage indemne.

➤ Type d'élevage

Les niveaux de risque diffèrent selon le type d'élevage. Des études montrent que les cheptels laitiers sont plus susceptibles que les cheptels allaitants car le renouvellement des animaux, et par conséquent le risque d'introduction, est plus important qu'en élevage allaitant. Néanmoins, dans les élevages allaitants, il existe un risque important lié à l'introduction de taureau pour la reproduction alors qu'en élevage laitier, l'insémination artificielle est plus souvent utilisée.

De plus, comme les animaux des élevages allaitants ont une plus grande durée de vie dans l'exploitation (jusqu'à 12 ans alors qu'une vache laitière est réformée à 5-6 ans), il existe donc un risque lié à la résurgence d'une infection latente (Barlow N.D., 1997 cité par Humblet M.F., Boschioli M.L. et Saegerman C., 2009). De plus, dans ces élevages, le risque lié au voisinage est important (contacts plus nombreux en prairie).

➤ Taille du cheptel

Plus la taille d'un cheptel est grande, plus le risque d'interaction avec un animal infecté (réservoir) du cheptel est élevé, quels que soient les pays (développés ou en développement) (Griffin J.M. *et al.*, 1996 ; Goodchild A.V. et Clifton-Hadley R.S., 2001 ; Humblet M.F., Boschioli M.L. et Saegerman C., 2009 ; Brooks-Pollock E. et Keeling M., 2009).

De plus, l'augmentation de la taille de l'élevage requiert souvent un plus grand nombre de parcelles et par conséquent, ceci augmente la possibilité de contamination par le voisinage.

De même, le risque de contamination par introduction est accru par la grande taille de l'élevage car les flux entrants sont plus nombreux. Ceci est accentué dans les élevages laitiers (nombreux renouvellements).

Enfin, dans les cheptels de grande taille, les interventions humaines (vétérinaires, éleveurs) sont de fait réduites ce qui peut favoriser le risque de non détection d'un animal infecté et donc la persistance à bas bruit de l'infection.

La combinaison de ces facteurs de risque liés à la taille du cheptel montre que l'effet de la taille du cheptel est une situation critique à ne pas négliger.

➤ La conduite des élevages

Le confinement, la stabulation prolongée, la non-aération et l'ensoleillement des locaux (Goodchild A.V. et Clifton-Hadley R.S., 2001), les mauvaises conditions d'hygiène et d'alimentation (conditions de stockage de la nourriture) sont tous des facteurs favorisant l'apparition et la propagation de l'infection.

Par ailleurs, le fumier répandu dans les pâtures peut constituer un risque d'infection par voie orale en cas de doses élevées (Morris R.S., Pfeiffer D.U. et Jackson R., 1994). Ce risque est d'autant plus important si l'activité sur l'exploitation est limitée à l'élevage d'animaux (élevage exclusif) car l'exploitant ne disposant pas de champs, réalise l'épandage sur les prairies (où se trouvent les animaux).

De même, une fois que les fèces contaminées sont désagrégées dans l'herbe des prairies, les mycobactéries peuvent survivre très longtemps dans cet environnement et ainsi représenter une source d'infection. Néanmoins, l'excrétion de bacilles dans les fèces est peu fréquente et irrégulière (Neill S.D. *et al.*, 1988 ; Humblet M.F., Boschioli M.L. et Saegerman C., 2009).

II.5.3. Enquêtes épidémiologiques

Une enquête épidémiologique effectuée à l'échelle de l'élevage est destinée à élucider l'origine sa contamination et les modalités d'évolution dans cet élevage et les risques de diffusion (Bénet J.J., 2008).

Elle est basée sur trois études conjointes, conduites avec la plus extrême rigueur pour mettre en évidence tous les élevages qui ont pu être en relation avec le cheptel infecté (réalisées sur le cheptel infecté).

En effet, l'analyse de l'état sanitaire des élevages voisins de l'élevage infecté (pâtures communes ou contiguës, matériel en commun) ainsi que de la faune sauvage environnante permet de déterminer s'il existe un risque de contamination par le voisinage. De plus, l'analyse des flux entrants, antérieurs à la déclaration de l'infection, permet de rechercher l'existence d'une contamination par introduction d'animaux infectés (achetés ou empruntés) ou, d'aliments ou matériels contaminés. Enfin, la recherche d'une réapparition de la maladie par résurgence est réalisée à partir de l'analyse des données concernant l'état sanitaire du cheptel (et même de l'exploitation entière) avant l'infection.

En France, ces enquêtes s'appuient sur les données épidémiologiques fournies par le typage moléculaire des différentes souches isolées de *M. bovis*. En effet, l'identification de plusieurs souches de *M. bovis* dans une même zone ne permet pas d'établir de relation entre elles. Néanmoins, l'étude des marqueurs moléculaires de ces souches apportent des informations essentielles permettant d'établir ou d'exclure des relations. L'épidémiologie moléculaire contribue donc largement à la description et à l'analyse des phénomènes épidémiologiques. Par exemple, lors de la réapparition de la maladie au sein d'un élevage qui semblait assaini, l'observation de types différents au cours des deux épisodes de Tb plaide en faveur d'une réinfection. A l'inverse, l'observation de type identique est un argument en faveur d'une résurgence (Haddad N. *et al.*, 2004a).

Ainsi, l'élaboration d'une banque de données indiquant le lieu et la nature des génotypes retrouvés, associée aux données épidémiologiques fournies par les investigations de terrain, constitue donc un outil indispensable pour permettre de tracer l'origine de l'infection de cheptels, de confirmer ou exclure un lien épidémiologique entre des élevages infectés, de constater l'existence d'une co-infection (par deux isolats différents) dans un même élevage et même de suspecter l'intervention de vecteurs sauvages (Haddad N. *et al.*, 2001 et 2004a ; Durand B. *et al.*, 2004). De plus, la combinaison du spoligotypage avec d'autres techniques moléculaires (typage des VNTRs, cf. Annexe V) permet d'affiner la différenciation des isolats et ainsi de disposer d'un moyen très performant d'investigation épidémiologique (Durand B. *et al.*, 2004 ; Allix C. *et al.*, 2006).

Cependant, il est souvent difficile d'établir l'origine de la contamination d'un élevage. De même, lorsque l'on connaît son origine, ce n'est malheureusement pas toujours avec certitude.

III. Les méthodes de dépistage et diagnostic de la Tb

Le dépistage d'une maladie « consiste en la recherche systématique, à l'aide d'examen », dans un élevage, des animaux « atteints par un trouble de santé donné, passé jusque là inaperçu ».

Le diagnostic « lui, correspond à l'identification de la maladie chez un animal qui présente des troubles » (Toma B. *et al.*, 2001).

III.1. Les méthodes conventionnelles de dépistage et diagnostic de la Tb

III.1.1. Présentation des méthodes *ante mortem*: les tests tuberculiques

Les tests tuberculiques ou épreuves d'intradermotuberculation (IDT) sont basés sur la mise en évidence *in vivo* d'une réaction d'hypersensibilité retardée (HSR), suite à l'injection intradermique de tuberculines (protéines extraites de surnageant de cultures mycobactériennes et purifiées) chez un animal infecté par le bacille tuberculeux (De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006a).

En effet, un bovin infecté développe une réaction immunitaire à médiation cellulaire (macrophages et lymphocytes T en particulier). Trois à six semaines en moyenne après l'infection, l'HSR devient décelable par IDT (*période allergique*). Cette réaction spécifique est tardive, progressive et durable.

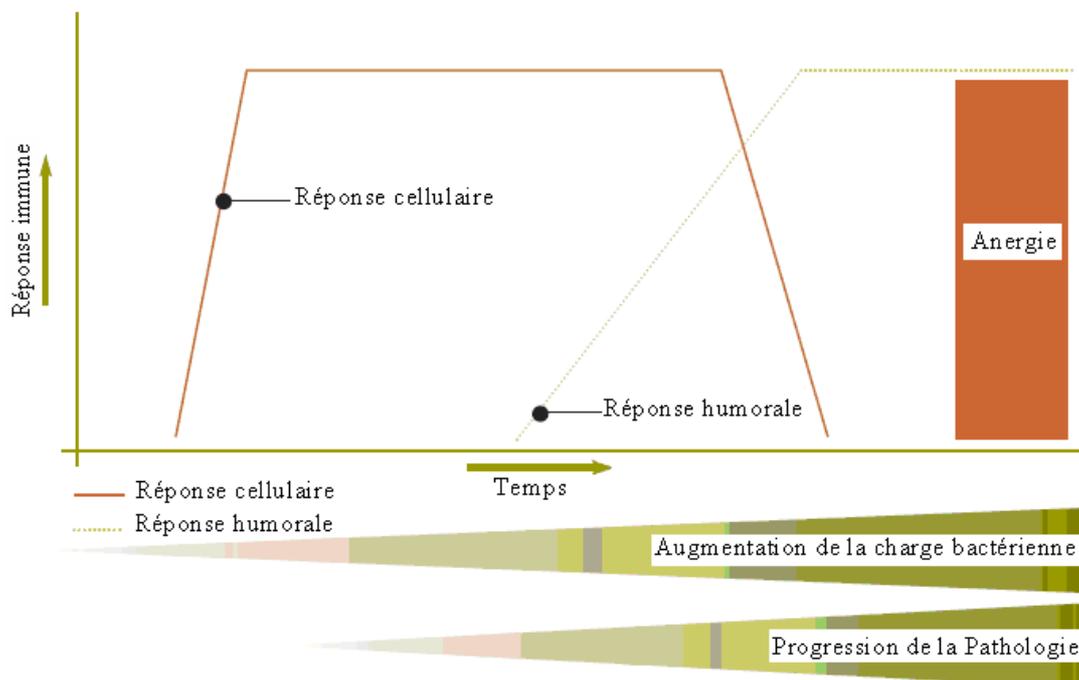


Figure I.1.4. Représentation graphique du spectre des réponses immunes de bovins au cours de l'infection à *M. bovis*.

Une réponse immunitaire à médiation cellulaire (*Réponse cellulaire*) se développe initialement alors que la réponse immunitaire à médiation humorale (*Réponse humorale* (par anticorps)) se déclenche plus tardivement, c'est-à-dire lorsque la densité bacillaire augmente et que la maladie progresse (*progression pathologique*). Enfin, une période d'anergie (*Anergie*) survient lorsque la tuberculose se généralise. Dans ce cas, la réponse cellulaire n'est plus détectée alors que celle à médiation humorale prédomine (Pollock J.M. *et al.*, 2001 ; Pollock J.M. et Neill D., 2002 et Vordermeier H.M. *et al.*, 2006b).

Néanmoins, lorsque la tuberculose est très avancée ou généralisée, la détection de l'infection par une méthode allergique n'est plus possible (*période d'anergie post-tuberculeuse*) (Figure I.1.4 ; Wood P.R. *et al.*, 1992 ; Pollock J.M. et Neill D., 2002 ; Bénet J.J., 2008 ; De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006a ; Vordermeier H.M. *et al.*, 2006b).

Deux types d'IDT sont employés : l'intradermotuberculation simple (IDS) et l'intradermotuberculation comparative (IDC). Un délai d'attente de six à huit semaines entre deux IDT est impératif afin d'éviter, au second test, une baisse de la réactivité des animaux sensibilisés (Bénet J.J., 2008).

Par ailleurs, avant la réalisation de chaque IDT, il est nécessaire de vérifier l'absence de grosseur ou de lésion au site d'injection. De plus, une tonte du lieu d'élection est fortement recommandée afin qu'il soit plus facilement repérable (Thorel M.F., 2003).

III.1.1.1. L'IDS

III.1.1.1.1. Principe de l'IDS

L'IDS est un test de dépistage de première intention. Il consiste à injecter dans l'épaisseur du derme de l'encolure (obligatoire en France) ou du pli sous-caudal, une dose de la tuberculine bovine (0,1 ml de dérivés protéiniques purifiés (PPD) bovins titré à 20 000 UCT/ml) et à apprécier la réaction obtenue au point d'injection après un délai de 72 h (Delafosse A., Goutard F. et Thébaud E., 2002).

Dans le cas d'une IDS pratiquée chez un bovin tuberculeux, une réaction inflammatoire provoquant une tuméfaction circulaire douloureuse et chaude (HSR), avec parfois un point de nécrose, apparaît progressivement de 24 à 72 h après l'injection puis, persiste plusieurs jours et s'estompe progressivement en une huitaine de jours (Bénet J.J., 2008). La réglementation européenne et française prévoit la possibilité d'interpréter en tenant compte de la présence de signes cliniques.

La lecture quantitative, recommandée, du test implique la mensuration de l'épaisseur du pli cutané à l'aide d'un cutimètre. Néanmoins, une lecture qualitative est généralement réalisée (visuel, palpation). Un éventail de lésions est également prévu par la réglementation européenne (annexe B de la version consolidée en janvier 2010 de la directive européenne 64/432/CEE). Toutefois, ceci est très rare depuis l'utilisation des PPD.

Si l'épaississement du pli de peau est supérieur à 2 mm, le résultat de l'IDS est alors considéré comme non-négatif – Le résultat est douteux pour un épaississement supérieur à

2 mm et inférieur à 4 mm ; Le résultat est positif pour un épaississement supérieur ou égal à 4 mm –.

A l'inverse, dans le cas d'une réaction cutanée faible (épaississement inférieur ou égal à 2 mm) ou en l'absence de réaction, le test est négatif (Thorel M.F., 2003 ; Bénét J.J., 2008 ; OIE, 2008a).

III.1.1.1.2. Avantages et inconvénients de l'IDS

L'IDS est facile à réaliser et moins coûteuse que les autres tests de dépistage. Elle est également inoffensive et non sensibilisante pour l'animal (voire même désensibilisante après plusieurs répétitions, d'après Coad M. *et al.*, 2010). La valeur médiane de la sensibilité individuelle de l'IDS est de 83,9 % sans tenir compte du site d'injection (valeurs variant de 63,2 % à 100 %, De la Rua-Domenech R. *et al.*, (2006a)). En effet, l'IDS réalisée à l'encolure est plus sensible mais moins spécifique que l'IDS pratiquée au pli sous-caudal (Monaghan M.L. *et al.*, 1994 ; De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006a).

De plus, comme ce test est utilisé à l'échelle du cheptel, il est très sensible (sensibilité proche de 1) car il suffit qu'un seul animal donne un résultat positif pour que le cheptel infecté soit détecté et considéré infecté (Bénét J.J., 2008).

Toutefois, la spécificité de l'IDS se dégrade lorsque l'on passe à l'échelle du cheptel puisque tous les animaux testés du cheptel doivent avoir un résultat négatif pour que celui-ci soit déclaré indemne. En effet, la spécificité individuelle de l'IDS ayant une valeur médiane de 96,8 % sans tenir compte du site d'injection (valeurs variant de 75,5 % à 99,0 %, De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006a) est relativement bonne alors que sa spécificité cheptel chute.

Il existe de nombreuses causes d'erreur par excès (Monaghan M.L. *et al.*, 1994), c'est-à-dire de réaction allergique à l'IDS chez un animal non tuberculeux (faux positif) : en particulier, la réaction croisée avec d'autres mycobactéries (*M. avium*, Mycobactéries atypiques), mais aussi une lecture trop précoce ou une interprétation abusive d'une réaction négative (Chenal R., 1994 ; Lauzi S. *et al.*, 2000).

III.1.1.2. L'IDC

III.1.1.2.1. Principe de l'IDC

L'IDC consiste à injecter dans l'épaisseur du derme de l'encolure des tuberculines bovines (B) et aviaires (A) en deux points séparés de 12-15 cm et à apprécier, au bout de 72 h, les

réactions aux points d'injection (Delafosse A., Goutard F. et Thébaud E., 2002 ; OIE, 2008a). L'interprétation du test est basée sur l'expression de deux résultats : celui obtenu pour l'épaississement du pli de peau après injection de tuberculine B et celui obtenu par la différence entre les épaisissements des plis après injection des tuberculines B et A (Tableau I.1.1), (Bénet J.J., 2008).

Tableau I.1.1. Grille de lecture de l'IDC (d'après Bénet J.J., 2008).

Tuberculine bovine	Différence d'épaissements entre réactions aux tuberculines bovine (B) et aviaire (A)	RESULTAT : « REACTION »
Si B > 2 mm	B – A > 4 mm	Positive
	B – A [1 – 4 mm]	Douteuse
	B – A < 1 mm	Négative
Si B ≤ 2mm	Quel que soit le résultat de B - A	Négative

III.1.1.2.2. Avantages et inconvénients de l'IDC

L'IDC a une sensibilité plus faible (52,0 % à 100 %, avec une valeur médiane de 80,0 % (93,5 % en cas d'interprétation rigoureuse, tenant compte des réactions positives et douteuses)) mais une meilleure spécificité (78,8 % à 100 %, avec une valeur médiane de 99,5 %) que l'IDS (données De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006a). En effet, l'IDC est utilisée pour différencier les animaux infectés par *M. bovis* de ceux sensibilisés à la tuberculine par une exposition à d'autres mycobactéries ou à un genre apparenté (OIE, 2008a).

Elle permet donc d'écarter le risque de réactions faussement positives dues à des infections par des mycobactéries autres que *M. bovis*.

Cependant, cette technique est matériellement plus coûteuse et également plus difficile à réaliser que l'IDS. De plus, le recours à l'abattage diagnostique et aux tests de laboratoire pour confirmer l'infection, en cas de résultat positif en IDC, entraîne des coûts supplémentaires.

III.1.2. Présentation des méthodes *post mortem* : Inspection sanitaire à l'abattoir, Histologie et Bactériologie

La recherche *post mortem* d'animaux tuberculeux est basée sur l'inspection de carcasses bovines pour la détection de lésions suspectes de Tb. Ensuite, les méthodes de diagnostic de laboratoire, telles que les examens histologiques et bactériologiques permettent de confirmer ou d'infirmer ces suspicions.

III.1.2.1. L'inspection *post mortem*

Les lésions suspectes de Tb découvertes, sur un animal mort, sont localisées le plus souvent au niveau des nœuds lymphatiques bronchiques, trachéobronchiques, rétropharyngiens et médiastinaux. De plus, les poumons, le foie, la rate sont communément affectés (OIE, 2008a).

Les lésions pulmonaires sont presque toujours de type nodulaire (tubercule gris, miliaire ou caséux). Le granulome tuberculeux a habituellement une apparence jaunâtre et une consistance caséuse, caséo-calcaire, ou calcifiée, ou occasionnellement une apparence purulente (OIE, 2008a).

Par ailleurs, la taille des lésions varie d'assez petite (invisible à l'œil nu), à l'implication d'une part importante de l'organe (OIE, 2008a).

III.1.2.2. L'examen histopathologique

L'examen histopathologique consiste en une analyse microscopique de calques directs à partir d'échantillons cliniques (présentant des lésions suspectes de Tb), et sur du matériel tissulaire préparé (OIE, 2008a).

Tout d'abord, plusieurs coupes histologiques sont effectuées afin de réaliser les différentes méthodes de coloration.

La coloration classique à l'hémalun-éosine (HE) est une des colorations histologiques de base (Corner L.A., 1994 ; Cassidy J.P. *et al.*, 1999 ; Watrelot-Virieux D. *et al.*, 2006 ; Varello K. *et al.*, 2008). Elle permet de se faire une idée sur l'aspect morphologique du tissu (Figure I.1.5 et Figure I.1.6).

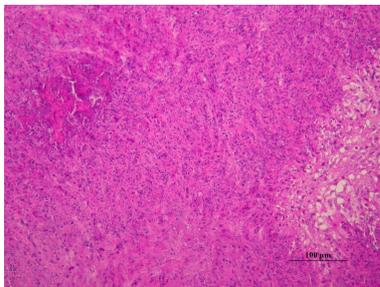


Photo A. Echelle précisée sur la photo en bas à droite : 100 µm

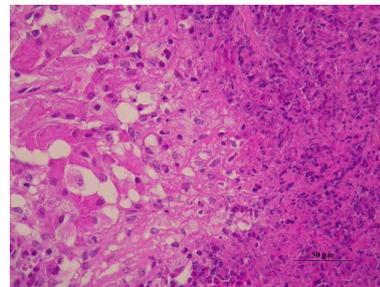


Photo B. Echelle précisée sur la photo en bas à droite : 50 µm

Figure I.1.5. Coloration HE montrant des lésions évocatrices de tuberculose bovine (Photographies A et B réalisées par le Dr Belli P., ENV Lyon).

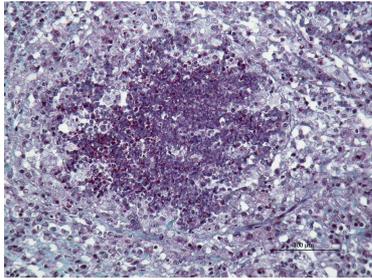


Photo A. Echelle précisée sur la photo en bas à droite : 100 µm

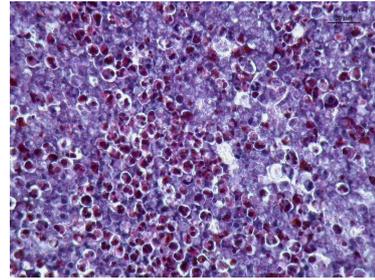


Photo B. Echelle précisée sur la photo en haut à droite : 20 µm

Figure I.1.6. Coloration HE montrant des lésions non tuberculeuses, un abcès (Photographies A et B réalisées par le Dr Belli P., ENV Lyon).

Une coloration de Ziehl-Neelsen, spécifique des BAAR doit être également réalisée (Gutiérrez C.M.M. et Martin J.F.G., 1993 ; Cassidy J.P. *et al.*, 1999 ; Watrelot-Virieux D. *et al.*, 2006 ; Cardoso M.A. *et al.*, 2007 ; OIE, 2008a ; Parra A. *et al.*, 2008 ; Varello K. *et al.*, 2008). En effet, lors de cette coloration, les acides mycoliques des mycobactéries (dont les bacilles tuberculeux) fixent directement la fuschine et la retiennent au niveau du cytoplasme, assurant ainsi l'intensité et la réfringence de la coloration. Ils constituent ensuite une barrière physique prévenant l'action décolorante de l'acide sulfurique et de l'alcool à 90° (Vincent V., 1995). Enfin, une contre-coloration au bleu de méthylène est réalisée. Les BAAR apparaissent alors roses sur fond bleu de la préparation. Ils sont retrouvés aussi bien dans le cytoplasme des macrophages épithélioïdes et des cellules géantes qu'au niveau de nécroses caséuses (Watrelot-Virieux D. *et al.*, 2006).

De plus, une autre technique spécifique des BAAR peut être réalisée en complément : la coloration à l'auramine O/rhodamine (AOR). Cette coloration repose sur le même principe que celle de Ziehl-Neelsen (ZN) mais les lames sont examinées au microscope à fluorescence et les mycobactéries émettent une fluorescence orange-jaune sur un fond noir (González Llamazares O.R. *et al.*, 1999a ; Watrelot-Virieux D. *et al.*, 2006). En outre, l'immunohistochimie (IHC) basée sur des anticorps monoclonaux anti-*M. bovis* peut être utilisée. Cette méthode consiste en une coloration des antigènes mycobactériens (liés aux anticorps anti-*M. bovis*) dans les coupes (Gutiérrez C.M.M. et Martin J.F.G., 1993 ; Cassidy J.P. *et al.*, 1999 ; Watrelot-Virieux D. *et al.*, 2006).

Cependant, la présence de BAAR dans ces coupes histologiques peut ne pas être détectée bien que *M. bovis* puisse être isolé en culture (OIE, 2008a). Cela est notamment dû au fait que non

seulement les tissus lésés présentent souvent peu de BAAR mais aussi que ces BAAR se trouvent en amas. Néanmoins, la technique immunohistochimique semble être plus sensible que les deux autres techniques (ZN et AOR) mais, elle est plus coûteuse et semble moins spécifique (Figure I.1.7) (Guttierez C.M.M. et Martin J.F.G., 1993 ; Watrelot-Virieux D. *et al.*, 2006).

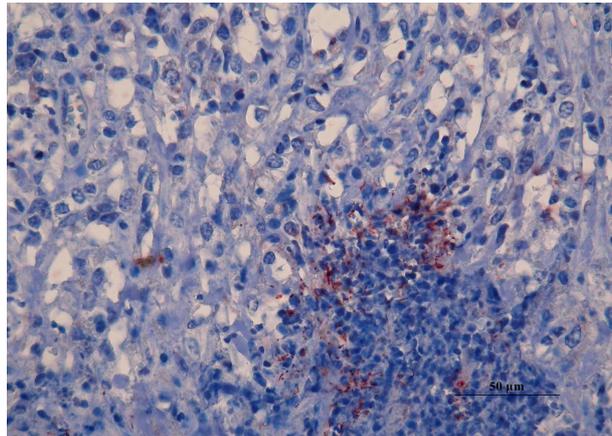


Figure I.1.7. Coupe immunohistochimique montrant des lésions évocatrices de tuberculose bovine (Photographie (échelle précisée en bas à droite : 50 µm) réalisée par le Dr Belli P., ENV Lyon).

En outre, les procédures de coloration, ZN et AOR, ne sont pas spécifiques des bacilles tuberculeux mais des mycobactéries en général (bactéries de la famille des *Mycobacteriaceae*).

Par conséquent, ces deux méthodes de coloration sont donc rapides mais elles manquent de spécificité et dans une moindre mesure de sensibilité pour confirmer le diagnostic de la Tb (Zumárraga M.J. *et al.*, 2005).

Toutefois, le diagnostic présomptif de mycobactériose peut être établi si le tissu présente des lésions histologiques caractéristiques : gros granulome (tubercule) avec au centre une zone de nécrose caséuse visible, entourée par des macrophages épithélioïdes associés aux cellules géantes multinucléées de Langhans et, en périphérie, des zones présentant des macrophages associés à des lymphocytes en amas et des neutrophiles dispersés près de la capsule fibreuse périphérique (Watrelot-Virieux D. *et al.*, 2006).

En résumé, l'examen histopathologique est donc un test de diagnostic de la Tb beaucoup plus rapide (résultat transmis sous une huitaine jours par rapport à la prise d'essai) et aussi sensible

que la bactériologie mais manquant considérablement de spécificité (WatreLOT-Virieux D. *et al.*, 2006).

III.1.2.3. L'examen bactériologique

L'examen bactériologique à partir d'échantillon de tissus lésés comprend l'isolement d'agent pathogène sur milieux de culture adéquats et l'identification de la souche à partir de coloration de ZN et de tests biochimiques et/ou moléculaires. Cette technique est la méthode de référence, le « Gold standard », pour diagnostiquer la maladie. Elle est sensible et très spécifique de *M. bovis* et permet le typage des souches par la suite. Néanmoins, la culture est délicate (laborieuse) et le délai de réponse est relativement long (3 mois) (Liébana E. *et al.*, 1995 ; Hénault S., Karoui C. et Boschioli M.L., 2006 ; Cardoso M.A. *et al.*, 2007).

Par ailleurs, les mycobactéries induisant la Tb sont considérées comme des microorganismes de classe 3. Cette classe comprend en effet, les microorganismes pathogènes à haut risque ne devant être manipulés que par des microbiologistes spécialement formés et vaccinés (si le vaccin existe). De plus, un laboratoire de confinement ou niveau de sécurité biologique 3 (NSB3) est obligatoire pour la manipulation de produits susceptibles de contenir ces agents pathogènes de catégorie 3 (Programme N°116/02, version en vigueur de 2003).

III.1.2.3.1. La Culture

La méthode pour la recherche des bacilles tuberculeux par culture (exposée dans ce travail) sur milieu solide est celle recommandée par la norme NF U 47-104 (version en vigueur de 2003) (Cf. Annexe III).

III.1.2.3.1.1. Les traitements des échantillons

L'isolement des mycobactéries à partir de prélèvements souillés nécessite la mise en œuvre préalable de procédés spécifiques de décontamination susceptibles de concilier une action énergique à l'égard de la flore banale et une agressivité très faible vis-à-vis des BAAR. (Thorel M.F., 1982). En effet, la culture des mycobactéries à croissance lente, comme *M. bovis*, peut être masquée par le développement plus rapide des bactéries contaminantes.

Le choix du traitement de ces produits pathologiques pluri-microbiens (mycobactéries associées à d'autres germes pathogènes et commensaux), avant la mise en culture, est

fonction de la nature même de ces produits (tissus, lait, fèces, eaux, expectorations, prélèvements de l'environnement) (Cf. Annexe I).

De plus, le temps de contact entre le prélèvement et l'agent de décontamination est critique car la résistance des mycobactéries n'est pas absolue. En effet, il s'agit de détruire la flore indésirable pour éviter les contaminations ultérieures des cultures sans pour autant détruire les mycobactéries. Toutefois, cette étape entraîne inévitablement une perte bien que minimale de sensibilité de la culture mycobactérienne.

L'action de ces agents est toujours suivie d'une phase de neutralisation (Euzeby J.P., Site web [2g]).

L'agent chimique approprié pour la décontamination des échantillons de tissus bovins (ganglion, poumon, foie,...), préconisé par le Laboratoire national de référence de la Tb en France, l'Afssa-Lerpaz et par la norme AFNOR (Association Française de Normalisation) NF U 47-104 relative à l'isolement des mycobactéries autres que *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* chez l'animal (AFNOR, 2003), est l'acide sulfurique à 4 %. En effet, selon Grumbach en 1966, il convenait parfaitement à la décontamination des tissus. De plus, l'étude de Thorel M.F. et Boisvert H. en 1976, avait montré son efficacité, c'est-à-dire la sensibilité des mycobactéries à croissance rapide et la relative résistance des mycobactéries à croissance lente (notamment tuberculeuses) vis-à-vis d'un traitement de 10 minutes à l'acide sulfurique à 4 % (Thorel M.F. et Boisvert H., 1976).

III.1.2.3.1.2. Les milieux de culture

Les mycobactéries, relativement résistantes aux agressions chimiques et physiques, se différencient de la plupart des autres germes par leurs exigences métaboliques (Thorel M.F., 1982). La culture des bacilles tuberculeux est réalisée sur des milieux sélectifs tels que les milieux solides à l'œuf de Löwenstein-Jensen[®] (LJ) et de Coletsos[®] (Col) (Cf. Annexe II).

Il existe également des milieux de culture liquides spécifiques tels que Bactec, MGIT. Cependant, ils ne sont à ce jour utilisés qu'en santé humaine. En effet, ces milieux ont été développés pour le diagnostic humain et par conséquent, ont été adaptés aux différents types d'échantillons humains (expectoration, tissus (biopsie) souvent moins contaminés par une flore indésirable que les prélèvements animaux) et en particuliers à leurs méthodes de décontamination.

III.1.2.3.2. L'identification de l'agent pathogène.

L'identification de l'agent pathogène à partir de colonies isolées s'effectue par un ensemble de tests : A partir de la primo-culture (sur milieu LJ ou Col), la coloration de ZN pour l'aspect microscopique des BAAR et à partir de subcultures, des épreuves biochimiques permettant la détermination des caractères phénotypiques – c'est-à-dire des caractères cultureux : selon la classification de Runyon, la vitesse de croissance, la température optimale croissance et la pigmentation, ainsi que la croissance en présence d'inhibiteurs ou gélose ordinaire – et des caractères enzymatiques (plusieurs enzymes testées) (méthode utilisée par l'Afssa-Lerpaz, selon David H., Levy-Frebault V. et Thorel M.F., 1989) (Cf. Annexe IV).

Cependant, les tests enzymatiques sont peu à peu remplacés par un ensemble de tests plus rapides, c'est à dire des analyses PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou réaction de polymérisation en chaîne) spécifiques des agents pathogènes recherchés (Cf. Annexe IV).

III.1.2.4. Le typage moléculaire des isolats de *M. bovis*

Après l'identification de *M. bovis*, le typage moléculaire de ces isolats peut être réalisé afin d'affiner la caractérisation des souches.

Le typage moléculaire de *M. bovis* s'avère très utile dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques. Il permet de distinguer entre eux des isolats de *M. bovis* d'origine différentes et ainsi de préciser les sources probables d'infection (Durand B. *et al.*, 2004).

Les techniques de typages moléculaires des mycobactéries du MTBC (en particulier *M. bovis*) les plus utilisées sont le spoligotypage et le typage sur base de VNTRs (Variable Number Tandem Repeats ou séquences répétées en tandem en nombre variable). Ces techniques standardisées présentent un bon équilibre entre leur capacité de discrimination et leur stabilité (Allix C. *et al.*, 2006 ; Walravens K. *et al.*, 2006) (Cf. Annexe V).

III.2. Les méthodes complémentaires et nouveaux outils de diagnostic de la Tb

III.2.1. Les méthodes *in vitro* de diagnostic *ante mortem*

Face à certaines limites que présentent les IDT, d'autres tests, basés cette fois-ci sur l'étude *in vitro* de la réponse cellulaire, se sont développés, comme le test de dosage d'interféron gamma. L'exploration de la réponse humorale, bien que non protectrice face à une infection

de tuberculose, semble aussi dans certains cas présenter un intérêt par rapport aux méthodes conventionnelles.

III.2.1.1. Le sérodiagnostic de la Tb : généralités sur les tests sérologiques

Les tests sérologiques sont basés sur la réponse immunitaire à médiation humorale, c'est-à-dire la détection d'anticorps (Ac) spécifiques dirigés contre des antigènes (Ag) mycobactériens immunogènes de diverses natures.

Les PPD habituellement utilisées comme Ag mycobactériens pour les tests de sérodiagnostic de la Tb sont désormais souvent remplacées par des Ag protéiques spécifiques du MTBC tels que MPB70 et MPB83 (protéines majeures sécrétées par les cellules des bactéries du MTBC), ESAT6 (*early secreted antigenic target* de 6 kDa, protéine majeure au début de l'infection). En effet, ces Ag présentant de nombreux épitopes reconnus par les lymphocytes B (Ag sérodominants) permettent d'améliorer la spécificité des tests sérologiques (Wood P.R. *et al.*, 1992 ; Lyashchenko K.P. *et al.*, 1998 ; Lightbody K.A., *al.*, 1998 ; Lilenbaum W. *et al.*, 1999 ; Amadori M. *et al.*, 2002 ; Carr M.D. *et al.*, 2003 ; Pollock J.M., Welsh M.D. et McNair J., 2005 ; De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006a ; Coad M. *et al.*, 2008).

Parmi les tests de sérodiagnostic de la Tb, la technique ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* ou test d'immunoabsorption par enzyme liée, c'est-à-dire test de dosage immunoenzymatique sur support solide) est celle que l'on retrouve principalement dans la littérature (Ritacco V. *et al.*, 1988 et 1991 ; Harboe M. *et al.*, 1990 ; Hanna J., Neill S.D. et O'Brien J.J., 1992 ; Lightbody K.A. *et al.*, 1998 ; Lilenbaum W. *et al.*, 1999 et 2006) (Cf. Annexe VI).

Ce test entre dans le cadre plus général des EIA (*Enzyme ImmunoAssays* ou tests immunoenzymatiques), dans lesquels le dosage est basé sur une réaction catalysée par une enzyme qui sur un substrat chromatogène libère un composant coloré mesuré par spectroscopie, par opposition aux RIA (*Radio ImmunoAssays* ou radio-immunoessais) dans lesquels le dosage est basé sur des Ac marqués par un radioélément permettant la mesure d'un signal radioactif (Burmester G.R., Pezzutto A. et Wirth J., 2000 ; Site web [11]).

On peut retrouver également d'autres tests sérologiques, comme les tests commerciaux MAPIA[®] de Chembio (*Multi-antigen Print Immunoassay*) reposant sur la détection d'immunoglobulines G (Ac) par un challenge de plusieurs Ag dans le même test et basé sur l'immunochromatographie (Palmer M.V. *et al.*, 2006a).

Il existe aussi des tests rapides reposant sur le même principe que MAPIA[®] (*Lateral Flow Immunoassay*, l'immunochromatographie mais à flux latéral), comme le test BovidTB STAT-PAK[®] de Chembio ou le test Bovine Tb Ab[®] d'Anigen. Ces tests rapides se présentent sous la forme d'une petite cassette en plastique dans laquelle une bandelette test unique est placée. Cette bandelette est une membrane de nitrocellulose sur laquelle sont imprégnés des Ag. Le système de révélation des anticorps est simple : des particules de latex bleu sont conjuguées aux protéines détectant les complexes Ac-Ag formés.

Les tests sérologiques suscitent donc un intérêt pour le dépistage de la Tb, dans la mesure où ils sont peu coûteux et que contrairement aux IDT, ils sont réalisés à partir d'une simple prise de sang. Néanmoins, comme la réponse immunitaire humorale se déclenche tardivement par rapport à la réponse immunitaire cellulaire (*prédominant les premiers stades de l'infection*) (Figure I.1.4), (Ritacco V. *et al.*, 1991 ; Buddle B.M. *et al.*, 1995 ; Pollock J.M. et Neill D., 2002 et Vordermeier H.M. *et al.*, 2006b), la recherche d'Ac spécifiques d'Ag mycobactériens semble donc intéressante seulement pour la détection de cas de Tb en stades plutôt avancés, c'est-à-dire pour le diagnostic de la Tb dans des populations où l'infection est installée voire endémique (animaux malades, faune sauvage, p. ex). [par exemple, les anergiques (Plackett P. *et al.*, 1989)].

En effet, les tests sérologiques pour un dépistage en début d'infection ont une sensibilité généralement faible par rapport aux tests basés sur l'immunité à médiation cellulaire (IDT et test de dosage d'interféron gamma). L'utilisation d'Ag sérodominants permet d'améliorer leur spécificité sans toutefois améliorer leur sensibilité (Tableau I.1.3) (De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006a ; Buddle B.M., Livingstone P.G. et De Lisle G.W., 2009). Leur sensibilité augmente principalement avec la sévérité de la maladie (lésions modérées à sévères) [Gutiérrez M. *et al.*, 1998 (étude à partir d'un test ELISA-AgPPD sur des caprins)]. Par ailleurs, des études ont montré que les réponses en Ac engagées contre *M. bovis* (Ag) peuvent être boostées par l'IDT (réponse anamnesticque) (amélioration de la sensibilité (Tableau I.1.3)), (Gutiérrez M. *et al.*, 1998 ; Thom M. *et al.*, 2004 ; De la Rua-Domenech R., 2006a ; Cf. Tableau I.1.3).

Néanmoins, ces tests ne doivent pas être utilisés comme test de confirmation de Tb à l'abattoir (Fráguas S.A. *et al.*, 2006).

III.2.1.2. La technique de dosage d'interféron gamma

III.2.1.2.1. L'interféron gamma

Les interférons sont des protéines naturelles produites par les cellules du système immunitaire de la plupart des animaux en réponse aux attaques d'agents étrangers tels que les virus, bactéries, cellules tumorales. Ils font partie d'une classe de glycoprotéines, les cytokines. Il existe deux types d'interféron qui diffèrent structuralement et fonctionnellement : le type I inclue les interférons alpha et bêta et, le type II comprend uniquement l'interféron gamma (interféron immun) (De la Rúa-Domenech R. *et al.*, 2006a ; Site web [13]).

L'interféron gamma (IFN γ) est une lymphokine, puisqu'il est principalement libéré par les lymphocytes thymodépendants (de type CD4⁺ principalement et, CD8⁺ et $\gamma\delta$ TCR⁺) activés en réponse à une stimulation antigénique *in vivo* comme *in vitro* (Flynn J.L. *et al.*, 1993 ; Rhodes S.G. *et al.*, 2000a ; Waters W.R. *et al.*, 2000 ; Walravens K. *et al.*, 2001 ; Pollock J.M. *et al.*, 2001, 2005 et 2006). Il peut être également produit à moindre mesure par les cellules NK (*Natural Killer*) en réponse à certains Ag (Flynn J.L. *et al.*, 1993 ; Olsen I. *et al.*, 2005 ; Site web [13]).

Outre ses propriétés antivirales, l'IFN γ est impliqué dans l'immunité à médiation cellulaire contre les infections bactériennes.

En effet, l'IFN γ est le principal médiateur dans l'activation de la fonction phagocytaire des macrophages (Flesch E. et Kaufmann S.H., 1990 ; Flynn J.L. *et al.*, 1993 ; Carpenter E., Fray L., et Gormley E., 1997 ; Ng K.H. *et al.*, 1997 ; Waters W.R. *et al.*, 2000 ; Walravens K. *et al.*, 2001 ; Pollock J.M., Welsh M.D. et McNair J., 2005 ; De la Rúa-Domenech R. *et al.*, 2006a). Il joue aussi un rôle important dans la croissance et la différenciation des lymphocytes T (LT) cytotoxiques (rétrocontrôle positif par activation des LT) qui vont activer les cellules NK et se conduire comme des facteurs de maturation des lymphocytes B (LB).

De même, c'est un facteur de différenciation des LB. Enfin, il permet l'induction de l'expression de protéines membranaires, comme les Ag de classes 1 et 2 (Site web [13]).

L'IFN γ est donc une cytokine cruciale pour le contrôle des infections mycobactériennes (Ng K.H. *et al.*, 1997 ; Walravens K. *et al.*, 2001 ; Buddle B.M. *et al.*, 2005).

Par ailleurs, il est important de souligner que l'IFN γ est spécifique de l'espèce animale infectée et non du pathogène qui déclenche sa production (Rothel J.S. *et al.*, 1990).

De plus, il peut être libéré *in vitro* en quantité suffisante pour être mesuré par une méthode ELISA en « sandwich » (Wood P.R. *et al.*, 1990a ; Wood P.R. et Jones S.L., 2001).

III.2.1.2.2. Historique et principe du test de dosage d'IFN γ

A la fin des années 1980, un test de dosage d'IFN γ a été développé en Australie pour le diagnostic de la Tb, en combinaison avec l'IDS (Wood P.R., Corner L.A. et Plackett P., 1990b ; Wood P.R. *et al.*, 1991 et 1994 ; Rothel J.S. *et al.*, 1990). En effet, des travaux de stimulation cellulaire *in vitro* ont montré qu'il était possible en incubant des échantillons de sang total avec des Ag tuberculeux, de stimuler la production de, l'IFN γ par des LT déjà sensibilisés (Wood P.R. *et al.*, 1990ab, 1991 ; Rothel J.S. *et al.*, 1990).

Le test de dosage d'IFN γ développé est donc un test sanguin permettant d'évaluer *in vitro*, la réactivité des LT circulants stimulés par Ag mycobactériens (tuberculines), à travers la détection et le dosage d'IFN γ .

Il est basé sur le principe que des LT préalablement sensibilisés à ces Ag (LT de bovins infectés par *M. bovis*, par exemple*) produisent en réponse (HSR *in vitro*) à une exposition à des tuberculines (bovines*), des quantités d'IFN γ mesurables par une méthode ELISA en « sandwich » basée sur des anticorps monoclonaux anti-IFN γ .

Les premières études d'évaluation terrain de ce test, ont été menées sur des bovins et des buffles expérimentalement et naturellement infectés par *M. bovis* (Rothel J.S. *et al.*, 1990 ; Wood P.R. *et al.*, 1990b et 1991). Elles ont permis d'aboutir à la commercialisation de kits de dosage d'IFN γ par méthode ELISA en « sandwich ».

Ainsi, le laboratoire Biosource (*Belgique*) commercialise le test « Bovine IFN γ EASIA™ » (distribué en France par CliniSciences). Le laboratoire Biocor (*Commonwealth Serum Laboratories (CSL), Australie*) commercialisait le test Bovigam® de 1988 à 2005. Désormais, ce test est distribué par la société suisse Prionics (distribué en France par AES).

III.2.1.2.3. Le test IFN γ Bovigam®

III.2.1.2.3.1. Principe du test Bovigam®

Le test Bovigam® est un test sanguin de dosage d'IFN γ pour le diagnostic rapide de la Tb pour les bovins, ovins, caprins et autres bovidés tels que les buffles (Cf. Notice, site web [13]).

– Il existe des tests pour les primates non humains (Primagam[®]), pour les cervidés (Cervigam[®]), pour les humains (Quantiferon[®] et Quantiferon Gold[®]). –

Le test Bovigam[®] permet donc de déceler l'infection à *M. bovis*, chez les bovins, ovins, caprins et autres bovidés, par la détection de la production d'IFN γ dans le plasma, après mise en évidence de la réponse immunitaire à médiation cellulaire, résultant de l'exposition du sang total à des tuberculines bovines (Wood P.R. et Jones S.L., 2001).

III.2.1.2.3.2. Méthode Bovigam[®]

Le test Bovigam[®] comporte donc deux phases : la stimulation cellulaire, en particulier lymphocytaire, par incubation des prélèvements sanguins avec des Ag spécifiques puis, le dosage d'IFN γ libéré dans chaque plasma, par la méthode ELISA en « sandwich » basée sur des anticorps monoclonaux spécifiques de l'IFN γ bovin (mais aussi ovins, caprins et autres bovidés) (mode opératoire, cf. Annexe VII). Ces anticorps ne reconnaissent pas les IFN γ des porcins, des cervidés et de l'Homme (Wood P.R. *et al.*, 1990ab ; Rothel J.S. *et al.*, 1990 ; Wood P.R. et Jones S.L., 2001).

L'étape de stimulation lymphocytaire requiert un minimum de 5 ml de sang collectés et homogénéisés dans un tube contenant de l'héparine (anticoagulant).

De plus, pour être valable, ce test doit être mis en œuvre sur des prélèvements sanguins pour lesquels les lymphocytes sont encore viables et capables de réagir en produisant, le cas échéant de l'IFN γ .

Ainsi, la notice du kit Bovigam[®] préconise de conserver le tube de sang à une température de 22°C \pm 5°C (température ambiante) et, de réaliser la stimulation cellulaire au maximum 30 h après la prise de sang sur l'animal, si une IDT a été appliquée entre 3 et 30 jours avant le prélèvement sanguin. Ce délai maximum est réduit à 8 h si aucune IDT n'a été réalisée entre 3 et 30 jours avant la prise de sang (Rothel J.S. *et al.*, 1992).

En Grande Bretagne (GB), Nouvelle Zélande (NZ) et aux Etats-Unis d'Amérique (EUA), le délai maximal est de 24 h après une IDT [Ryan T.J., Buddle B.M. et De Lisle G.W., 2000 (NZ : un délai de 28 h n'entraîne aucun effet sur la sensibilité et la spécificité du test); Vordermeier H.M. et Ewer K., 2006a (GB)].

Néanmoins, Wood P.R. *et al.* en 1991, annonçaient un temps limite de 12 h entre la prise de sang et le début de l'analyse.

De plus, certains auteurs recommandent un délai maximal de 8 h pour éviter une baisse de sensibilité du test [Rothel J.S. *et al.* en 1992 (*Australie : baisse de 30 % des valeurs de densité optique (DO) obtenues à 24 h*) ; González Llamazares O.R. *et al.*, 1999b et Aranaz A. *et al.*, 2006 (*Espagne : recommandation 8 h*) ; Whipple D.L. *et al.*, 2001 (*EUA : diminution des valeurs de DO entre 2 h et 24 h en cas de non-application d'IDS récente*) Gormley E. *et al.*, 2004 et 2005 (*Irlande : chute des valeurs de DO à 24 h*) ; Cagiola M. *et al.*, 2004 (*Italie : recommandation 8-10 h*) ; Schiller I. *et al.*, 2009)].

La probabilité qu'un échantillon sanguin positif en IFN γ analysé 8 h après la prise de sang (PS+8 h) reste positif à PS+24 h, dépend de l'amplitude de la réponse au test à PS+8 h (Gormley E. *et al.* en 2005 : 76 % des animaux positifs en IDT et en IFN γ à 8 h restent positifs en IFN γ à 24 h) (Waters W.R. *et al.*, 2007).

III.2.1.2.3.3. Conditions d'utilisation du test Bovigam[®]

Selon les indications décrites dans la notice, le test Bovigam[®] est proposé pour un usage après une IDT. Le test IFN γ est alors utilisé comme test de confirmation de réactions positives et négatives entre 3 et 30 jours après l'application de l'IDT chez l'animal.

III.2.1.2.3.4. Interprétation des résultats du test Bovigam[®]

Avant de procéder à l'interprétation des résultats des échantillons, le bon déroulement de l'analyse (« run » ELISA) doit être contrôlé par la vérification des résultats obtenus pour les témoins positif (TP) et négatif (TN) analysés en triple.

En effet, le TP (présence d'IFN γ recombinant) permet de confirmer que les Ac anti-IFN γ de capture sont bien fixés au fond du puits, mais aussi que les Ac anti-IFN γ traceurs sont marqués par l'enzyme *peroxidase de raifort* (HRP). Le TN (absence d'IFN γ) permet de s'assurer de l'absence de fixation non spécifique des Ac anti-IFN γ marqués à la HRP.

Ainsi, pour valider l'analyse ELISA (par plaque ELISA), les valeurs moyennes de DO (moyenne des 3 valeurs de DO) obtenues pour ces témoins, doivent répondre aux critères suivants :

Pour le TN : $DO_{TN} < 0,130$ et $dTN < 0,04$ (dTN : écart entre les 3 valeurs de DO de TN (moyenne des DO des *triplicats* de TN)).

Pour le TP : $DO_{TP} > 0,700$ et $CV_{TP} < 30 \%$ [(CV_{TP} : coefficient de variation de TP), les DO des *triplicats* de TP ne doivent pas varier de plus de 30 % de leur absorbance moyenne (DO_{TP})].

Après la validation de la série d'analyses par les témoins, les résultats des échantillons peuvent être interprétés. L'interprétation du test Bovigam® est basée sur le même principe que celui de l'IDC. En effet, il s'agit de comparer les réponses en IFN γ obtenues pour les deux Ag tuberculeux, PPDB et PPDA. En raison d'une parenté plus grande de *M. avium* avec *M. avium paratuberculosis* et diverses mycobactéries atypiques qu'avec les bacilles tuberculeux bovins (et humains), l'exposition à une mycobactérie atypique ou *M. avium paratuberculosis* préalable au test se traduira par une réponse en IFN γ plus intense à PPDA qu'à PPDB et inversement pour une exposition à une mycobactérie du MTBC (Wood P.R. et Rothel J.S., 1994 ; Bénet J.J., 2008).

Néanmoins, il arrive qu'une réponse positive à PPDB s'accompagne d'une réponse positive à PPDA mais généralement de moindre intensité (réaction croisée) dans le cas de double contamination par *M. bovis* et *M. avium* ou par *M. bovis* et une mycobactérie atypique (Wood P.R., Corner L.A. et Plackett P., 1990 ; Wood P.R. et Rothel J.S., 1994).

Comme chaque échantillon est analysé en double, les moyennes des deux valeurs de DO du PBS (*phosphate buffer saline* noté N), de PPDB et de PPDA sont calculées pour chaque échantillon.

Ainsi, un échantillon est considéré comme positif lorsque la valeur de DO obtenue à l'issu du calcul « DO_{PPDB} – DO_{PPDA} » est supérieure ou égale à 0,1 et que la valeur de DO obtenue à l'issu du calcul « DO_{PPDB} – DO_N » est supérieure ou égale à 0,1 (Wood P.R. and Rothel J.S., 1994) (Tableau I.1.2). Un résultat positif à ce test indique donc la présence d'une infection à *M. bovis* chez l'animal testé.

Tableau I.1.2. Critères d'interprétation des résultats du test.

Critères (la DO correspond à la moyenne des 2 DO obtenues)	Interprétation des résultats
$DO_{PPDB} - DO_{PPDA} \geq 0,1$ et $DO_{PPDB} - DO_N \geq 0,1$	POSITIF
$DO_{PPDB} - DO_{PPDA} < 0,1$	NEGATIF
$DO_{PPDB} - DO_N < 0,1$	NEGATIF

Cependant, la littérature montre que le critère d'interprétation des résultats du test IFN γ peut être adapté aux conditions d'application. Ainsi, le seuil de positivité peut être ajusté pour augmenter les performances du test, c'est-à-dire pour obtenir une valeur élevée en sensibilité ou en spécificité, selon la situation épidémiologique rencontrée (Wood P.R. *et al.*, 1991 et 1992 ; Ryan T.J., Buddle B.M. et De Lisle G.W., 2000 ; Lauzi S. *et al.*, 2000 ; Wood P.R. et

Jones S.L., 2001 ; Buddle B.M. *et al.*, 2001 ; Walravens K. *et al.*, 2002 ; Gormley E., 2005 ; Buddle B.M., Livingstone P.G. et De Lisle G.W., 2009). De même, d'autres modes de calcul pour l'interprétation des résultats du test IFN γ peuvent être utilisés (Wood P.R. *et al.*, 1991 ; Whipple D.L. *et al.*, 1995 ; Gutiérrez M. *et al.*, 1998 ; Ryan T.J., Buddle B.M. et De Lisle G.W., 2000 ; Lauzi S. *et al.*, 2000 ; Walravens K. *et al.*, 2002 ; Olsen I. *et al.*, 2005 ; Aranaz A. *et al.*, 2006).

III.2.1.2.3.5. Avantages du test Bovigam[®]

Comme pour l'IDT, le test IFN γ , basé sur la réponse immunitaire à médiation cellulaire, permet la détection précoce de l'infection. Toutefois, la réponse est développée (production importante d'IFN γ) plus précocement que celle détectable en IDT, soit en une à cinq semaines après l'infection (trois à six semaines pour les IDT), (Figure I.1.8), (Neill S.D. *et al.*, 1994a ; Buddle B.M. *et al.*, 1995 ; Wood P.R. et Jones S.L., 2001 ; Gormley E. *et al.*, 2005 ; Pollock J.M., Welsh M.D. et McNair J., 2005 ; De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006b ; Coad M. *et al.*, 2008).

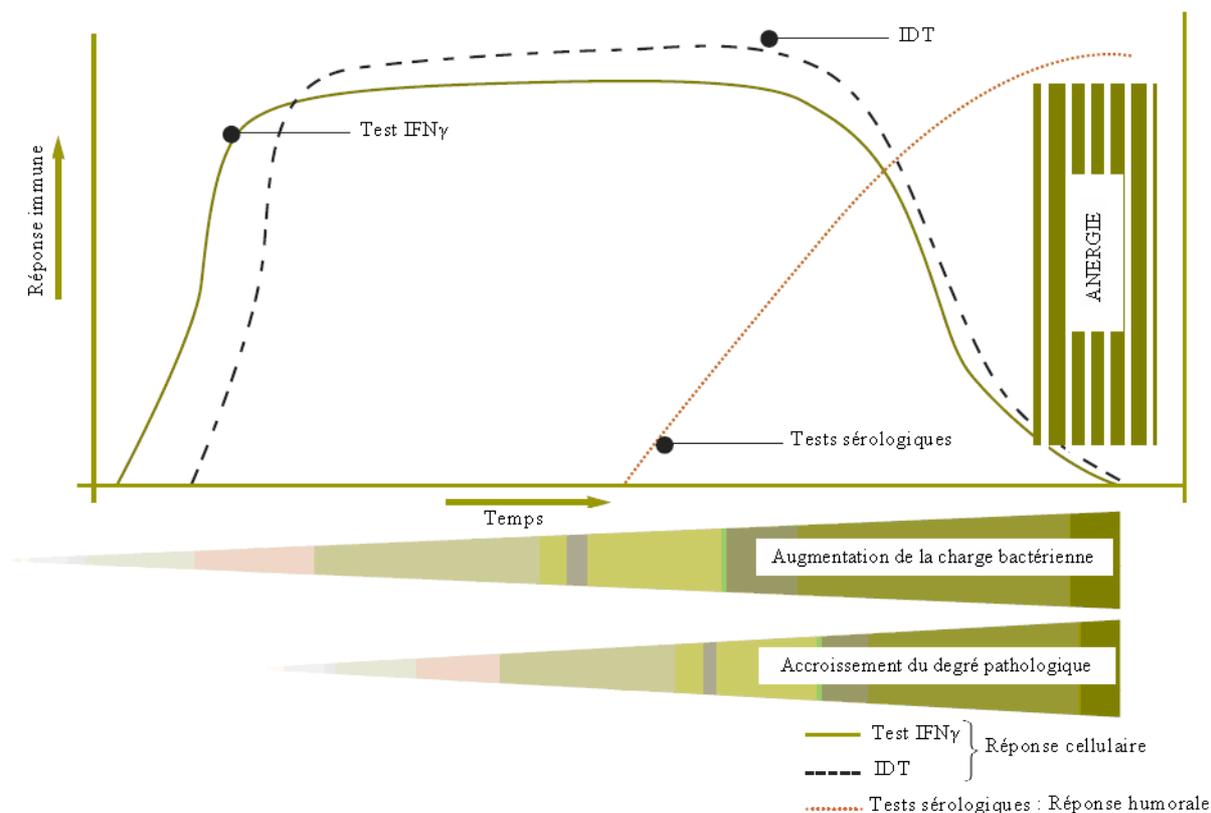


Figure I.1.8. Représentation graphique du spectre des réponses pathologiques et immunitaires à médiation cellulaire (aux tests IFN γ et IDT) et à médiation humorale (aux tests sérologiques) du bétail infecté par *M. bovis* (d'après De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006b).

Le test IFN γ est généralement considéré comme au moins aussi sensible que l'IDS et plus sensible que l'IDC (Tableau I.1.3), (Wood P.R. *et al.*, 1991 et 2001; De la Rúa-Domenech R. *et al.*, 2006 ; Coad M. *et al.*, 2008). En effet, il a été amplement montré que le test IFN γ peut détecter une importante proportion d'animaux infectés non-détectés par IDT (Neill S.D. *et al.*, 1994a ; Pollock J.M. *et al.*, 2001 ; Vordermeier H.M. *et al.*, 2006ab ; De la Rúa-Domenech R. *et al.*, 2006a). Ceci résulte principalement du fait qu'il permet de déceler l'infection plus tôt que l'IDT (Pollock J.M., Welsh M.D. et McNair J., 2005 ; De la Rúa-Domenech R. *et al.*, 2006a).

Comme pour l'IDC, l'évaluation comparée de la réaction aux tuberculines, PPDA et PPDB pour le test IFN γ permet généralement de faire la différence avec une simple exposition à une mycobactérie environnementale et améliore la spécificité (bien que faible en apparence (De la Rúa-Domenech R. *et al.*, 2006a)) par rapport à l'IDS (Wood P.R. et Rothel J.S., 1994 ; Buddle B.M. *et al.*, 1995 ; Bénét J.J., 2008). De même, il permet de différencier les animaux vaccinés contre la paratuberculose avec une IDS positive, des animaux présentant une Tb (Buddle B.M. *et al.*, 2003).

En outre, la flexibilité inhérente du critère d'interprétation du test IFN γ constitue un bénéfice majeur puisque l'interprétation du test peut être adaptée à la situation épidémiologique rencontrée. Ainsi, dans le cas de programme d'éradication dans des zones à prévalence élevée en Tb ou même, dans le cas seulement de cheptels suspectés de Tb, la valeur du seuil décisionnel (de positivité) du test IFN γ peut être ajustée pour améliorer la sensibilité du test (et aboutir à une meilleure détection des animaux infectés), sans toutefois trop réduire sa spécificité (Buddle B.M. *et al.*, 2001 ; Wood P.R. et Jones S.L., 2001 ; Gormley E. *et al.*, 2005).

Par ailleurs, la réalisation du test IFN γ est trois fois plus rapide (résultat obtenu en un peu plus de 24 h minimum) que les IDT (minimum 72 h).

De plus, sa réalisation et son interprétation par le laboratoire le rendent indépendant des acteurs du terrain (ce qui permet d'éviter les fraudes, par exemple).

En effet, la réaction immunitaire est objectivement mesurée en laboratoire par DO alors que la lecture de l'IDS est faite sur l'animal, généralement de façon subjective (visuel, palpation), et celle de l'IDC de manière quantitative par mesure du pli de peau au cutimètre.

Il suffit également d'une seule visite sur l'exploitation (pour réaliser la prise de sang) alors que l'IDT en nécessite deux (pour sa réalisation et la lecture du résultat). L'utilisation du test

IFN γ permet aussi de réduire les problèmes pratiques associés aux IDT (contention des animaux) qui contribuent à une sous-détection des animaux infectés.

Enfin, à la différence de l'IDT qui nécessite l'administration d'Ag chez l'animal, ce qui compromet son système immunitaire pendant plus d'un mois, le test IFN γ qui nécessite un simple prélèvement de sang de l'animal, n'interfère pas avec son système immunitaire (Rothel J.S. *et al.*, 1990). Ainsi, contrairement aux IDT, il peut être renouvelé à de multiples reprises et sans délai d'attente entre deux examens. Par exemple, en présence de résultat douteux, on peut retester plus rapidement l'animal. Par conséquent, la réalisation du test IFN γ permet un gain de temps dans la procédure de diagnostic de la Tb puisque ce test peut être réalisé pour confirmer le résultat positif d'une IDS sans délai d'attente, alors qu'un délai de 6-8 semaines est requis pour une confirmation par IDC (ou une seconde IDS).

III.2.1.2.3.6. Les limites du test Bovigam[®]

L'un des inconvénients majeurs du test IFN γ conventionnel (basé sur les PPD) est que son coût est élevé bien qu'il ne nécessite qu'une seule visite du vétérinaire sanitaire. De plus, sa spécificité apparente est faible (De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006a). En effet, la valeur médiane de la spécificité du test IFN γ est estimée à 96,6 % ([85,0 - 99,6] %) selon De la Rua-Domenech R. *et al.* (2006a) (étude de Vordermeier H.M. *et al.*, 2006ab). Elle est donc relativement basse par rapport à celle de l'IDC qui est estimée à 99,5 % selon De la Rua-Domenech R. *et al.* (2006a).

Toutefois, l'utilisation d'immunogènes spécifiques du MTBC, tels que ESAT6 et CFP10 (*culture filtrate protein*, protéine de 10 kDa) permettent d'augmenter la spécificité du test IFN γ (Cf. II.1.2.4.3).

Néanmoins, il a été montré qu'une faible proportion d'animaux contaminés par *M. bovis* réagit aux IDT mais pas au test IFN γ (Pollock J.M., Welsh M.D. et McNair J., 2005).

Par ailleurs, les conditions de prélèvement sanguin (sur tube hépariné à homogénéiser) et d'acheminement au laboratoire (température et délai à respecter) sont contraignantes car elles doivent permettre de maintenir la viabilité des LT qui seront mis en contact avec les Ag quelques heures au maximum après le prélèvement.

Concernant l'étape de stimulation cellulaire, le test Bovigam[®] n'intègre pas de contrôle positif de la réaction d'activation des LT, pourtant indispensable à l'interprétation des résultats. En effet, la libération d'IFN γ est inhibée par des immunosuppresseurs tels que le

cortisol, glucocorticoïde naturel qui est libéré en réponse à un stress [notamment chez les bovinés sauvages (camarguais par exemple)] ou des corticostéroïdes qui sont administrés pour traiter des inflammations (dexaméthasone) (Goff B.S.L., 1996). Ces immunosuppresseurs entraînent temporairement une diminution significative, voire une absence, de réceptivité aux IDT (réduction de l'étendue de la réaction cutanée) et de production d'IFN γ chez les animaux infectés (Doherty M.L. *et al.*, 1996 ; Wood P.R. et Jones S.L., 2001 ; Gormley E. *et al.*, 2005).

Or, l'utilisation d'un super-Ag non spécifique (mitogène) permet d'évaluer l'immunocompétence d'un animal infecté ou non-infecté, c'est-à-dire la capacité des LT, présents dans son échantillon sanguin, à produire de l'IFN γ (réponse T non spécifique).

Parmi les glycoprotéines connues pour être de puissants immunogènes (mitogènes), la littérature décrit l'utilisation de la concanavoline A (conA), du « pokeweed mitogen » (PWM), de l'entérotoxine staphylococcique B (SEB) à partir de *Staphylococcus aureus*, de la phytohémagglutinine P (PHAP) (Stabel J.R., 1996 ; Van Pinxteren L.A.H. *et al.*, 2000 ; Jungersen G. *et al.*, 2002 ; Aagaard C. *et al.*, 2006 ; Aranaz A. *et al.*, 2006 ; Waters W.R. *et al.*, 2007 ; Coad M. *et al.*, 2008 ; Schiller I. *et al.*, 2009).

III.2.1.2.4. Applications du test IFN γ

III.2.1.2.4.1. Applications du test IFN γ basé sur les PPD

Les essais terrains initiaux du test IFN γ ont été réalisés en Australie entre 1989 et 1990 par Rothel J.S., Wood P.R. *et al.*, en combinaison avec l'IDS réalisée au pli sous-caudal (Rothel J.S. *et al.*, 1990 ; Wood P.R. *et al.*, 1991).

L'étude de la sensibilité de l'IDS et du test IFN γ a été évaluée sur 6264 bovins et 490 buffles issus de cheptels infectés. Ainsi, ils ont montré que le test IFN γ était plus sensible [76,8 % à 93,6 % selon le critère appliqué pour l'interprétation des résultats (*soit 80,8 % pour l'interprétation standard d'un résultat positif si $DO_{PPDB} - DO_N > 0,5$ et $DO_{PPDB} > DO_{PPDA}$*)] que l'IDS (65,6 %) pour le diagnostic de la Tb.

L'étude de la spécificité du test IFN γ a été évaluée sur 6337 bovins issus de cheptels indemnes depuis au moins 5 ans. Ils ont montré également que le test IFN γ était moins spécifique (96,2 % à 98,1 % selon le critère appliqué) que l'IDS (98,8 %, valeur connue en Australie) pour le diagnostic de la Tb (Wood P.R. *et al.*, 1991, 1994 et 2001).

En 1991, ce test a donc été accrédité par le comité en charge de l'agriculture en Australie comme méthode officielle de diagnostic de la Tb dans le pays (Wood P.R. et Jones S.L., 2001).

Ensuite, la méthode de dosage d'IFN γ a été testée dans de nombreux pays du monde (EUA, NZ, Brésil, Espagne, Irlande du Nord, Italie, Roumanie, ...) généralement en parallèle avec les IDT, en particulier l'IDS (Wood P.R. et Jones S.L., 2001 ; Vordermeier H.M. *et al.*, 2006ab ; Cf. Tableau I.1.3 récapitulatif).

Ce test a été approuvé en Nouvelle Zélande comme méthode officielle de diagnostic de la Tb à la fin des années 1990 (pour des animaux avec une IDS positive et lors de suspicion de réaction non-spécifique) et il a été formellement reconnu en 2002 par l'Union Européenne comme test supplémentaire pour une utilisation en parallèle aux IDT (De la Rúa-Domenech R. *et al.*, 2006a).

Selon l'étude relative à l'évaluation terrain du test dans plusieurs pays depuis sa commercialisation, réalisée par Wood P.R. et Jones S.L. en 2001, plus de 200 000 animaux avaient été testés et la sensibilité du test IFN γ variait de 81,8 % à 100 % (confirmation de Tb par culture) et sa spécificité entre 94 % et 100 %.

En 2006, Vordermeier H.M. et Ewer K. ont fait une autre évaluation et ont estimé les valeurs médianes des sensibilités respectives de l'IDS (plis sous-caudal et encolure confondus) et de l'IFN γ à 77,7 % et 88,4 %. La valeur médiane de la spécificité de l'IFN γ est estimée à 96,6 %.

De plus, la stratégie qui consiste à utiliser l'IDS et l'IFN γ en parallèle permet selon Wood P.R. et ses collègues en 1991, d'augmenter la sensibilité globale à 95,2 % (soit 93,6 % pour l'IFN γ seul et 65,6 % pour l'IDS seule). L'effet des IDT a été largement décrit dans la littérature (Cf. Paragraphe suivant).

Néanmoins, le fait que la spécificité apparente du test Bovigam[®] soit faible et que son coût soit élevé, constitue un frein à l'utilisation du test pour le dépistage en masse de la Tb dans des régions à faible prévalence de Tb (risque d'abattre de nombreux animaux indemnes) (Buddle B.M. *et al.*, 2001 ; De la Rúa-Domenech R. *et al.*, 2006a).

Tableau I.1.3. Résultats exposés par plusieurs auteurs, concernant des études de sensibilité (Se) et /ou de spécificité (Sp), obtenus pour les IDT, le test IFN γ (basé sur PPD) après une IDT (IDT & IFN γ) ou indépendamment de l'IDS (test IFN γ) et les tests sérologiques.

Se ou Sp en pourcentage selon l'étude	IDT ¹		Test IFN γ ²		IDT ¹ & IFN γ ²		Tests sérologiques	
	Se	Sp	Se	Sp	Se	Sp	Se	Sp
Wood P.R. <i>et al.</i> , 1991 (Australie)	IDS c : 65,6	98,8 (Réf.)	93,6*	98,1	95,2*	–	–	–
Wood P.R. <i>et al.</i> , 1992 (Australie)	IDS c : 68,1	IDS c : 96,7	81,8	99,1	–	–	ELISA -Ag MPB70 : 18,1	ELISA -Ag MPB70 : 96,4
Whipple D.L. <i>et al.</i> , 1995 (EUA)	IDC c : 80,4*	–	[55,4-97,1] 73,0 ^{d*}	–	90,7 ^{d*}	–	–	–
Gutiérrez M. <i>et al.</i> , 1998 (Espagne) sur des caprins	IDC : 83,7	IDC : 100	83,7	96	95,8	96	ELISA -Ag PPDB : 54,9 (J0) 88,6 (J15)	ELISA -Ag PPDB : 88 (J0) 95,8 (J15)
González Llamazares O.R. <i>et al.</i> , 1999b (Espagne)	IDC : 80,2	–	84,9	–	92,9	–	–	–
Lauzi S. <i>et al.</i> , 2000 (Italie)	–	–	–	88,8 (avant IDC)	–	–	–	–
Ryan T.J. <i>et al.</i> , 2000 (NZ)	–	–	–	–	90	93	–	–
Cagiola M. <i>et al.</i> , 2004 (Italie)	–	IDC : 96,8	–	97,3	–	–	–	–
Goodchild A., 2004 (données non publiées)	65,0*	–	70,0 ^{d*}	–	88,0 ^{d*}	–	–	–
Gormley E. <i>et al.</i> , 2005	IDC : 74 ^{ISR}	IDC : 99,9 ^{ISR}	88	95	93	–	–	–
Vordermeier H.M. <i>et al.</i> , 2006b (GB)	77,7	–	88,3	96,6	–	–	–	–
Schiller I. <i>et al.</i> , 2009	–	–	90,9	96,5	–	–	–	–
Marassi C.D. <i>et al.</i> , 2010 (Brésil)	–	–	91,4	86,7	74,3 (7j) 71,4 (21j)	86,7 (7j) 80 (21j)	–	–

Légende :

1 : Utilisation de différents critères d'interprétation des résultats : une seule méthode mais plusieurs seuils ; **2 :** Utilisation de différents critères d'interprétation des résultats utilisés : plusieurs méthodes et seuils ou « cut off » ; **d :** selon les critères d'interprétation du distributeur ; ***** : données également extraites des articles de Vordermeier M. *et al.*, 2006ab ; **–** : pas de données ; **IDS c** ou **IDT c** : « c » pour « au pli sous-caudal » ; **J0** : ELISA basée sur un Ag PPDB, réalisée le jour de l'injection de tuberculines (IDC) ; **J15** : ELISA basée sur un Ag PPDB, réalisée 15 jours après l'IDC ; **Réf.** : Valeur de référence rapportée. **ISR** : Interprétation sévère du résultat.

III.2.1.2.4.2. Les effets de l'IDT sur le test IFN γ ➤ **Les effets de l'IDS sur le test IFN γ**

Il a été démontré que la réalisation récente d'une IDS avant le prélèvement sanguin, pouvait modifier le résultat du test IFN γ (Tableau I.1.3). En effet, de nombreux articles traitent de l'effet « booster » (activateur) de la réponse en IFN γ à partir du 3^{ème} jour suivant l'injection de tuberculines PPDB et uniquement chez des bovins infectés (Schiller I *et al.*, 2010). Selon Rothel J.S. et ses collègues (Australie, 1992), cette réponse en IFN γ augmente progressivement entre 3 et 5 jours après l'IDS (au pli sous-caudal).

Aux EUA, Palmer M.V. et ses collaborateurs (2006a) ont observé l'effet booster de l'IDS (au pli sous-caudal) entre 3 et 7 jours après l'injection. De même, Whipple D.L. et ses collègues (2001, EUA) ont démontré un effet « booster » de l'IDS (au pli sous-caudal) sur la réponse en IFN γ à partir du 3^{ème} jour jusqu'au 28^{ème} jour après l'injection. Ils ont remarqué également qu'au 3^{ème} jour, la DO était plus élevée après un délai de 24 h entre la prise de sang et la stimulation cellulaire (PS + 24 h) qu'à PS + 2 h. En Irlande, Gormley E. et ses collègues (2004) ont également observé une absorbance plus élevée à PS + 24 h qu'à PS + 8 h. Néanmoins, en NZ, Ryan T.J., Buddle B.M. et De Lisle G.W. (2000) ont montré que la sensibilité et la spécificité du test IFN γ n'étaient pas affectées par un délai de PS + 28 h, lorsque le test est réalisé entre 8 et 28 jours après l'IDS.

Ainsi, selon ces auteurs, le bénéfice de cet effet « booster » sur le test Bovigam[®] est que l'exposition des échantillons sanguins aux PPD peut être retardée jusqu'au jour suivant l'injection sans réduire la sensibilité du test pour la détection de la Tb. (Ryan T.J., Buddle B.M. et De Lisle G.W., 2000 ; Whipple D.L. *et al.*, 2001 ; Wood P.R. et Jones S.L., 2001; Gormley E. *et al.*, 2004 ; Coad M. *et al.*, 2007).

➤ **Les effets de l'IDC sur le test IFN γ**

Au contraire, d'autres auteurs ont montré qu'une IDC réduisait significativement la capacité de réponse à une seconde IDC 7 jours après la première alors que la production en IFN γ chez des bovins infectés n'était pas affectée (Doherty M.L. *et al.*, 1995).

Gormley E. (2004), Coad M. (GB, 2007) et leurs collaborateurs respectifs ont montré également, à partir d'études sur des animaux naturellement infectés par *M. bovis*, que l'interprétation du résultat du test Bovigam[®] réalisé 3 jours après une IDC (au pli sous-caudal) ne compromet pas le diagnostic d'animaux infectés. De plus, Coad M. et ses collègues ont remarqué que la conservation de l'échantillon sanguin 24 h avant l'analyse

n'entraîne pas une diminution de la production d'IFN γ . Néanmoins, des réductions de l'absorbance (0, 3 ou 10 jours après l'IDC) sont observées à PS + 24 h avant l'analyse lorsque le mélange d'Ag ESAT6 et CFP10, est utilisé à la place des PPD.

Néanmoins, ces résultats ont été controversés par certains auteurs comme Whelan A.O. et ses collaborateurs (GB, 2004). En effet, les auteurs ont montré chez des animaux expérimentalement infectés, une diminution de l'absorbance (réponse en IFN γ à PPDB et PPDA) 3 jours après l'IDC, accentuée par une conservation de l'échantillon sanguin 24 h avant l'analyse (par rapport à PS + 8 h). Toutefois, cela n'affecte pas l'interprétation du test Bovigam[®] (basé sur les PPD) alors qu'une réduction du taux de détection des animaux infectés a pu être observée si l'ESAT6, seul ou en mélange avec du CFP10, est utilisé à la place des PPD.

De plus, Marassi C.D., Medeiros L. et Lilenbaum W. (2010, Brésil) ont montré une diminution de la sensibilité du test IFN γ réalisé entre 7 (74,3 %) et 21 jours (71,4 %) après l'IDC.

Thom M.L. et ses collègues (GB, 2006) ont également remarqué, chez des veaux expérimentalement infectés, que seules les réponses en IFN γ aux PPDA augmentaient rapidement 7 jours après l'IDC. Cet effet « booster » sélectif de la réponse à PPDA peut masquer le diagnostic de l'infection par le test Bovigam[®] (De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006a).

Par ailleurs, Lauzi S. et ses collègues (Italie, 2000) ont montré l'absence d'effet « booster » de l'IDC sur l'analyse d'IFN γ réalisée sur des animaux indemnes. En effet, ils ont obtenu une spécificité du test Bovigam[®] de 88,8 % lorsque la prise de sang pour l'analyse (IFN γ 1) est réalisée juste avant l'IDC. Puis, une seconde analyse IFN γ (IFN γ 2) est réalisée moins de 60 jours après l'IDC (et l'IFN γ 1) sur les animaux positifs ou douteux en IFN γ 1 (11,2 %). Seulement 0,5 % des animaux restent positifs à l'IFN γ 2 (spécificité d'IFN γ 2 à 95,4 %).

Au contraire, Marassi C.D., Medeiros L. et Lilenbaum W. (2010) ont montré une diminution de la spécificité du test IFN γ réalisé entre 7 jours (86,7 %) et 21 jours (80 %) après l'IDC.

En résumé, l'IDS (au pli sous-caudal) peut « booster » les réponses en IFN γ chez des animaux infectés par *M. bovis*. De plus, la prise de sang pour le test IFN γ peut être réalisée 3 jours après l'application de l'IDS sans compromettre le résultat du test. *A contrario*, l'IDC ne semble pas stimuler de manière significative cette production en IFN γ chez des animaux

naturellement infectés. Néanmoins, des résultats contradictoires ont été présentés par d'autres auteurs, dans le cas d'animaux expérimentalement infectés. En effet, les auteurs suggèrent de réaliser le test IFN γ dans les 7 jours suivants l'IDC (Wood P.R. et Jones S.L., 2001 ; Gormley E. *et al.*, 2005 ; De la Rúa Domenech R. *et al.*, 2006a).

En outre, selon certains auteurs, l'analyse IFN γ chez le bétail ne serait pas influencée par des applications multiples d'IDT. Cependant, ces injections répétées de tuberculines mèneraient à une désensibilisation des animaux naturellement infectés (Thom M. *et al.*, 2004 ; Rangen S.A. *et al.*, 2009 ; Coad M. *et al.*, 2010 ; Schiller I. *et al.*, 2010).

Enfin, aucun effet « booster » des IDT n'a été mis en évidence chez des animaux indemnes.

III.2.1.2.4.3. Utilisation d'Ag immunodominants : ESAT6/CFP10

Les Ag spécifiques tels ESAT6 et CFP10 sont désormais régulièrement employés pour le test IFN γ . Utilisés à la place des PPD, ils permettent d'augmenter la spécificité du test (mais diminuent la sensibilité) et s'avèrent donc utiles dans le contexte de réactions non spécifiques en réponses aux PPD (Tableau I.1.4) (Pollock J.M. et Andersen P., 1997 ; Andersen P. *et al.*, 2000 ; Pollock J.M. *et al.*, 2000 ; Rhodes S.G. *et al.*, 2000b ; Buddle B.M. *et al.*, 2001 et 2003 ; Wood P.R. et Jones S.L., 2001 ; Aagaard C. *et al.*, 2006 ; De la Rúa-Domenech R. *et al.*, 2006a).

De plus, l'utilisation des Ag ESAT6 et CFP10 pour le test IFN γ permet de discriminer *in vitro* les animaux vaccinés par *M. bovis* BCG, des animaux infectés par *M. bovis* (Buddle B.M. *et al.*, 1999 et 2001 ; Van Pinxteren L.A.H. *et al.*, 2000 ; Vordermeier H.M. *et al.*, 2001 ; Wood P.R. et Jones S.L., 2001).

En effet, l'Ag ESAT6 (identifié par Andersen A.B. *et al.*, 1995 et caractérisé par Sorrensen A.L. *et al.*, 1995) et l'Ag CFP10 (identifié par Berthet F.X. *et al.*, 1998) sont codés par des gènes présents dans le génome de *M. bovis* et *M. tuberculosis*, mais absent du génome de *M. bovis* BCG et de la plupart des mycobactéries environnementales (Harboe M. *et al.*, 1996 ; Pollock J.M. et Andersen P., 1997 ; Buddle B.M. *et al.*, 2001 ; De la Rúa-Domenech R. *et al.*, 2006a). Ainsi, des séquences homologues à ESAT6 et CFP10 ont été définies pour *M. kansasii*, *M. marinum* et *M. szulgai* (Sorrensen A.L. *et al.*, 1995 ; Harboe M. *et al.*, 1996 ; Pollock J.M. et Andersen P., 1997 ; Andersen P. *et al.*, 2000) ainsi que récemment *M. ryadhense* (Van Ingen J. *et al.*, 2009ab).

ESAT6 et CFP10 ont été identifiés comme des cibles majeures des LT d'animaux infectés par *M. bovis* et donc comme des Ag immunodominants pour stimuler *in vitro* les réponses en

IFN γ (Ag prédominants au début de l'infection) (Andersen A.B. *et al.*, 1995 ; Harboe M. *et al.*, 1996 ; Pollock J.M. et Andersen P., 1997 ; Rhodes S.G. *et al.*, 2000ab ; Buddle B.M. *et al.*, 2001).

Ces Ag immunodominants sont utilisés sous forme de protéines recombinantes (Pollock J.M. et Andersen P., 1997 ; Buddle B.M. *et al.*, 1999 et 2003 ; Rhodes S.G. *et al.*, 2000b ; Pollock J.M. *et al.*, 2000 et 2003 ; Van Pinxteren L.A.H. *et al.*, 2000 ; Waters W.R. *et al.*, 2004 ; Olsen I. *et al.*, 2005 ; Aggerbeck H. et Madsen S.M., 2006 ; Aagaard C. *et al.*, 2006 ; Weldingh K. et Andersen P., 2008) ou de peptides de synthèse (Vordermeier H.M. *et al.*, 2001 et 2006a ; Buddle B.M. *et al.*, 2003 ; Cockle P.J. *et al.*, 2006 ; Coad M. *et al.*, 2008).

Selon Pollock J.M. et Andersen P. en 1997, l'utilisation d'ESAT6 peut permettre aussi d'abaisser les seuils de positivité du test IFN γ pour augmenter la sensibilité par rapport aux PPD et garder un niveau acceptable de spécificité.

En outre, Van Pinxteren L.A.H. (2000), Vordermeier H.M. (2001 et 2006ab), Buddle B.M. (2003), Cockle P.J. [2006, (*utilisation d'Ag immunodominants spécifiques supplémentaires*)], Aagaard C. (2006), Coad M. (2008) et leurs collaborateurs respectifs ont démontré que l'utilisation en mélange des Ag ESAT6 et CFP10 permettait d'améliorer (d'autant plus qu'en individuel) la spécificité de l'immunodiagnostic *in vitro* de la Tb (Tableau I.1.4). Waters W.R. et ses collègues (2004) ont également montré qu'une protéine recombinante, issue de la fusion entre ESAT6 et CFP10, n'induit pas de réponse en IFN γ pour des animaux sensibilisés par *M. avium* ou par *M. avium* subsp. *paratuberculosis* alors que les PPD entraînent des réactions (faussement positives) pour ces animaux. Par contre, cette protéine recombinante induit une réponse égale à celle induite par les PPD chez des bovins infectés par *M. bovis*.

De plus, les résultats des travaux d'Ewer K. exposés par Coad M. et ses collègues (2008) ont montré que l'inclusion du cocktail ESAT6-CFP10 (mix) au test IFN γ conventionnel (Bovigam[®]) permettait d'augmenter sa sensibilité (estimée à partir des résultats positifs en PPD ou mix) ou sa spécificité (évaluée à partir des résultats négatifs en PPD et mix).

Toutefois, dans le cas d'infection par *M. kansasii* [Waters W.R. *et al.*, 2006 (EUA) ; Vordermeier H.M. *et al.*, 2007 (GB) ; Buddle B.M., Livingstone P.G. et De Lisle G.W., 2009 (NZ) ; Houlihan M. *et al.*, 2010 (GB)] ou *M. marinum* ou *M. szulgai*, des réponses *in vitro* à ESAT6 et/ou CFP10 peuvent être confondues avec des réactions observées dans le cas d'infection à *M. bovis*. Ce test ne permet donc pas de distinguer une infection à *M. bovis* d'une sensibilisation à une de ces mycobactéries atypiques.

Par ailleurs, des réactions non-spécifiques à certains Ag spécifiques du MTBC comme ESAT6, observées chez des jeunes animaux indemnes ont été rapportées dans les travaux d'Olsen I. et ses collaborateurs (2005). Ceci est probablement le résultat d'une production innée d'IFN γ par les cellules NK du sang périphérique stimulées *in vitro* par ces Ag (Olsen I. *et al.*, 2005 ; De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006a).

Tableau I.1.4. Résultats exposés par plusieurs auteurs, concernant des études de sensibilité (Se) et /ou de spécificité (Sp), obtenus pour le test IFN γ basé sur PPD, sur ESAT6 et CFP10 (en individuel et en mélange), puis sur PPD et mélange peptidique.

Test IFN γ basé sur ...	PPD		ESAT6		CFP10		ESAT6 & CFP10 en Mélange		PPD et Mélange (ESAT6 & CFP10)	
	Se	Sp	Se	Sp	Se	Sp	Se	Sp	Se	Sp
Pollock J.M. <i>et al.</i> , 2000	89,3	92,2	76,3	99,2	–	–	–	–	–	–
Vordermeier H.M. <i>et al.</i> , 2001	–	–	–	–	–	–	77,9	100	–	–
Buddle B.M. <i>et al.</i> , 2001	94	94	84	100	–	–	–	–	–	–
Buddle B.M. <i>et al.</i> , 2003 et 2009	95	74	–	–	–	–	89	93	–	–
Aagaard C. <i>et al.</i> , 2006	–	–	69	91	68	94	85	97	–	–
Vordermeier M. et Ewer K., 2006	–	96,7	–	–	–	–	–	97,0	–	94,6* 99,2**
Cockle P.J. <i>et al.</i> , 2006	84,5	93	–	–	–	–	91,4	98	–	–
Coad M. <i>et al.</i> , 2008 (données Ewer K.)	65	85,7	–	–	–	–	55	94,2	70* 50**	81,2* 98,7**

* Résultats PPD ou mélange peptidique (ESAT6 & CFP10 soit (R)) : PPDUR ; ** : Résultats PPD et ESAT6 & CFP10 (R) : PPD \cap R; – : pas de données.

Pour conclure, même si ESAT6 et CFP10 sont régulièrement utilisés, des études à large échelle concernant ces Ag font encore défaut.

D'après l'étude de Pollock J.M. et ses collègues réalisée en 2003 à partir de bovins infectés par *M. bovis* et de bovins sensibilisés par des mycobactéries environnementales, ESAT6 (avec une dose plus élevée que celle des PPD) peut induire *in vivo* des réactions de type HSR chez des bovins infectés par *M. bovis*. Ces auteurs ont obtenu une meilleure sensibilité pour l'IDT basée sur les PPD (86 % avec PPD et 82 % avec ESAT6) mais une meilleure spécificité pour l'IDT basée sur l'ESAT6 (100 % avec ESAT6 et 90 % avec PPD). Van Pinxteren

L.A.H. et ses collègues ont obtenu des résultats semblables en 2000 (utilisation des Ag ESAT6 et CFP10 en mélange).

III.2.2. La technique PCR en temps réel pour le diagnostic *post mortem*

La technique PCR est une méthode d'amplification de l'ADN *in vitro* (Cf. Annexe VIII) permettant la détection de quelques bactéries à partir d'un échantillon biologique.

Elle présente un intérêt fondamental dans le domaine du diagnostic de la Tb car elle est beaucoup plus rapide que la bactériologie (résultats rendus 48 heures/ plusieurs mois). De plus, elle s'avère très utile et efficace lorsque les prélèvements ont été contaminés par la flore de l'environnement et qu'ils sont inutilisables en culture. En effet, cette technique a servi à la détection de nombreux organismes qui étaient difficilement détectables par les méthodes conventionnelles (Erlich H.A. *et al.*, 1991). Par ailleurs, comme nous l'avons décrit précédemment, la PCR permet également, d'identifier plus rapidement (que les tests enzymatiques) les souches isolées sur milieu de culture (González Llamazares O.R. *et al.*, 1999a).

L'inconvénient de la PCR est qu'elle évalue la présence d'ADN et cela ne donne donc pas d'information sur la viabilité des agents détectés.

III.2.2.1. La PCR pour la recherche de Tb d'après la littérature

La littérature montre que la méthode PCR est largement employée pour détecter les membres de MTBC directement dans les tissus animaux (Corner L.A., 1994 ; Liébana E. *et al.*, 1995 ; Wards B.J., Collins D.M. et De Lisle G.W., 1995 ; De Araujo C.P., *et al.*, 2005 ; Zumárraga M.J. *et al.*, 2005 ; Hénault S., Karoui C. et Boschiroli M.L., 2006 ; Shitaye J.E., *et al.*, 2006 ; Taylor G.M. *et al.*, 2007 ; Cardoso M.A. *et al.*, 2007 ; Parra A. *et al.*, 2008). Néanmoins, la spécificité et la sensibilité du test PCR reposent tout d'abord sur le choix de la cible puis, sur la qualité d'hybridation des amorces et de la sonde (pour les tests PCR basés sur des sondes) avec la séquence sur l'ADN cible.

III.2.2.1.1. Différentes cibles génétiques spécifiques du MTBC

Les cibles génétiques utilisées en PCR pour la détection des bactéries du MTBC sont très nombreuses.

➤ Le gène *mpb-70*, responsable de la production de la protéine sécrétée MPB70, est considéré comme une cible spécifique et quantifiable (une seule copie dans tous les membres du MTBC) pour la détection moléculaire du MTBC (Cousins D., Wilton S. et Francis B., 1991 ; Kusomoki S. *et al.*, 1992 ; Gonzáles Llamazares O.R.*et al.*, en 1999a ; Young J.S., Gormley E. et Wellington E.M.H., 2005).

De même, MPB64 est une autre protéine sécrétée, codée par le gène *mpb-64* qui est présent dans les membres du MTBC et chez *M. kansasii* (Hugues M.S. *et al.*, 2005).

➤ De plus, le gène **Rv0577** également désigné *Cfp-32*, codant pour une protéine de 32 kDa du filtrat de culture, est strictement présent dans toutes les bactéries du MTBC (Huard R.C. *et al.*, 2003 a et b et 2006) ;

➤ Les éléments ADN mobiles répétés sont profusément utilisés comme séquences cibles des sondes ADN. Leurs applications concernent le diagnostic des maladies dues aux mycobactéries mais aussi l'épidémiologie des maladies infectieuses (Dziadek J. *et al.*, 1998).

Parmi les éléments répétés, les séquences d'insertion (IS) des mycobactéries sont souvent utilisées comme cibles pour la méthode PCR, comme le mentionne la littérature renvoyant à cette thématique. Quelques-unes des IS les plus connues et utilisées sont décrites ci-après.

- L'**IS1081** est une séquence amplement utilisée. Elle a été identifiée au nombre de 6 copies dans le génome de *M. bovis* par Collins D.M. et Stephens D.M. en 1991. Cet élément multi-copie est aussi exclusivement présent dans toutes les espèces du MTBC (Van Soolingen D. *et al.*, 1992; Taylor G.M. *et al.*, 2007). Ce n'est donc pas un marqueur épidémiologique satisfaisant puisqu'il présente un nombre de copies homogène entre les espèces (Dziadek J. *et al.*, 1998, 2000 et 2001). Selon Collins D.M. et Stephens D.M. en 1991 et Taylor G.M. *et al.* en 2007, la PCR *IS1081* est une bonne candidate pour détecter en routine des infections dues à *M. bovis* ou d'autres bactéries du MTBC à partir de nœuds lymphatiques ou d'autres tissus.

- L'**IS990**, caractérisée par Dziadek J. *et al.* en 1998, est également spécifique de MTBC, mais il ne semble être pas un bon marqueur puisqu'il porte deux mutations avec décalage du cadre de lecture. Néanmoins, selon Dziadek J., Sajduda A. et Borun M. en 2001, les éléments *IS1081* et *IS990* associés (multi-cibles ou duplex) peuvent constituer une alternative efficace à l'*IS6110* pour le diagnostic de la tuberculose dans des échantillons cliniques humains.

- L'**IS1607** est présente en une seule copie dans les souches de *M. tuberculosis*, *M. bovis* et *M. bovis* BCG. A la suite d'une étude réalisée en 2000, Dziadek J. et ses collègues ont pu conclure que l'**IS1607** semblait spécifique de MTBC. Néanmoins, cet IS est très peu décrite dans la littérature.

- L'**IS6110**, initialement isolée de *M. tuberculosis* par Thierry D. et ses collaborateurs en 1990, est retrouvée exclusivement dans le génome de tous les membres de MTBC (Thierry D. *et al.*, 1990 ab; McEvoy C.R.E. *et al.*, 2007). La différence de position et de nombre de copies d'IS est une source de polymorphisme (Haddad M., Masselot M. et Durand B., 2004a). La plupart des isolats de *M. bovis* découverts, a révélé que son génome comprend généralement moins de 5 copies d'**IS6110** et le plus souvent une seule copie (Van Soolingen D. *et al.*, 1991 et 1994 ; Haddad M., Masselot M. et Durand B., 2004a ; Zumárraga M.J. *et al.*, 2005).

Actuellement, l'**IS6110** est l'un des marqueurs les plus utilisés en PCR pour le diagnostic de la Tb. En 1995, Liébana E. et ses collègues ont conclu que l'**IS6110** permettait la détection par PCR des mycobactéries du MTBC, à partir d'échantillons de tissus bovins, même lorsque des mycobactéries à croissance rapide sont également présentes dans l'échantillon (source de contamination en culture) ou bien même si *M. bovis* est non-revivifiable (non-cultivable). En 1998, Vitale F. et ses collaborateurs ont montré que la PCR ciblée **IS6110** permettait une détection de MTBC chez les bovins à partir du lait, de nœuds lymphatiques et d'écouvillons nasaux. Néanmoins, ils ont obtenu une sensibilité de cette PCR nettement meilleure pour les échantillons de lait et ganglions (100 %) que pour les écouvillons nasaux (58 %).

Enfin, l'**IS986** est un membre de la famille des IS3. Identifiée en 1989 par Zainuddin Z.F. et Dale J.W., elle a été ensuite séquencée en 1990 par McAdam R.A. et ses associés qui ont conclu qu'elle était virtuellement identique à l'**IS6110**. Cette même année, les travaux de Hermans P.W.M. et ses collègues ont montré que l'**IS986** était un outil extrêmement utile pour le diagnostic et l'épidémiologie de la tuberculose.

III.2.2.1.2. Différentes cibles génétiques spécifiques de *M. bovis*

La méthode pour la détection directe de *M. bovis* ou MTBC par PCR, dans des échantillons de tissus bovins, a été développée pour améliorer le diagnostic de la Tb (Zumárraga M.J. *et al.*, 2005 ; Cardoso M.A. *et al.*, 2007).

En 1997, Fisanotti J.C. et ses collègues ont montré qu'une séquence flanquante du gène *mpb-64* présentait une homologie différentielle de séquences entre *M. bovis* et *M. tuberculosis* et par conséquent, qu'elle pourrait être employée comme cible d'un test PCR d'identification d'espèce.

Par ailleurs, en 1999, Zumárraga M. et ses collaborateurs ont découvert après une analyse de séquence des génomes de *M. tuberculosis* et *M. bovis*, l'absence chez *M. bovis* d'un fragment de 12,7 kb présent chez *M. tuberculosis*. Ce fragment de 12,7 kb est donc un marqueur pour différencier *M. bovis* de *M. tuberculosis*, qui peut être utilisé comme cible d'un test PCR (Zumárraga M. *et al.*, 1999 ; Bakshi C.S. *et al.*, 2005).

Enfin, en 2004, Kurabachew M. et ses collègues ont développé et évalué un test PCR (classique) multiplex, basé sur trois cibles – l'ADNr 16S spécifique du genre *Mycobacterium*, l'ADNr 23S spécifiques des espèces du MTBC et le gène *oxyR* de *M. bovis* (basée sur une différence nucléotidique par rapport aux autres espèces du MTBC) – permettant de détecter simultanément *Mycobacterium*, le MTBC et de différencier *M. bovis* des autres espèces du MTBC.

III.2.2.2. La méthode PCR IS6110 en temps réel de LSI (étudiée dans ce travail)

Spécifique, sensible et stable, la séquence IS6110 possède donc toutes les qualités requises pour le développement d'un test rapide de diagnostic par PCR à partir de prélèvements biologiques.

De plus, étant donné l'efficacité de la séquence d'insertion IS6110 en tant que cible PCR pour l'identification de MTBC dans les tissus (notamment démontrée en France pour la faune sauvage, par Hénault S., Karoui C. et Boschioli M.L., 2006), elle a été choisie par le LDAR 24 et proposée à la société LSI (Laboratoire Service International) afin de concevoir un test PCR en temps réel, utilisable en santé animale, pour la recherche rapide des espèces bactériennes du MTBC.

Un test PCR en temps réel a donc été développé, le kit TaqVet[®] MTBC basé sur un système de détection de l'IS6110 par une sonde Taqman[®] spécifique, à partir d'ADN extrait de tissus animaux.

III.2.2.2.1. Présentation du test PCR MTBC de LSI (1^{ère} version, 2007)

Le test PCR spécifique du MTBC conçu par LSI pour la recherche de la Tb est un système en duplex, c'est-à-dire qu'il présente deux cibles génétiques : l'une est l'IS6110 (MTBC) et

l'autre est un contrôle positif interne, pour l'extraction et l'amplification, appelé IPC (*Internal positive control*) (Cf. Annexe IX).

Le mix réactionnel PCR (1^{ère} version du kit) appelé « mix » (auquel l'échantillon ou les témoins à analyser sont ajoutés) comprend du « Master mix » (*Taq polymérase, de dNTPs et de tampons aqueux*) pour PCR basée sur un système Taqman[®] (Applied Biosystem, EUA) et, un mélange de séquences spécifiques du fragment d'IS6110 recherché (*sonde Taqman[®] et amorces*) et de séquences spécifiques d'un IPC endogène (*sonde Taqman[®] et amorces*).

L'amplification et la détection des cibles IS6110 et « IPC endogène » s'effectuent donc dans la même cupule. Ainsi, deux cibles sont recherchées par puits (monocupule) (Cf. Annexe IX).

Par ailleurs, cet IPC est qualifié d'endogène (IPC_{endo}) car il s'agit d'une séquence codant pour la GAPDH (Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) des ruminants qui est une protéine membranaire présente dans les tissus des ruminants. Il est extrait en même temps que l'IS6110 à partir de l'échantillon biologique. L'utilisation de cet IPC_{endo} permet ainsi de garantir à la fois l'efficacité de l'extraction et de l'amplification et l'absence d'inhibiteur dans les échantillons extraits.

Des témoins d'extraction et d'amplification sont également utilisés. Un témoin d'extraction négatif pour les deux cibles, nommé NCS (*Negatif Control Sample*) est employé. Il s'agit simplement de PBS qui est préalablement extrait comme un échantillon. Les résultats d'amplification du NCS permettent de vérifier l'absence de contamination par l'IS6110 (MTBC) et/ou l'IPC_{endo} lors de l'extraction.

Un témoin d'amplification négatif pour les deux cibles, appelé NC (*Negative Control*) est également utilisé. Il s'agit uniquement de « mix ». Les résultats permettent de vérifier l'absence de contamination par l'IS6110 (MTBC) et/ou l'IPC_{endo} lors des étapes de préparation des Mix et de dépôt des échantillons.

Enfin, un témoin d'amplification positif pour la cible IS6110, nommé EPC (*External Positive Control*) est inclus dans le kit. Cet EPC est de l'ADN extrait de *M. bovis*. Les résultats d'amplification permettent de vérifier l'efficacité de l'amplification par PCR de l'IS6110.

La validation de l'analyse PCR par ces trois témoins (NC, EPC et NCS) est réalisée en vérifiant si les valeurs de cycle seuil (Ct) obtenues pour chaque témoin, sont en accord avec les valeurs de contrôle qualité du kit, données par le fournisseur. En effet, l'EPC doit être positif seulement pour la cible IS6110, c'est-à-dire la valeur de Ct obtenue pour l'EPC doit

être comprise entre 25 et 28 avec le détecteur IS6110 et supérieure à 40 avec le détecteur IPC_{endo}. Enfin, le NC et le NCS doivent être chacun négatifs pour les deux cibles. Ainsi, la valeur de Ct obtenue pour le NC doit être supérieure à 45 avec les détecteurs IS6110 et IPC_{endo}. La valeur de Ct obtenue pour le NCS doit être également supérieure à 40 avec les détecteurs IS6110 et IPC_{endo}.

Après la validation de l'analyse PCR par les témoins, les résultats des échantillons peuvent être interprétés en fonction des valeurs de Ct obtenues avec les détecteurs IS6110 et IPC_{endo} (Tableau I.1.5).

Tableau I.1.5. Interprétation des résultats des échantillons analysés avec la 1^{ère} version de la méthode PCR IS6110 étudiée, en fonction des valeurs de Ct obtenues avec les détecteurs IS6110 (Ct IS6110) et IPC_{endo} (Ct IPC_{endo}).

Interprétation des résultats de l'échantillon	Valeur du Ct IS6110 obtenue pour l'échantillon	Valeur du Ct IPC _{endo} obtenue pour l'échantillon
MTBC Positif	≤ 40 (a)	≤ 40 ou > 40
MTBC Négatif	> 40	≤ 40
Invalide	> 40	> 40 (b)

Légende :

(a) Pour des échantillons de même nature, plus la valeur de Ct IS6110 est faible, plus la charge bactérienne contenue dans l'échantillon est importante.

(b) Dans le cas de résultat invalide (en raison de la présence d'inhibiteurs,...), il est nécessaire de diluer l'échantillon au 1/10 (par exemple 10 µl d'ADN dans 90 µl d'eau) et recommencer la PCR. Pour l'interprétation, la valeur du Ct IPC_{endo} obtenue doit être inférieure ou égale à 43 (40+3, le fait de diluer l'échantillon au 1/10, on doit ajouter théoriquement 3,3 unités de Ct à 40).

Néanmoins, un système d'interprétation des résultats des échantillons plus précis (inclusion d'une zone douteuse) serait nécessaire. Pour établir ce mode d'interprétation, il faudrait avoir déterminé la limite de détection de ce test PCR. Par ailleurs, la sensibilité et la spécificité analytique du test devraient être vérifiées. De même, il faudrait connaître les performances du test utilisé sur le terrain (valeur opérationnelle).

III.2.2.2.2. Conditions de réalisation du test

Ce test a été conçu en vue d'une utilisation directe à partir de ganglions ou organes d'animaux mais il peut être aussi utilisé indirectement, pour l'identification de colonies isolées. Dans les deux cas, une étape préalable d'extraction d'ADN présent dans l'échantillon est requise.

Chapitre 2 :

Organisation de la lutte

contre la Tuberculose bovine en France

I. Dispositif national règlementaire de la lutte contre la Tuberculose bovine

I.1. Evolution pertinente de la conception de la lutte contre la Tb (Bénet J.J. *et al.*, 2006)

La lutte collective contre la Tb, dirigée par l'Etat, commencée dans les années cinquante et formalisée par les textes de 1963, fondateurs des grandes prophylaxies, était axée (1) sur le dépistage des animaux infectés par IDT lors de contrôles de surveillance sur tous les bovins de tous les cheptels ou lors de contrôle à l'introduction, (2) par inspection des carcasses animales à l'abattoir, en vue de leur élimination et (3) sur l'assainissement des élevages infectés par élimination de tous les animaux réagissant aux IDT (abattage partiel de ces élevages). La protection des élevages indemnes ou assainis de Tb, reposait donc seulement sur le contrôle sanitaire des bovins introduits. Ces élevages étaient exposés à de nombreux risques de contamination.

Cette approche focalisée sur l'élimination des animaux tuberculeux était tout à fait justifiée dans la situation nationale du début de la lutte caractérisée par un fort taux de prévalence de Tb. Néanmoins, la limite de cette stratégie a été atteinte du fait de la baisse progressive de l'infection au plan national.

Les concepts actuels de la lutte contre la Tb, énoncés dans l'arrêté ministériel (AM) du 16 mars 1990 et repris dans l'arrêté ministériel du 15 septembre 2003, donne la priorité à la protection des cheptels indemnes et au maintien de leur qualification d'officiellement indemne de Tb (Cf. Tableau I.2.2, page 102). La démarche n'est donc plus celle du pathologiste qui lutte contre l'infection mais celle de l'hygiéniste qui préserve le statut indemne (Bénet J.J. *et al.*, 2006).

Ainsi, la protection des cheptels indemnes repose désormais sur la maîtrise des risques de contamination (introduction, résurgence et voisinage).

Depuis 1999, il a été mis en place un réseau national harmonisé de diagnostic *post mortem* de la Tb dans des laboratoires agréés (AM 04 mai 1999 ; Note de service (NS) du 20 janvier 2000 ; NS 22 novembre 2000 (a et b)). De plus, l'assainissement des cheptels infectés est depuis 1999 obligatoire effectué par un abattage total de ces cheptels (AM 04 mai 1999 ; NS 14 janvier 2002).

Néanmoins, depuis 2003, un système de surveillance épidémiologique axé sur les élevages à risque a été introduit à la place d'une surveillance identique de tous les élevages.

En outre, la protection de la santé publique à l'égard de la Tb est également considérée par la réglementation depuis 2003.

I.1.1. Evolution des mesures offensives

I.1.1.1. Dépistage de l'infection

Les critères de reconnaissance de l'infection tuberculeuse étaient initialement (1963) basés sur le constat de réaction positive à la tuberculination (IDS) de contrôle annuel (pratiquée sur tout l'élevage) ou d'achat (pratiquée à l'introduction) ou, de lésions macroscopiques jugées tuberculeuses suite à l'inspection à l'abattoir (surveillance continue mais tardive). En effet, en raison du pourcentage élevé d'élevages infectés et d'une spécificité troupeau relativement bonne (due à la petite taille des troupeaux), la valeur prédictive positive (VPP) de l'IDS était forte et par conséquent le test était perçu comme infaillible.

Toutefois, dans un souci d'amélioration de la spécificité du dépistage, l'IDC a été définitivement adoptée en 1990 comme méthode de confirmation de l'IDS, afin d'écartier les risques de réactions faussement positives de l'IDS dues à des infections à des mycobactéries atypiques (AM 16 mars 1990).

Néanmoins, la situation s'inversait progressivement (chute de la VPP) en raison de la baisse de la prévalence nationale et de l'augmentation de la taille des troupeaux (forte diminution de la spécificité troupeau).

Il a donc été décidé d'adapter le rythme des contrôles tuberculiques pratiqués dans chaque département sur les troupeaux officiellement indemnes sauf ceux jugés à risque (cas de vente de lait cru, d'assainissement après un épisode infectieux), en fonction du statut sanitaire départemental (AM 16 mars 1990). De plus, en 1999, les réactions positives en IDT ainsi que les observations d'abattoir n'étaient plus jugées suffisantes pour déclarer un cheptel infecté. En effet, le diagnostic *post mortem* microscopique de laboratoire permettant la mise en évidence directe de l'agent causal était alors devenu nécessaire pour garantir la fiabilité maximale des résultats des autres tests (AM 04 mai 1999). Par conséquent, il a été mis en place « *un réseau national et harmonisé de diagnostic de la Tb dans des laboratoires agréés* » (AM 04 mai 1999 ; AM 19 octobre 1999 ; NS 20 janvier 2000 ; NS 22 novembre 2000 ab).

En outre, l'arrêté ministériel du 24 janvier 2005 a instauré une visite annuelle obligatoire des élevages bovins, devenue depuis périodique, visant à la prévention et à la maîtrise des MRC de l'espèce bovine, et notamment la Tb. Cette visite contribue à la détection des cheptels pouvant présenter un risque sanitaire à l'égard de la Tb. En effet, elle permet notamment

d'apporter des renseignements sur la structure de l'élevage, les risques extérieurs à l'exploitation (mouvements des bovins, circulation des véhicules et personnes, le « voisinage » - pâtures, points d'eau, utilisation de matériel en commun, faune sauvage) et les risques dans l'exploitation (séparation des espèces animales, isolement des bovins malades) (NS 07 mars 2005).

I.1.1.2. Assainissement

Jusqu'en 1990, l'assainissement des élevages infectés s'effectuait par élimination des seuls animaux réagissants aux IDT (abattage sélectif donc partiel). Par ailleurs, il était mentionné l'obligation de « *désinfection des locaux et du matériel à l'usage des animaux* ».

Or, l'allègement progressif du rythme des tuberculinations a renforcé la nécessité de recourir systématiquement (en 1999) aux mesures d'abattage total des cheptels bovins déclarés infectés de Tb sur l'ensemble du territoire (sauf cas particuliers des races d'intérêt local, en Camargue) suivi également de l'obligation de procéder à un récurage et un nettoyage approfondis des locaux d'élevage ainsi qu'à leur désinfection complète au moyen de désinfectants appropriés autorisés (AM 04 mai 1999 ; NS 20 janvier 2000).

I.1.2. Evolution des mesures défensives

I.1.2.1. Protection des cheptels indemnes

Les facteurs de risque de contamination des élevages indemnes n'ont été pris en compte que progressivement par la réglementation.

I.1.2.1.1. Maîtrise du risque lié à l'introduction

Aux débuts de la lutte, tout bovin introduit dans un élevage devait être indemne de Tb. Ainsi, il devait être isolé des autres animaux de l'élevage d'accueil et contrôlé par IDS quel que soit son âge. Un résultat négatif à l'IDS pouvait alors garantir son introduction. La maîtrise du risque lié à l'introduction reposait donc sur une confiance totale envers les résultats tuberculiniques.

En 1975, il a été introduit l'interdiction pour les élevages infectés de vente de bovins. Ainsi, tout bovin introduit dans un élevage devait également provenir d'un élevage reconnu indemne (1). Afin que les éleveurs disposent d'un moyen de contrôle pour satisfaire à cette obligation, il a donc été mis en place en 1978 pour chaque animal un « passeport » portant le numéro

d'identification individuelle de l'animal et, le numéro et l'état sanitaire de l'élevage d'origine (« attestation sanitaire à délivrance anticipée » (ASDA), indispensable à la libre circulation des bovins (de couleur verte)).

En 1990 (AM 16 mars 1990), des sanctions administratives telles que la perte de qualification d'officiellement indemne ont été appliquées en cas de non-respect des règles liées à l'introduction (1).

De plus, en 2006 le transfert d'animaux a été réduit de 30 à 6 jours afin de minimiser les risques d'exposition des animaux à d'éventuelles contaminations durant le trajet.

Par conséquent, l'obligation (par l'acquéreur) de dépistage par tuberculination des bovins de plus de six semaines en provenance d'un cheptel indemne a été supprimée quand le transfert dure moins de 7 jours, sauf exceptions, c'est-à-dire dans le cas de mouvements considérés à risques (mouvements en provenance d'un cheptel à risque (cheptels « susceptibles », cf. Tableau I.2.2) ou à destination d'un cheptel à fort taux de rotation). Dans ce cas, les animaux doivent obligatoirement être reconnus indemnes (Cf. Tableau I.2.2) par contrôles tuberculiques pratiqués dans l'élevage d'origine avant leur départ, afin d'éviter le cas échéant, une éventuelle dissémination de l'infection dans l'élevage destinataire.

I.1.2.1.2. Maîtrise du risque de résurgence

Aux débuts de la lutte, la prise en considération du risque de résurgence reposait également sur une confiance totale envers les résultats tuberculiques puisque l'assainissement des troupeaux infectés était basé sur l'abattage sélectif des seuls animaux réagissants. En outre, le phénomène d'anergie suite à une IDT n'était estimé que de manière subjective par le vétérinaire sanitaire.

Néanmoins, dans la circulaire de 1978, les services vétérinaires qualifiaient de non « *sens-sanitaire* » le fait de conserver les animaux n'ayant pas réagi aux IDT, lorsqu'un fort pourcentage d'animaux réagissait positivement dans un élevage. Ils recommandaient donc de procéder à l'abattage total de l'élevage.

Finalement, afin d'éviter le risque de persistance et de diffusion de la Tb dans des cheptels anciennement infectés et assainis par abattage partiel (sans nouvelle introduction de l'agent pathogène), l'assainissement par abattage total des cheptels dont l'infection a été confirmée, a été mis en place en 1990 et rendu obligatoire par l'arrêté ministériel du 04 mai 1999.

I.1.2.1.3. Maîtrise du risque lié au voisinage

Jusqu'en 1999, le risque de voisinage avec un élevage infecté, en particulier le risque lié au contact entre animaux infectés et non infectés au pâturage, n'était pas abordé dans les textes réglementaires. Un nouveau statut pour le cheptel a été défini dans l'arrêté ministériel du 04 mai 1999. Ainsi, un cheptel est « susceptible d'être infecté lorsqu'un lien épidémiologique » (pâtures communes ou contigües, matériel en commun) « a été établi avec un cheptel infecté » (Cf. Tableau I.2.2). Dans ce cas, le cheptel est placé sous surveillance par un arrêté préfectoral de mise sous surveillance (APMS) et des tests de dépistage sont entrepris. Toutefois, l'appréciation des risques de voisinage et le choix des actions menées pour les maîtriser étaient laissés à l'initiative et à la responsabilité des acteurs locaux, ce qui supposait qu'ils avaient les connaissances nécessaires.

Or, l'arrêté ministériel du 15 septembre 2003 prit en compte de façon définitive le risque de voisinage, en donnant des moyens réglementaires aux Services vétérinaires de conduire des enquêtes épidémiologiques (visant à détecter les cheptels susceptibles d'être infectés) et des investigations (tests tuberculiques, abattages diagnostiques) de terrains auxquelles les éleveurs sont obligés de se soumettre. De plus, depuis 2005, la visite sanitaire obligatoire des élevages bovins, réalisée par le vétérinaire sanitaire par le biais d'un questionnaire, contribue à l'identification des cheptels susceptibles de présenter notamment un risque sanitaire de Tb (AM 24 janvier 2005; NS 07 mars 2005).

I.1.2.2. Qualification des élevages

Au début de la lutte, l'unité fondamentale était l'animal et la qualification officiellement indemne des élevages découlait de l'examen tuberculique des animaux. En 1990, cette relation de condition s'est inversée. Ainsi, un animal est indemne s'il appartient à un cheptel indemne (Cf. Tableau I.2.1, page 101).

La qualification sanitaire indemne d'un cheptel repose sur la vérification de l'état sanitaire des animaux, par tuberculation et de la bonne maîtrise des facteurs de risque, en particulier du respect du contrôle sanitaire avant introduction de bovins dans un cheptel indemne et de sa vérification.

Le maintien de la qualification résulte de l'issue favorable des mesures suivantes :

- contrôle périodique de l'état sanitaire des animaux du troupeau (par tuberculation) et du respect des mesures de protection sanitaire;
- surveillance par inspection systématique des carcasses à l'abattoir ;

- contrôle de l'état sanitaire des bovins faisant l'objet d'une transaction commerciale ;
- enquête épidémiologique en cas de découverte d'un élevage reconnu infecté de Tb.

Par ailleurs, cette qualification peut concerner les régions qui présentent une excellente situation sanitaire. Ce sont des régions qui présentent un taux de prévalence si faible qu'elles peuvent bénéficier d'un allègement du rythme des tuberculinations et voire même une suppression. Ainsi, selon la valeur des indicateurs épidémiologiques choisis, il est possible de qualifier une région indemne de Tb. Par voie de conséquence les élevages de cette région peuvent aussi bénéficier de la qualification sanitaire, sous réserve de respecter les règles liées à la maîtrise du risque d'introduction.

I.2. Organisation sanitaire de la lutte collective contre la Tb

Le dispositif de lutte repose sur une organisation (Figure I.2.1) combinant des services de l'Etat, (administration centrale et services vétérinaires déconcentrés), des collaborateurs (vétérinaires sanitaires), des partenaires (Groupements de défense sanitaire), et des structures d'appui scientifique et technique (Afssa et Laboratoires vétérinaires agréés) (Ganière J.P. *et al.*, 2009).

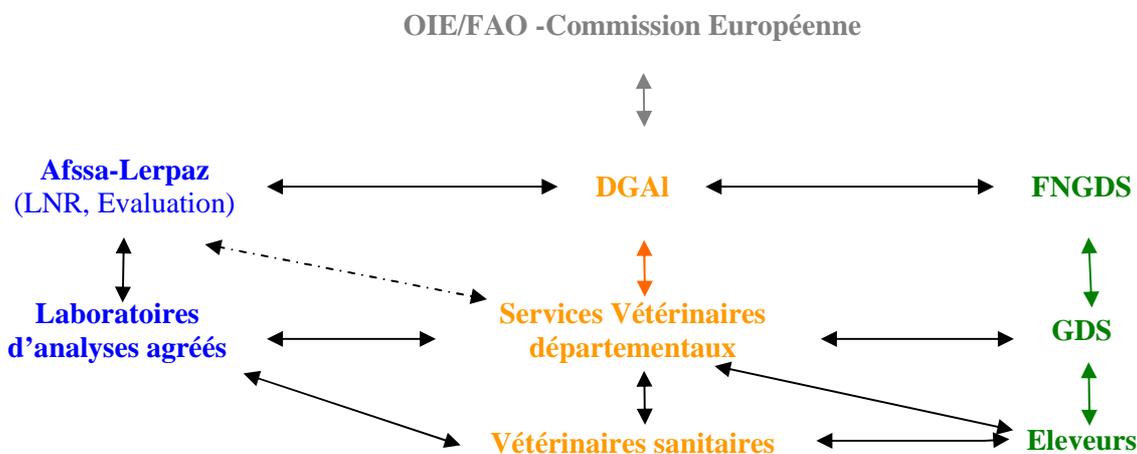


Figure I.2.1. Acteurs du dispositif de lutte contre la tuberculose bovine (d'après Fabre P., Garin-Bastuji B. et Boschioli M.L., 2006).

I.2.1. Les Eleveurs

L'éleveur (Figure I.2.1) est un acteur essentiel dans la lutte car il est le principal intervenant sur l'état sanitaire de son cheptel. Par ses décisions et ses méthodes d'élevage, il apprécie l'importance des facteurs de risque menaçant son cheptel. Il peut intervenir à tous les stades de l'infection : lors de l'introduction de la maladie dans son cheptel (par ex., non-respect des mesures sanitaires) ; lors du maintien de la maladie dans son cheptel (par ex., dissimulation

d'animaux, allongement des délais d'abattage des animaux infectés), lors de la résurgence de la maladie (par ex., non-respect des normes sanitaires de désinfection).

I.2.2. Les Groupements de défense sanitaire

Créées en 1954, les Groupements de défense sanitaire (GDS) (Figure I.2.1) sont des associations d'éleveurs groupés librement au niveau départemental. Ce sont des organismes agricoles à vocation sanitaire dont le rôle est d'aider les autorités départementales (Directions départementales des services vétérinaires (DDSV)) par la mise en place de prophylaxie volontaire (prophylaxie de la Tb rendue obligatoire en 1963). Les GDS sont regroupés en une fédération nationale (FNGDS).

Ils ont pour mission de susciter l'engagement volontaire des éleveurs dans un plan concerté, comme le plan de lutte contre la Tb (respect de l'ensemble des mesures de lutte), permettant aux éleveurs d'obtenir différentes aides compensatoires.

Ainsi, ils assurent auprès des éleveurs : un appui administratif par émission et délivrance de documents d'identification et, ASDA (en liaison avec la DDSV et l'établissement départemental de l'élevage (EDE)) ; un soutien technique par des services techniques de réalisation de dispositifs d'aide à la contention et de désinfection ; une aide juridique pour tout ce qui relève des affaires sanitaires ; et enfin, un soutien financier, par des aides complémentaires à celles de l'Etat, dans le cadre d'une mutualisation des moyens procurés par les cotisations des adhérents (au prorata du nombre d'animaux) et des subventions du Conseil général.

Il joue donc un rôle d'interface pour faire en sorte que les éleveurs adoptent les attitudes responsables plutôt que de subir les décisions réglementaires imposées par les services vétérinaires (DDSV).

I.2.3. Les Vétérinaires sanitaires

Le Vétérinaire sanitaire (VS) (Figure I.2.1) intervient dans l'élevage bovin pour exécuter les interventions de dépistage lors de prophylaxie ou de contrôle à l'introduction ou pour réaliser les visites sanitaires annuelles obligatoires (questionnaire). Son intervention se fait le plus souvent sur demande de l'éleveur ou du GDS mais aussi sur ordre des services vétérinaires (DDSV).

Au niveau départemental, les Groupements techniques vétérinaires (GTV) jouent un rôle de formation et de sensibilisation auprès des vétérinaires.

I.2.4. Les Directions départementales des services vétérinaires

Les DDSV (Figure I.2.1) mettent en œuvre la réglementation et coordonnent les actions des différents intervenants (VS, GDS,...) au niveau départemental. En effet, elles assurent le suivi des qualifications des troupeaux, conduisent les procédures de diagnostic de l'infection, réalisent les enquêtes épidémiologiques en cas de foyer et mettent en œuvre l'assainissement des troupeaux infectés. Elles centralisent les informations en provenance des vétérinaires, des abattoirs, des laboratoires et de l'Afssa.

Suite aux changements résultant de la fusion de différents services de l'Etat le 1^{er} janvier 2010, les services vétérinaires (dans chaque département) appartiennent désormais à une Direction départementale de la cohésion sociale et de la protection des populations (DDCSPP (ex DDSV)).

I.2.5. Les Laboratoires départementaux d'analyse agréés

Les Laboratoires départementaux agréés (Figure I.2.1) réalisent les analyses histologiques et bactériologiques à partir de prélèvements effectués par les services vétérinaires à l'abattoir, suite à la constatation de lésions suspectes de Tb. La confirmation bactériologique est réalisée par l'Afssa.

I.2.6. L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments

Le Lerpaz de l'Afssa (créée en 1998) (Figure I.2.1) est le Laboratoire national de référence de la Tb. L'Afssa a pour rôle d'évaluer les risques sanitaires liés à la Tb et d'apporter à l'Etat un appui scientifique et technique nécessaire à l'élaboration, l'application et l'évaluation des mesures prises.

En effet, elle réalise l'identification des souches (en provenance des Laboratoires départementaux), indispensable pour confirmer l'infection. De plus, elle apporte des informations utiles dans les enquêtes épidémiologiques (pour établir les relations entre les foyers), par le typage des souches. Par ailleurs, elle peut aussi procéder directement aux recherches de mycobactéries dans des situations complexes.

L'Afssa fait également partie des Laboratoires internationaux de référence de la Tb (OIE, FAO (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture)).

I.2.7. La Direction générale de l'alimentation

La Direction générale de l'alimentation (DGAI) (Figure I.2.1) représente l'Autorité vétérinaire centrale au Ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche et des affaires rurales. La DGAI a pour rôle de recueillir les données épidémiologiques et d'élaborer la réglementation de la Tb.

Elle rapporte la situation sanitaire de la France aux organisations internationales (telles que l'OIE, la FAO) qui concourent à une coordination à l'échelon européen voire mondial de la lutte contre la tuberculose bovine (Figure I.2.1).

I.3. Procédures nationales règlementaires de dépistage et diagnostic de la Tb (au 1^{er} janvier 2007)

Les tableaux I.2.1 et I.2.2 présentent respectivement les statuts des animaux et des cheptels définis par l'arrêté ministériel du 15 septembre 2003 modifié* (modifié par les AM du 10 novembre 2003, du 24 janvier 2005 et du 11 janvier 2006), fixant les mesures techniques et administratives relatives à la prophylaxie collective et à la police sanitaire de la tuberculose des bovinés et des caprins.

Tableau I.2.1. Catégories d'animaux définies par les textes règlementaires de la lutte contre la Tb chez les bovinés (d'après l'AM du 15/09/2003 modifié* et Toma B. et Dufour B., 2004).

Statut de l'animal	Caractéristiques
« indemne de Tb »	- Appartient à un troupeau officiellement indemne de Tb.
« contaminé de Tb »	- Appartient à un troupeau déclaré infecté de Tb mais n'est pas « infecté de Tb ».
« suspect d'être infecté de Tb »	- Présente des lésions évocatrices de Tb à l'abattoir ou l'autopsie ou - Présente des lésions histologiques évocatrices de Tb dans un laboratoire agréé ou - Présente une IDT non-négative.
« infecté de Tb »	- Présente des signes cliniques de Tb et une IDT positive ou - A permis l'isolement et l'identification de <i>M. tuberculosis</i> ou <i>M. bovis</i> dans un laboratoire agréé ou - Présente une IDC positive et héberge une mycobactérie du MTBC identifiée par un laboratoire agréé ou - Présente une IDC positive et des lésions histologiques évocatrices de Tb ou - Appartient à un troupeau infecté et présente des lésions évocatrices de Tb (à l'abattoir ou l'examen histologique) ou une IDT non-négative.

Tableau I.2.2. Catégories de troupeaux (cheptels) définies par les textes règlementaires de la lutte contre la Tb chez les bovinés (d'après l'AM du 15/09/2003 modifié* et Toma B. et Dufour B., 2004).

Statut du troupeau	Caractéristiques
« officiellement indemne de Tb »	<ul style="list-style-type: none"> - Absence de manifestation clinique de Tb sur tous les animaux. - Résultat négatif à deux IDT à six mois ou un an d'intervalle sur tous les animaux de plus de six semaines. - Introduction d'animaux de plus de six semaines négatifs à l'IDT (de contrôle à l'introduction) et provenant directement de troupeaux indemnes. - Détention de façon distincte d'animaux d'autres espèces sensibles de statut sanitaire inconnu au regard de la Tb.
« susceptible d'être infecté de Tb »	<ul style="list-style-type: none"> - Lors de lien épidémiologique à risque (voisinage, introduction) constaté avec un animal ou un troupeau infecté de Tb ou avec un foyer confirmé de Tb dans la faune sauvage ou - Ayant retrouvé sa qualification après avoir été reconnu atteint de Tb ou - Non-respect des dispositions règlementaires relatives à l'identification et/ou la circulation des animaux et/ou aux conditions de maintien de la qualification « officiellement indemne » de Tb ou - Défaut important de maîtrise des risques sanitaires constaté suite à la visite annuelle obligatoire des élevages bovins.
« suspect d'être infecté de Tb »	<ul style="list-style-type: none"> - Lorsqu'au moins un boviné suspect de Tb y est détenu ou en provient.
« infecté de Tb »	<ul style="list-style-type: none"> - Lorsqu'au moins un boviné infecté de Tb y est détenu ou en provient.

I.3.1. Procédures de dépistage et diagnostic *ante mortem* de la Tb

En France, les procédés règlementaires de dépistage et diagnostic *ante mortem* d'animaux tuberculeux sont décrits dans l'arrêté ministériel du 15 septembre 2003 modifié* (Cf. Figure I.2.2).

Contrôles Prophylactiques

La recherche en élevage d'animaux tuberculeux s'effectue lors de campagne de prophylaxie (automne d'une année civile à printemps de l'année suivante) par des IDT sur l'animal vivant âgé de six semaines et plus.

La prophylaxie par IDT a pour objet l'acquisition et le maintien de la qualification officiellement indemne de Tb des troupeaux (AM 15 septembre 2003 modifié*). La simple découverte d'une réaction non-négative à une IDT (animal suspect donc le cheptel aussi,

cf. Tableaux I.2.1 et I.2.2) entraîne la suspension de la qualification et la mise sous surveillance du troupeau (APMS) (NS du 14 janvier 2002). Cette prophylaxie est obligatoire sur l'ensemble du territoire national à l'égard de tous les troupeaux bovins et s'applique dans tous les lieux de séjour, de rassemblement ou d'accès fréquentés par les animaux de l'espèce bovine (AM 15 septembre 2003 modifié*).

Toutefois, comme nous l'avons décrit précédemment, le rythme des contrôles tuberculiques retenu dans chaque département pour les troupeaux officiellement indemnes dépend du statut sanitaire départemental au regard de la Tb (AM 15 septembre 2003 modifié*).

En effet, le rythme des contrôles tuberculiques est biennal pour les troupeaux des départements avec une prévalence annuelle inférieure à 1 % au cours de deux années civiles consécutives (Toma B. et Dufour B., 2004). C'est le cas en Dordogne où la réalisation du test s'effectue selon un rythme biennal pour les bovins âgés de 18 mois et plus. Certains départements compte tenu de leur situation sanitaire en sont même dispensés (Cf. Remarque selon AM 15 septembre 2003 modifié*).

Néanmoins, la prophylaxie de la Tb, dans les troupeaux de bovinés ayant retrouvés leur qualification officiellement indemne de Tb après un épisode infectieux, est effectuée selon un rythme annuel par IDS [...] ou par IDC pendant une période de dix années (AM 15 septembre 2003 modifié*, Article 33). De plus, le rythme des contrôles tuberculiques est également annuel pour les troupeaux des départements avec une prévalence annuelle supérieure ou égale à 1 %.

Remarque : Le rythme des prophylaxies est triennal pour une prévalence annuelle inférieure à 0,2 % au cours de quatre années civiles consécutives (bovins âgés de 24 mois et plus) et quadriennal pour une prévalence annuelle inférieure à 0,1 % au cours de six années civiles consécutives (bovins âgés de 24 mois et plus); Le dépistage peut également être supprimé par le Préfet après avis de la Commission départementale des prophylaxies et de la DGAI.

Contrôle à l'introduction et Enquêtes épidémiologiques

En dehors des campagnes de prophylaxie, les IDT sont également employées pour les contrôles à l'introduction et les enquêtes épidémiologiques.

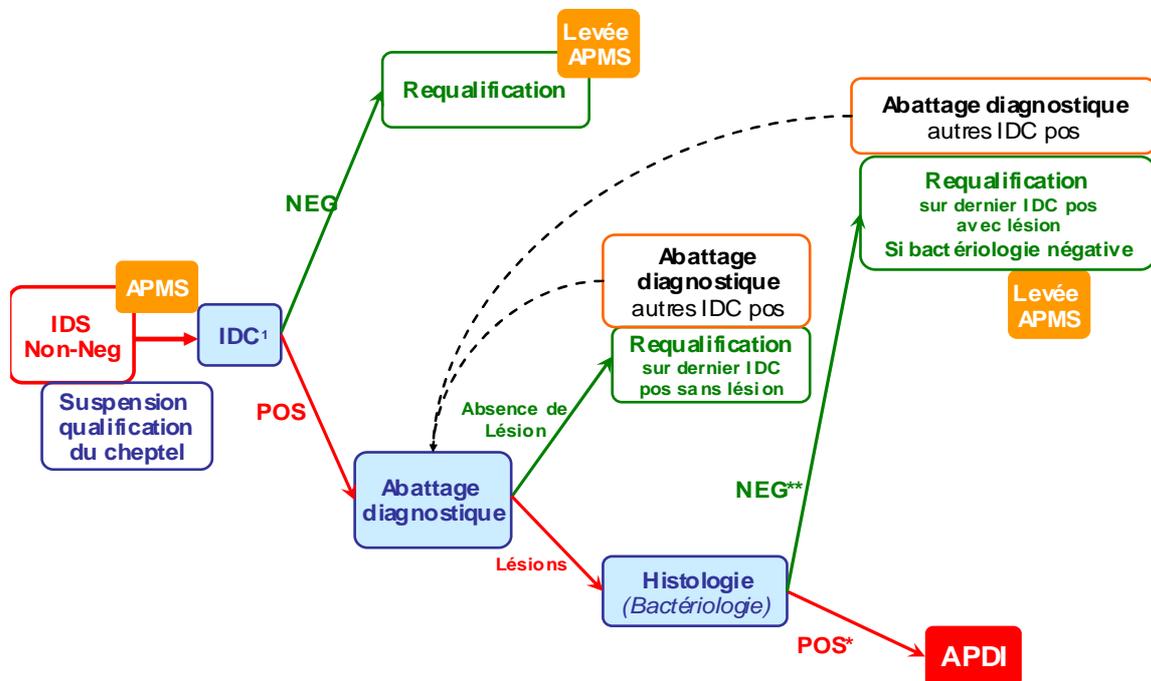
Protocole de recherche d'animaux tuberculeux à partir du dépistage par IDT et ses limites (Cf. Figure I.2.2)

L'IDS est un test de dépistage très sensible, utilisé en première intention. Dans le cas d'une réaction négative (résultats négatifs pour l'ensemble des animaux testés) à l'IDS, le cheptel

est reconnu ou maintenu officiellement indemne de Tb (Cf. Annexe XI). A l'inverse, dans le cas d'une réaction non-négative (douteuse ou positive) à ce test, pour au moins un animal, la qualification du cheptel est suspendue avec APMS et après un délai obligatoire de six semaines, une IDC (plus spécifique) est effectuée sur l'animal afin de confirmer ou d'infirmer le résultat de l'IDS. Durant cette longue période de suspension de qualification, les animaux ne peuvent sortir qu'à destination exclusive de l'abattoir (sous valorisation bouchère (perte des labels par exemple)) sous couvert d'un laissez-passer délivré par la DDSV (vente impossible de certaines catégories d'animaux (veaux, broutards, ...)).

Dans le cas d'une réaction négative à l'IDC, le cheptel est requalifié et l'APMS est levé. A l'inverse, dans le cas d'un résultat non-négatif (douteux ou positif) à ce test, la qualification du cheptel reste suspendue et il n'est toujours pas possible de conclure à l'infection tuberculeuse du cheptel sur la seule base de ces résultats (NS 14 janvier 2002).

Le recours à l'abattage à des fins diagnostiques est alors nécessaire (NS 14 janvier 2002). En effet, l'abattage diagnostique de l'animal réagissant est pratiqué pour rechercher la présence de lésions suspectes de Tb. Une indemnisation forfaitaire est versée par l'Etat aux éleveurs pour compenser une partie des pertes dues à la sous valorisation bouchère.



POS* : Histologie pos et/ ou Bactériologie pos.
 NEG** : Histologie nég et Bactériologie en attente de résultat.
 IDC1: sur un lot d'animaux (du cheptel) dont ceux avec IDS non-nég.

Figure I.2.2. Séquence diagnostique à partir du dépistage de la Tb en prophylaxie selon l'AM du 15/09/03 modifié*.

Dans le cas de découverte de lésions suspectes, des prélèvements de tissus lésés sont analysés par examens histologique et bactériologique.

Si le résultat de l'histologie est positif, l'animal est alors considéré comme infecté sans attendre le résultat bactériologique (Cf. Tableau I.2.1). Ce diagnostic histologique est donc légalement suffisant pour conduire à l'abattage total du cheptel, mais il peut cependant poser problème car cette décision est fréquemment contestée par l'éleveur.

A l'inverse, dans le cas d'un résultat histologique négatif, il faut attendre le résultat bactériologique pour rendre un résultat sur le statut de l'animal, ce qui entraîne une suspension plus longue du cheptel. Toutefois, afin de ne pas perdre trop de temps, on procède à l'abattage diagnostique des autres animaux non-négatifs en IDC. Si aucune lésion n'est mise en évidence (sur tous les animaux réagissants), il est donc nécessaire d'attendre le résultat bactériologique. Si le résultat bactériologique est négatif, alors le cheptel est requalifié et l'APMS est levée.

La mise en évidence du bacille tuberculeux est la condition pour considérer l'animal comme infecté et par conséquent, pour déclarer le cheptel infecté (Cf. Tableaux I.2.1 et I.2.2) qui est alors placé sous Arrêté préfectoral de déclaration d'infection (APDI). Cela implique notamment l'isolement et la séquestration de tous les animaux (contaminés) du cheptel, bovins et autres espèces sensibles à la Tb (aucune entrée, ni sortie), jusqu'à l'abattage de tous les bovins. En effet, afin d'éviter le risque de persistance et de diffusion (résurgence) de la Tb dans des cheptels ayant fait l'objet d'abattage diagnostique, le recours aux mesures d'abattage total a été rendu obligatoire, par l'arrêté ministériel du 4 mai 1999, dans des cheptels dont l'infection a été confirmée. De plus, cette nécessité est renforcée par l'allègement des rythmes de tuberculination (AM 4 mai 1999 et NS 20 janvier 2000). Une enquête épidémiologique est ensuite menée afin de déterminer les causes possibles de contamination et les risques de contamination d'autres cheptels.

Le troupeau abattu est indemnisé sur la base d'une expertise. Cette expertise est réalisée par deux experts indépendants. Elle permet d'estimer la valeur marchande objective de chaque animal, à laquelle sont ajoutés des frais de renouvellement (frais d'introduction, pertes liées au vide sanitaire, ...). L'expertise permet donc d'aboutir à une indemnisation correspondant à la valeur de remplacement du cheptel abattu (selon AM 30 mars 2001). La reconstitution du cheptel n'est possible qu'après désinfection et vide sanitaire de 2 mois (GDS 24).

En l'absence de lésion suspecte de Tb à l'abattoir, on procède à l'abattage diagnostique des autres animaux non-négatifs en IDC du cheptel. Si tous animaux réagissants ne présentent aucune lésion, alors le cheptel est requalifié et l'APMS est levée.

Or, la probabilité de ne pas être amené à constater des lésions suspectes de Tb à l'abattage diagnostique, en raison d'un très faible risque de Tb, est très élevée : dans ces conditions, ce type de décision n'apporte pas l'information susceptible de permettre de conclure après une première IDC douteuse et conduit à attendre encore six semaines pour pouvoir réaliser une autre IDC afin de pouvoir, dans le cas de résultat favorable, restituer la qualification à l'élevage suspect.

Par ailleurs, outre le manque de spécificité de l'IDS et de sensibilité de l'IDC, l'interprétation des résultats des IDT est subjective puisqu'elle dépend la lecture du résultat par le vétérinaire sanitaire. La longue période de déqualification due au délai d'attente entre les deux IDT est très pénalisante pour l'éleveur d'un point de vue commercial et financier.

Elle peut même conduire à une sous-déclaration des résultats non-négatifs de l'IDS et ainsi nuire à l'assainissement des troupeaux infectés et par conséquent, participer à la propagation de la maladie.

Il serait donc nécessaire d'utiliser en complément des méthodes actuelles, un autre test présentant de bonnes qualités intrinsèques et, qui soit objectif – comme les tests *in vitro*, de laboratoire –.

En effet, l'épreuve de tuberculination est le test de diagnostic *ante mortem*, prescrit par l'OIE (selon le code sanitaire pour les animaux terrestres) et exigé par la réglementation française. Cependant, une autre épreuve (dite de substitution pour l'OIE) est également autorisée en France, un test *in vitro*, également basé sur la réponse immunitaire à médiation cellulaire, le test de dosage d'interféron gamma (OIE, 2010b).

I.3.2. Procédure de dépistage et diagnostic *post mortem* de la Tb

En France, les procédés réglementaires de dépistage et diagnostic *post mortem* d'animaux tuberculeux sont décrits dans l'arrêté ministériel du 15 septembre 2003 modifié*.

Le dépistage *post mortem* d'animaux tuberculeux est fondé sur l'observation de lésions suspectes de Tb à l'abattoir ou après autopsie (AM 15 septembre 2003 modifié*). Ce système de dépistage est relativement tardif (petites lésions souvent non détectées) mais il a l'avantage

d'être continu, de venir ainsi compléter opportunément la surveillance par tuberculination qui n'est que ponctuelle et périodique (Bénet J.J., 2008).

Suite à la découverte de lésions suspectes de Tb, des prélèvements de tissus lésés sont réalisés afin de confirmer et d'infirmer la suspicion de Tb par des tests de diagnostic (histopathologie et bactériologie) mis en œuvre par un des laboratoires agréés par le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche (AM 19 octobre 1999). En effet, les échantillons collectés, accompagnés des commémoratifs appropriés dûment complétés (la fiche de compte-rendu d'inspection et de prélèvement et, le bordereau unique de transmission (BUT) muni du visa du service d'inspection de l'abattoir) sont transmis dans les plus brefs délais au laboratoire de la région concerné, agréé pour la culture de la Tb (NS 22 novembre 2000b).

Dans le cas de la Dordogne, le LDAR24 est chargé de la préparation d'échantillon formolé et de son envoi au laboratoire agréé pour la recherche de Tb par des examens histologiques.

En France, les deux laboratoires agréés pour l'histologie de la Tb sont le Laboratoire Départemental d'Analyses des Côtes d'Armor (LDA22) et le Laboratoire d'Anatomopathologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon et l'Afssa de Lyon (Labo ENV/Afssa-Lyon). Ce dernier est également le Laboratoire de Référence en matière d'histologie (NS 22 novembre 2000a).

Le Laboratoire national de référence de la tuberculose bovine (Lerpaz de l'Afssa d'Alfort) assure la suite de l'examen bactériologique, c'est-à-dire l'identification des mycobactéries à partir de souche en culture pure, découverte par un Laboratoire vétérinaire agréé pour la culture (Figure I.2.1). En effet, ce dernier expédie à l'Afssa, par transporteur certifié pour le portage de marchandises dangereuses, le tube de culture (à raison d'un tube par animal) dès l'apparition de colonies suspectes sur le milieu. Une copie du BUT correspondant à l'échantillon (tube) joint est également glissée dans le colis.

Après identification de l'agent pathogène, l'Afssa communique le résultat (par exemples, *M. bovis* ou *M. avium spp.* ou mycobactérie atypique (mycobactéries n'appartenant ni à MAC, ni à MTBC), ou non mycobactérie,...), au Laboratoire ayant transmis le tube et ce dernier est alors en droit de rendre le résultat bactériologique (Figure I.2.1).

Cependant, l'isolement d'une mycobactérie atypique ne permet pas d'exclure une infection par *M. bovis* (infection mixte) (Bénet J.J., 2008). Par conséquent, il est nécessaire d'attendre

la fin des trois mois de culture pour conclure le cas échéant à un résultat bactériologique négatif, en l'absence de colonie suspecte sur les autres tubes. Sinon, le Laboratoire vétérinaire doit transmettre un autre tube à l' Afssa en vue d'une nouvelle identification.

Protocole de recherche d'animaux tuberculeux à partir du dépistage par inspection post mortem et ses limites (Cf. Figure I.2.3)

Dans le cas d'une suspicion de Tb à l'abattoir sur un bovin, sans indication préalable de Tb, des examens histologique et bactériologique sont entrepris (animal suspect, cf. Tableau I.2.1) et le cheptel est déqualifié (cheptel suspect, cf. Tableau I.2.2) et placé sous APMS. Le résultat histologique seul, quoique rendu rapidement (connu sous moins de quinze jours), n'est pas suffisant pour rendre un diagnostic définitif, en raison de son manque de spécificité.

Il est donc nécessaire d'attendre le résultat bactériologique, c'est-à-dire plusieurs semaines (généralement 2,5 mois). En effet, dans le cas d'un résultat bactériologique positif, il faut compter 4-8 semaines pour la croissance de *M. bovis* en primo-culture et 4-6 semaines pour son identification. A l'inverse, c'est-à-dire pour un résultat bactériologique négatif, 12 semaines sont nécessaires pour conclure de l'absence de croissance mycobactérienne et rendre un résultat négatif.

Si le bacille tuberculeux est identifié (résultat bactériologique positif), le cheptel est déclaré infecté (placement sous APDI) et son abattage total est réalisé sous une trentaine de jours. Une enquête épidémiologique est également menée afin de déterminer les causes possibles de contamination et les risques de contamination à l'intérieur de l'exploitation (autres espèces sensibles et l'exploitant) et à l'extérieur (d'autres cheptels bovins,...).

A contrario, dans le cas d'un résultat bactériologique négatif, des IDC sont pratiquées sur les animaux du cheptel et l'APMS est levée. Si les résultats des IDC sont tous négatifs, alors le cheptel est requalifié. Sinon, un abattage diagnostique de tous les animaux réagissants est réalisé. Si tous les animaux abattus ne présentent aucune lésion, alors le cheptel est requalifié et l'APMS est levée (sinon, le schéma décisionnel est identique à celui du dépistage *ante mortem*, cf. I.3.1. *Protocole de recherche d'animaux tuberculeux à partir du dépistage par IDT*). Cependant, son état sanitaire doit être régulièrement contrôlé notamment lors de campagne prophylactique.

Outre le résultat obtenu au final, l'examen bactériologique engendre donc une longue période de suspension de qualification sanitaire des cheptels concernés, qui s'avère néfaste d'un point de vue socio-économique pour l'éleveur.

En effet, dans le cas de résultat négatif, le cheptel n'a pas « rapporté » durant la suspension de qualification et est donc « resté bloqué » inutilement au final (interdiction de vendre des animaux (sauf à l'abattoir), de lait crû pour une consommation directe ou de fromage frais).

Dans le cas d'une déclaration d'infection du cheptel à partir d'examen bactériologique, l'entretien du cheptel (nourriture, traite (en dépit de la vente interdite du lait), ...) pendant cette longue période de déqualification, engendre des dépenses financières non rentabilisées par la suite (abattage total). Par ailleurs, en dépit du blocage des échanges avec l'extérieur, le risque de contamination de l'exploitant est accru par cette durée.

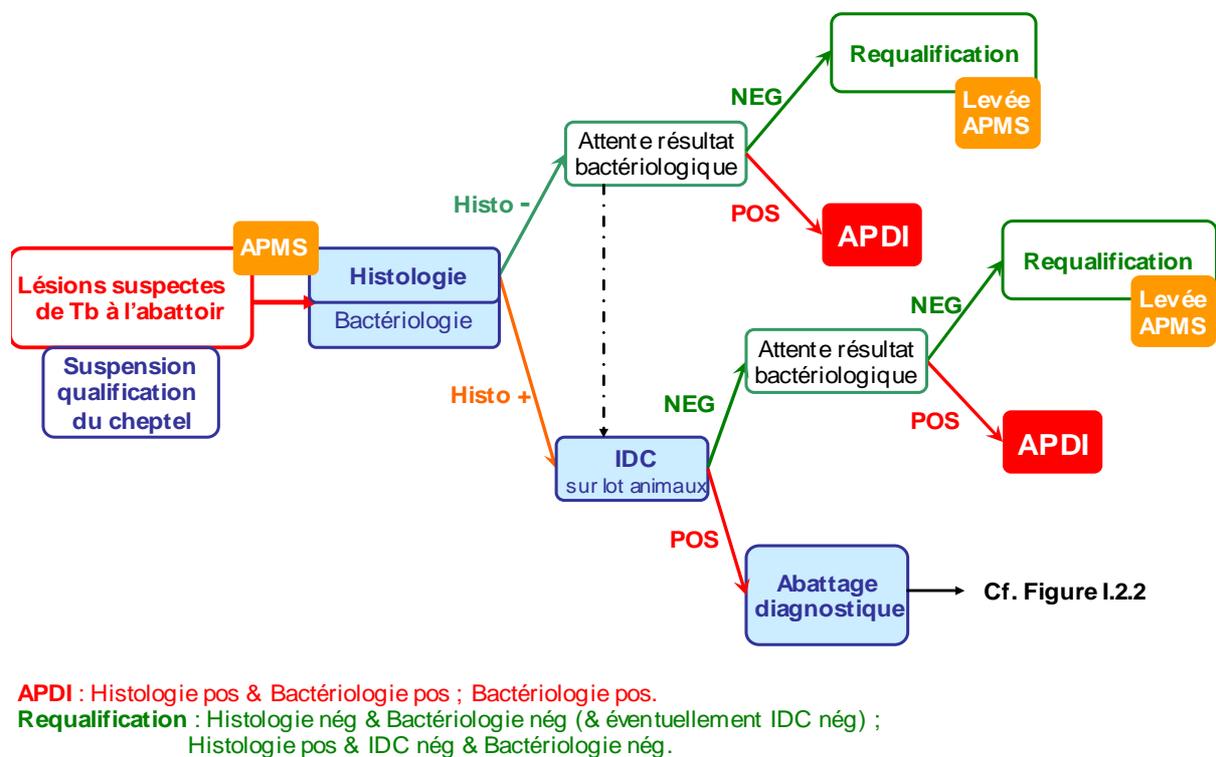


Figure I.2.3. Séquence diagnostique à partir du dépistage *post mortem* de la Tb selon l'AM du 15/09/03 modifié*.

Par conséquent, il serait nécessaire de disposer, en complément de ces techniques officielles, d'un test plus rapide que la bactériologie, plus spécifique que l'histologie et présentant une sensibilité satisfaisante, pour améliorer le diagnostic c'est-à-dire pour limiter l'apparition de faux positifs et réduire les pertes économiques inutiles dues aux suspensions de qualification.

II. Situation épidémiologique de la Tb en France jusqu'en 2007 et Stratégies nouvelles pour renforcer la lutte ?

La Tb a été identifiée dans la plupart des pays du monde (OIE, 2008a). Cependant, la maladie est actuellement la plus répandue dans la majeure partie de l'Afrique, certaines régions d'Asie et du continent américain (Site web [5]).

La qualification d'officiellement indemne au regard de la Tb d'un pays repose sur le fait de présenter un pourcentage annuel de troupeaux confirmés infectés (prévalence annuelle nationale), inférieur à 0,1 % de tous les troupeaux détenus dans le pays au cours des six années précédentes (Badin de Montjoye T., Thorel M.F. et Garin-Bastuji B., 2004 ; OIE, 2010c).

Actuellement (2008), seuls 13 pays d'Europe, la France comprise, ont le statut de pays officiellement indemne (Allemagne, Autriche, Belgique, Danemark, Finlande, France, Luxembourg, Norvège, Pays-Bas, République Tchèque, Slovaquie, Suède et Suisse), (EFSA & ECDC, 2010). En effet, la situation nationale actuelle de faible prévalence de Tb permet à la France de disposer d'un statut officiellement indemne à l'égard de la maladie. Toutefois cette condition favorable n'a été atteinte qu'en 2001.

II.1. La situation au niveau national

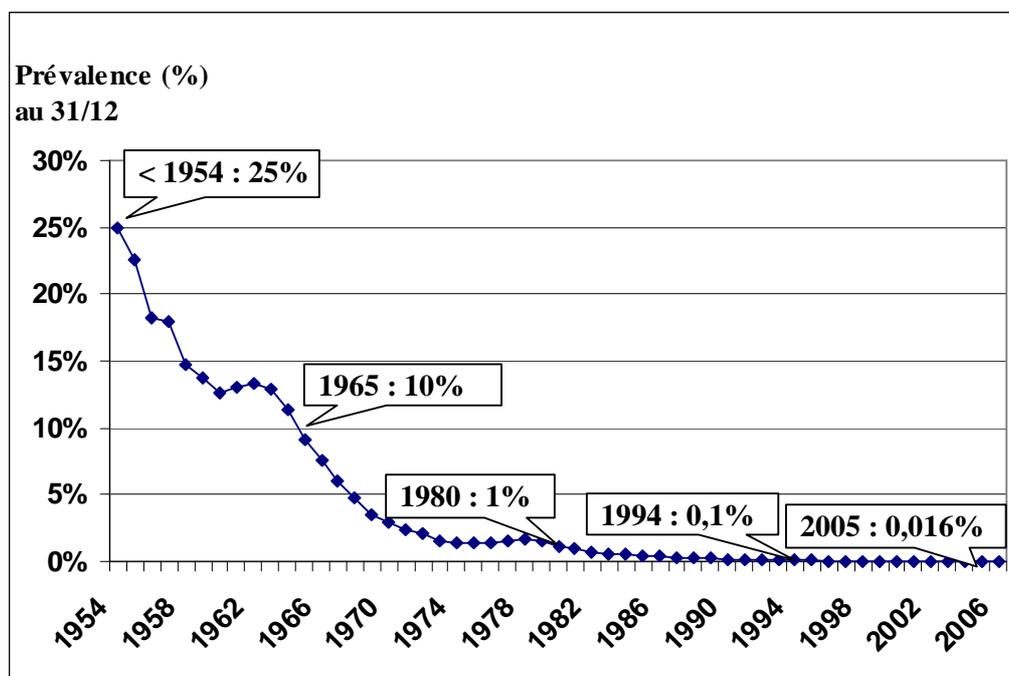


Figure I.2.4. Evolution du taux de prévalence des élevages infectés de tuberculose bovine (pourcentage au 31/12 ; France, 1955-2006) (d'après Bénet J.J., 2008).

II.1.1. 1955-2000 : Diminution historique de la Tb pour atteindre le statut indemne

Dans les années 50, la Tb était considérée comme l'un des fléaux majeurs des élevages bovins français et constituée aussi un danger élevé pour la santé publique. En effet, le pourcentage d'élevages bovins français infectés était estimé à environ 25 % (Figure I.2.4) et les pertes dues à la Tb représentaient 3 % des productions animales (Bénet J.J. *et al.*, 2006).

Face à cette situation alarmante, un plan de lutte collective contre la Tb, dirigé et subventionné par l'Etat, a été mis en place à partir de 1954 (1ères prophylaxies collectives volontaires) puis formalisé par les textes fondateurs de 1963 des grandes prophylaxies (rendues obligatoires).

Comme nous l'avons précédemment décrite, cette lutte était initialement axée sur des mesures offensives : dépistage des élevages infectés et leur assainissement par abattage sélectif, des bovins réagissants. La protection des élevages indemnes reposait seulement les contrôles à l'introduction.

D'après l'étude analytique de Bénet J.J. et ses collaborateurs réalisée en 2006, portant sur l'évolution de la Tb entre 1954 et 2004, le taux de cheptels infectés a évolué selon la cinétique d'une exponentielle décroissante durant cette période. En effet, pour les années 1965, 1980 et en 1994, les prévalences instantanées étaient respectivement estimées à 10 %, 1 % et moins de 0,1 % (Figure I.2.4) ; Après 29 ans de lutte, elles ont donc été divisées par 100. La conception initiale du plan de lutte a donc permis d'améliorer considérablement la situation épidémiologique de l'élevage français au regard de la Tb.

Toutefois, le ralentissement dans la décroissance du nombre annuelle de nouveaux foyers (inflexion de la pente (Figure I.2.4) : taux d'incidence annuelle en 1992 de 0,161 %, 1994 de 0,085 %, 1996 de 0,073 %, 1998 de 0,043 %, 2000 de 0,034 % (Badin de Montjoye T., Thorel M.F. et Garin-Bastuji B., 2004) correspondait aux limites de cette conception. En effet, les opérations de dépistage systématique perdaient alors de leur intérêt puisque très peu d'animaux étaient détectés positifs.

Le concept du plan de la lutte a donc été progressivement adapté au contexte épidémiologique (à partir de 1990). En effet, le dispositif a alors reposé en priorité sur la protection des cheptels indemnes grâce à une meilleure maîtrise des facteurs de risque (prise en compte et gestion des risques de contamination par voisinage avec une exploitation infectée, renforcement des contrôles à l'introduction et, assainissement par abattage total et désinfection appropriée pour éviter la résurgence d'une infection ancienne).

Ce dispositif est désormais du fait de la faible prévalence, basé sur la surveillance des élevages à risque et, sur un système de dépistage d'élevages infectés essentiellement en abattoir et à partir d'enquêtes épidémiologiques engagées pour rechercher l'origine de la contamination d'un cheptel déclaré infecté (basées sur l'étude des facteurs de risque et l'épidémiologie moléculaire).

En effet, afin de mieux comprendre l'épidémiologie de l'infection de Tb en France, le spoligotypage des souches isolées de *M. bovis* est quasi-systématiquement réalisé depuis 1998 (création d'une banque de données) (Durand B. *et al.*, 2004). Néanmoins, tous les isolats de *M. bovis* qui ont été reçus ou obtenus, par le laboratoire de référence (Afssa), à partir de prélèvements entre janvier 1979 et août 2000 et qui ont pu être revivifiés, ont été analysés par spoligotypage (Haddad N. *et al.*, 2001 et 2004a). La carte des spoligotypes présents en France, associée aux données épidémiologiques fournies par les investigations de terrain, permet ainsi de décrire et d'analyser les phénomènes épidémiologiques. Bien que la diversité des spoligotypes de *M. bovis* soit très grande en Europe (Rodríguez S. *et al.*, 2010 ; Humblet M.F. *et al.*, 2010), trois spoligotypes de *M. bovis* sont fréquemment retrouvés en France : BCG-like (SB0120, nouvelle nomenclature), GB54 (SB0121) et GB35 (SB0134) (Haddad N. *et al.*, 2001 et 2004a ; Durand B. *et al.*, 2004).

En conclusion, cette évolution très favorable de la prévalence nationale annuelle de Tb a permis à la France d'atteindre le stade d'Etat officiellement indemne au regard de la maladie, le 27 décembre 2000 conformément aux dispositions de la directive 64/432/CEE.

Etant donné son statut, les animaux de l'espèce bovine de cheptels français, destinés aux échanges intracommunautaires, sont donc dispensés des tests de dépistage de Tb, prévus dans la directive 64/432/CEE. Par ailleurs, le réseau français de surveillance des exploitations bovines est reconnu par la décision 2004/315/CEE (NS 16 juin 2009).

II.1.2. 2001-2006 : la situation reste inquiétante

Même si la France a obtenu le statut indemne de Tb, cela ne signifie pas pour autant qu'il n'existe plus de cas sur le territoire français, ni que tous les départements sont en dessous du seuil officiel.

En effet, en 2001, 74 nouveaux foyers ont été confirmés soit le taux d'incidence était alors de 0,025 % (Tableau I.2.3.). Puis, l'incidence de la maladie a continué à baisser pour atteindre un taux de 0,015 % en 2004 (Tableau I.2.3.).

Tableau I.2.3. Evolution du nombre de foyers, des taux d'incidence et de prévalence de la Tb en France de 2001 à 2006 (NI 17 mars 2008 ; Badin de Montjoye T., Thorel M.F. et Garin-Bastuji B., 2004).

	Année					
	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Nombre de nouveaux foyers de Tb	74	53	55	42	64	83
Taux d'incidence	0,025 %	0,019 %	0,023 %	0,015 %	0,024 %	0,032 %
Taux de prévalence	?	?	0,032 %	0,022 %	0,033 %	0,040 %

NB : ?/ Pas de données.

A l'inverse, entre 2004 et 2006, il s'est produit une hausse remarquable du nombre de nouveaux foyers de Tb (le nombre de foyer annuel a pratiquement doublé en 2006 par rapport à 2004). En effet, en 2005 et 2006, le nombre de nouveaux foyers recensés était respectivement de 64 et 83. Par ailleurs, la majorité des circonstances de mise en évidence des foyers était en abattoir (un peu plus de 80 % en 2004, de 60 % en 2005 et de 50 % en 2006). Ceci est principalement dû au fait que l'inspection à l'abattoir est dans certains départements le seul moyen de dépister les foyers (Note d'information (NI) du 17 mars 2008).

Néanmoins, des disparités importantes existent entre les départements. Ainsi, la Tb est un problème majeur dans certains départements comme la Dordogne (24), la Côte d'Or (21), les Pyrénées-Atlantiques (64), ainsi que les départements de la Camargue (13, 30 et 34, avec une problématique particulière liée à une race d'intérêt local (*manades et ganaderias*)) ainsi que les départements où se situe la forêt Brotonne (26 et 27, avec une problématique liée à la présence de Tb dans la faune sauvage). Au contraire, la situation est stable et favorable dans les autres départements (NI 17 mars 2008).

Cependant, ces hausses épidémiques doivent être prises en compte et surveillées de près, afin de conserver le statut indemne de la France. En effet, l'éventuelle perte du statut français pourrait avoir de lourdes conséquences dans une filière déjà en difficulté.

II.2. La situation dans le département de la Dordogne et la stratégie adoptée

II.2.1. La situation en Dordogne

Jusqu'en 2003, la Dordogne a suivi la tendance nationale, c'est-à-dire qu'elle a vu sa prévalence annuelle diminuer progressivement depuis 1955 avec néanmoins, une prévalence toujours proche voire supérieure à la moyenne nationale.

A *contrario*, à partir de 2004, la Dordogne a connue une forte croissance du nombre de foyers de Tb (plus de 50 foyers entre 2004 et 2006). En effet, les autorités ont comptabilisé 3 foyers en 2004 (soit 0,07 %), 13 foyers en 2005 (soit 0,3 %) puis, 29 foyers en 2006 (soit 0,6 %). Durant ces dernières années, la Dordogne a même été considérée comme le département le plus infecté de France (Cf. Tableau I.2.4).

Tableau I.2.4. Données chiffrées de l'évolution de Tb en Dordogne de 2002 à 2006 (document DDSV de Dordogne (DDSV24)).

	2002	2003	2004	2005	2006
Nombre de cheptels suspendus	12	29	14	60	87
Nombre de cheptels infectés	4	3	9	13	29
Nombre de cheptels abattus	4	3	9	12	29
Nombre de bovins abattus	535	540	509	1322	2506
Nombre de bovins à lésions	18	28	59	56	140
Taux d'infection apparent	3,3 %	5,2 %	11,6 %	4,2 %	5,6 %
Nombre de cheptels dépistés :					
- en prophylaxie	0	0	3	3	12
- par liens épidémiologiques	1	0	0	4	8
- en abattoirs	3	3	6	6	8
- par rédhibitions	0	0	0	0	1
Montant de l'indemnisation (€)	744 385	613 250	627 879	1 727 069	2 517 717

Si l'on étudie la situation entre 2002 et 2005, on note un taux anormalement bas de déclaration des IDS non-négatives, se traduisant par une quasi-absence de dépistage des foyers par IDS (en prophylaxie) et au contraire, un dépistage principalement à l'inspection à l'abattoir (proportions de foyers découverts à l'abattoir : 3/4 en 2002, 3/3 en 2003, 6/9 en 2004 et 6/13 en 2005, cf. Tableau I.2.4).

L'une des causes de cette situation est l'allègement du rythme des prophylaxies qui s'est opéré depuis 2000. Une autre raison est l'importance des sous-déclarations lors des prophylaxies. Une pratique des tuberculinations au pli sous-caudal (méthode interdite en France car moins sensible qu'à l'encolure, Monaghan M.L. *et al.*, 1994) au lieu de l'encolure peut aussi expliquer cette baisse de déclaration des IDS non-négatives. En outre, une majorité de cas (plus de 90 %) s'explique par le voisinage ou l'introduction d'animaux. Enfin, l'épidémiologie moléculaire est peu de recours, car toutes les souches concernées par les foyers sont du même spoligotype BCG-like avec un profil VNTR également unique et qui est

d'ailleurs très fréquent dans le bassin du Limousin (Com. pers. Boschioli M.L., 2010). Le risque de résurgence est assez rare.

Cette évolution de la Tb en Dordogne a des répercussions inquiétantes d'un point de vue sanitaire mais également financier et commercial dépassant les seuls élevages abattus (vendeurs de reproducteur touchés par l'image d'une « région infectée »).

Compte tenu de la perte induite par une sous valorisation bouchère à l'abattoir et de l'impossibilité de vendre certaines catégories d'animaux, le GDS24 intervient de manière forfaitaire (sur la base des sorties habituelles) à défaut d'une aide des pouvoirs publics (GDS24, 2005).

De plus, pour compenser la perte constatée lors de la vente des animaux dans ces conditions malgré l'indemnisation forfaitaire de l'Etat (229 € en 2005) et l'aide du Conseil Général de la Dordogne (60,68 €, en 2005) perçue en plus de la valorisation bouchère, le GDS24 intervient en prenant en charge 90 % de la perte résiduelle sur la base de sa valeur forfaitaire (GDS24, 2005).

Au regard de cette situation très alarmante, il était alors urgent d'intervenir pour trouver rapidement une solution efficace et acceptable par tous.

II.2.2. La stratégie adoptée

Face à cette recrudescence de Tb et une pression des organisations d'élevage locale (GDS de la Dordogne, GDS24), la DDSV24 a mis en œuvre, avec l'aide de l'ONCFS (Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage) et du LDAR24 (pour la réalisation respectivement des prélèvements et des analyses), une enquête Tb sur la faune sauvage (375 cerfs, chevreuils et sangliers) durant la saison de chasse 2005-2006. Cependant, les résultats ont montré que le problème de la Tb en Dordogne n'avait pas pour origine un réservoir sauvage.

De plus, une adaptation locale du rythme des prophylaxies dans les communes des cheptels infectés, sans arrêté préfectoral, mais avec une adhésion des éleveurs. Cette mobilisation sanitaire localisée a contribué à la découverte d'un si grand nombre de foyers en 2006 (29) dont la majorité des cas a été dépisté en prophylaxie (12/29).

Au vu de la situation, la DDSV24 a alors décidé de renforcer les mesures de recherche de la Tb à tous les élevages bovins de Dordogne de sorte à augmenter la sensibilité de détection du dispositif.

D'une part, un renforcement des mesures de prophylaxies a été appliqué pour tout le département pour la campagne 2006-2007, selon l'arrêté préfectoral du 19 décembre 2006 : généralisation du dépistage par IDS à l'ensemble des cheptels de Dordogne et sur tous les bovins de plus de 18 mois. De plus, la DDSV24 a souhaité re-sensibiliser les acteurs du terrain, notamment les éleveurs par l'intermédiaire du GDS et les vétérinaires sanitaires, à l'importance de la réalisation de l'IDS et de sa déclaration en cas de positivité, pour détecter les animaux infectés.

Néanmoins, de manière à limiter les suspensions excessives de qualification (dues aux nombreuses réactions faussement positives de l'IDS, liées à son manque de spécificité), la DDSV24 a souhaité disposer d'un outil complémentaire, suggéré par le LDAR24, lui permettant de faire le tri rapide entre les cheptels à IDS non-négative à maintenir sous surveillance et les cheptels à IDS non-négative pour lesquels une requalification semblait pouvoir être maintenue.

D'autre part, les abattoirs de la région ont été également re-sensibilisés au problème, en insistant sur l'importance de l'inspection *post mortem* dans la détection des lésions évocatrices de Tb (notamment dans le dépistage des foyers résiduels) et en leur rappelant les modalités d'inspection (sensibilisation avant la parution de la NS du 14 mai 2007 correspondante).

Cependant, l'apport d'un test complémentaire à la bactériologie et l'histologie serait d'une grande utilité, c'est-à-dire pour, ne serait ce dans un premier temps, conforter *a posteriori* les décisions prises (pour ne pas suspendre la qualification sanitaire du troupeau ou décider d'un abattage total ou requalifier à tort) par les autorités sanitaires et dans certains cas, de les faire accepter aux éleveurs non convaincus (incertains) par les résultats des examens pratiqués (IDC et histologie) ou bien, pour désapprouver les décisions prises et ainsi inciter à approfondir les recherches.

II.3. Nouveaux outils stratégiques utilisés en Dordogne pour renforcer la lutte

Deux tests supplémentaires présentant de bonnes valeurs de Se et Sp se sont avérés d'utilité urgente pour confirmer ou infirmer rapidement, les résultats non-négatifs en IDS :

la technique de dosage d'IFN γ pour le diagnostic de la Tb à partir d'échantillon sanguin et les suspicions d'abattoir et, la méthode PCR IS6110 en temps réel de LSI (notée PCR) en complément des techniques actuelles. Ces tests ont donc été utilisés à titre expérimental en vue de leur évaluation.

Concernant le test IFN γ , il figure dans la réglementation française mais ses modalités d'utilisation n'ont pas été définies en raison de l'absence de son évaluation en France. L'analyse de la littérature montre que le test est aussi sensible mais plus spécifique que l'IDS et que son utilisation après une IDS, comme le recommande la notice Bovigam[®], permet souvent d'augmenter sa sensibilité. De plus, l'inclusion d'ESAT6 et de CFP10 permet d'augmenter la spécificité du test IFN γ basé sur les PPD mais réduit légèrement sa sensibilité. Dans ces conditions, ce test modifié permet de réduire les faux positifs découverts en IDS tout en conservant un niveau acceptable de sensibilité diagnostique. Or, dans les pays à faible prévalence de Tb, comme la France, il est important de minimiser le taux de faux positifs, notamment pour que les éleveurs gardent confiance aux programmes de contrôle (réduire le risque de sous déclaration des IDS non-négatives,...).

Cependant, sur le terrain, les qualités intrinsèques (sensibilité et spécificité) du test IFN γ basé sur les PPD et, ESAT6 et CFP10 (noté test Bovigam[®] modifié ou test IFN γ modifié), ne sont pas suffisamment connues ainsi que les valeurs prédictives en situation de faible prévalence.

En effet, la qualité d'un test dépend des caractéristiques épidémiologiques locales (conditions dans lesquelles il est mis en œuvre). Ainsi, la sensibilité n'est pas la même selon que le cheptel a été récemment ou anciennement infecté. La spécificité dépend étroitement de la nature de l'agent responsable, des réactions croisées et de la proportion d'animaux infectés par cet agent, ce qui dépend de l'épidémiologie de cette infection et non uniquement du test lui-même. C'est seulement en disposant de ces informations que les données terrains peuvent être interprétées correctement. Par ailleurs, il faut aussi connaître les valeurs prédictives du test *conditionnellement* à l'IDS, de façon à mesurer la dépendance éventuelle entre ces tests. Au final, cela peut permettre également de mieux définir les critères et conditions d'emploi.

Il était donc nécessaire d'estimer, d'une part les valeurs des qualités intrinsèques du test IFN γ modifié selon les conditions de terrain de la Dordogne et d'autre part, les valeurs du paramètre de dépendance du test IFN γ modifié suivant le test réalisé en première intention.

Concernant la méthode *PCR*, il était indispensable d'évaluer la sensibilité et la spécificité analytiques du test *PCR IS6110* en temps réel. Cependant, cette approche analytique ne suffisait pas, il fallait impérativement disposer d'éléments de confirmation sur le terrain. En effet, l'évaluation de la sensibilité et la spécificité diagnostiques de la méthode *PCR* par comparaison avec les techniques officielles de diagnostic de la Tb (histologie et bactériologie) devait permettre de déterminer si l'utilisation de cette méthode en complément des tests officiels pouvait améliorer le diagnostic actuel de la Tb.

Ainsi, l'objectif de ce travail était d'estimer, selon les conditions terrain de la Dordogne et en vue d'une validation de leur utilisation, d'une part la sensibilité conditionnelle à l'IDS non-négative du test $IFN\gamma$ modifié (basé sur les PPD et, ESAT6 et CFP10) et ses spécificités absolue et opérationnelle (animaux avec des lésions mais cheptels indemnes) et d'autre part, les sensibilité et spécificité diagnostiques du test *PCR* utilisé en complément des tests officiels ainsi que sa limite de détection et ses sensibilité et spécificité analytiques.

Le but final de ce travail est d'évaluer si l'utilisation des tests $IFN\gamma$ modifié et *PCR* conduit à une amélioration du programme de contrôle de la Tb. En concertation avec la DGAI, les conditions d'inclusion de ces tests dans le cadre réglementaire de la lutte contre cette maladie pourraient alors être envisagées.

PARTIE II :
TRAVAIL EXPERIMENTAL

Chapitre 1 :

Un test IFN γ Bovigam[®] modifié

pour renforcer la lutte contre la Tuberculose bovine

Introduction : Mise en place stratégique d'un test IFN γ Bovigam[®] modifié en Dordogne

Le test de dosage d'IFN γ Bovigam[®] a été autorisé à titre expérimental en Dordogne, d'une part pour une utilisation en série après l'IDS (Ryan T.J *et al.*, 2000), c'est-à-dire pour confirmer ou infirmer rapidement les résultats non-négatifs en IDS et ainsi, favoriser les déclarations de réactions non-négatives en IDS et, d'autre part pour un emploi en parallèle à l'IDS lors d'enquêtes épidémiologiques.

Toutefois, plusieurs modifications du protocole original du kit commercial Bovigam[®] ont été nécessaires afin d'adapter le test à un contexte de faible prévalence de Tb.

Matériel et Méthodes :

I. Présentation de l'adaptation du test Bovigam[®] à un contexte de faible prévalence de Tb

Le test Bovigam[®] est basé seulement sur des PPDs, c'est-à-dire sur la comparaison des réponses aux antigènes PPDB et PPDA et la comparaison des réponses aux PPDB et PBS (noté N). Néanmoins, cette seconde comparaison ($DO_{PPDB}-DO_N$) n'a jamais été utilisée (comme publiée par Vordermeier H.M. et Ewer K. (2006a), Coad M. *et al.* (2008)) car, d'une part, selon Ryan T.J. *et al.* (2000), les valeurs de sensibilité et de spécificité sont inchangées sans tenir compte de ce critère et d'autre part, une valeur-seuil de validité de la qualité d'un échantillon sanguin stimulé par du PBS a été incluse : $DO_N < 0,3$ (critère utilisé par Coad *et al.*, 2008) (Cf. § II.2.2., page 125 et Annexe X). Le critère $DO_{PPDB}-DO_N > 0,1$ a été toutefois vérifié pour les différentes études relatives à l'utilisation du test en Dordogne (Cf. § IV., page 132) et nous avons obtenu les mêmes résultats qu'en l'absence de ce critère (résultats non présentés dans ce manuscrit).

Afin d'améliorer la spécificité du test Bovigam[®] en particulier dans les populations d'IDS non-négatives et de minimiser ainsi le taux de faux positifs, les antigènes spécifiques ESAT6 et CFP10 (protéines recombinantes) ont été ajoutés initialement séparément (campagne de dépistage de la Tb 2006-2007), puis, en mélange (campagnes de prophylaxie suivantes).

Le calcul permettant de déterminer le résultat d'un échantillon analysé seulement avec ces protéines recombinantes (notées R) a donc été défini. De même, un procédé d'interprétation

des résultats individuels (positif ou négatif) d'un échantillon analysé à la fois avec des PPD et des R, a alors été défini afin d'obtenir un résultat final (positif, négatif ou divergent) pour ce test Bovigam[®] modifié.

De plus, un mitogène, le PWM, a été intégré à partir de la campagne de prophylaxie 2007-2008, comme témoin positif de la stimulation cellulaire afin de tester l'immunocompétence des LT de l'échantillon sanguin.

De même, comme l'impose le guide AFNOR ELISA NF U 47-019 (AFNOR, 2007), un plasma de référence ou traceur (externe au kit) a été ajouté comme contrôle supplémentaire de l'ELISA. Il s'agit d'un mélange de plasmas de bovins ayant fourni des résultats fortement positifs au test IFN γ , dilué de manière à obtenir des résultats en unité DO assez faibles et suffisamment constants ($DO_{\text{Traceur}} - DO_{\text{TN}}$ de 0,5, situé dans la zone de linéarité du graphique représentant la valeur de DO en fonction de la concentration en IFN γ (graphique présenté en Annexe XI (Figure A)) pour permettre de vérifier la reproductibilité des séries d'analyses réalisées par le laboratoire et entre les laboratoires utilisant ce même traceur (Cf. Figure II.1.2, page 127).

Enfin, la stimulation cellulaire a été effectuée en micro-méthode à partir de 2008 en raison de l'augmentation du volume total de sang requis pour l'analyse de l'échantillon, augmentation résultant de l'ajout du PWM et des protéines recombinantes et de la réalisation de l'analyse des échantillons en double. Ainsi, les volumes de la stimulation cellulaire (sang et Ag (ou PBS ou PWM)) par puits ont été réduits tout en conservant les mêmes concentrations puisque selon Schiller I. et ses collaborateurs (2009), les résultats obtenus avec les deux méthodes (méthode décrite dans la notice Bovigam[®] et micro-méthode) sont similaires.

II. Description du test IFN γ modifié : protocole d'analyse et méthode d'interprétation des résultats

II.1. Protocole d'analyse du test IFN γ modifié

II.1.1. Etape 1 : la stimulation cellulaire

II.1.1.1. Macro-méthode

La stimulation cellulaire est réalisée dans des plaques de 24 puits (de 2 ml).

Chaque partie aliquote de sang (1500 μ l) est stimulée avec :

- i. 100 μ l de PBS, le témoin négatif, (puits A1),
- ii. 100 μ l de PPDB de Csl (Prionics) (concentration finale 20 μ g/ml), (puits A2),
- iii. 100 μ l de PPDA de Csl (concentration finale 20 μ g/ml), (puits A3),
- iv. 100 μ l d'ESAT6 de Staten Serum Institut (SSI) (concentration finale 3 μ g/ml), (puits A4),
- v. 100 μ l de CFP10 de SSI (concentration finale 3 μ g/ml), (puits A5) et
- vi. 100 μ l de PWM de Sigma, le témoin positif à 5 μ g/ml de sang (puits A6), (Cf. Plan de plaque, Figure II.1.1).

Ainsi, l'analyse d'un échantillon requiert 6 puits d'une plaque.

Quatre échantillons maximum peuvent donc être répartis sur une plaque de 24 puits, selon le plan de distribution représenté par la figure II.1.1.

	1	2	3	4	5	6
A	<i>PBS&Ech1</i>	<i>PPDB&Ech1</i>	<i>PPDA&Ech1</i>	<i>ESAT6&Ech1</i>	<i>CFP10&Ech1</i>	<i>PWM&Ech1</i>
B	<i>PBS&Ech2</i>	<i>PPDB&Ech2</i>	<i>PPDA&Ech2</i>	<i>ESAT6&Ech2</i>	<i>CFP10&Ech2</i>	<i>PWM&Ech2</i>
C	<i>PBS&Ech3</i>	<i>PPDB&Ech3</i>	<i>PPDA&Ech3</i>	<i>ESAT6&Ech3</i>	<i>CFP10&Ech3</i>	<i>PWM&Ech3</i>
D	<i>PBS&Ech4</i>	<i>PPDB&Ech4</i>	<i>PPDA&Ech4</i>	<i>ESAT6&Ech4</i>	<i>CFP10&Ech4</i>	<i>PWM&Ech4</i>

Figure II.1.1. Exemple de plan de distribution, en plaque de 24 puits, à suivre pour le dépôt de 4 échantillons (Ech 1 à 4) pour l'étape de stimulation cellulaire.

Ensuite, les mélanges réactionnels sont homogénéisés par agitation de la plaque pendant 1 min.

Puis, la plaque contenant les échantillons est mise en incubation à 37°C en atmosphère humide, pendant 16 à 24 h.

A la fin de l'incubation, la plaque est centrifugée à 500 g pendant environ 10 min à température ambiante et les plasmas surnageants (soit environ 500 μ l) sont recueillis et déposés sur une autre plaque (plaque de transfert) en vue du dosage d'IFN γ .

II.1.1.2. Micro-méthode

La stimulation cellulaire est réalisée dans des plaques de 96 puits (de 300 μ l).

Chaque partie aliquote de 250 μ l de sang (Coad M. *et al.*, 2007 ; Schiller I. *et al.*, 2009), est stimulé avec :

- i. 25 μ l de PBS (puits A1 et B1),
- ii. 25 μ l de PPDB de Csl (concentration finale 20 μ g/ml), (puits A2 et B2),
- iii. 25 μ l de PPDA de Csl (concentration finale 20 μ g/ml), (puits A3 et B3),
- iv. 25 μ l du mélange (ou mix) constitué des R (ESAT6 et CFP10 de SSI) (concentration finale 5 μ g/ml chacun) de sang, (puits A4 et B4) et
- v. 25 μ l de PWM de Sigma (concentration finale 5 μ g/ml), (puits A5 et B5).

Ainsi, comme chaque échantillon est analysé en double (Coad M. *et al.*, 2007), l'analyse d'un échantillon requiert 10 puits d'une plaque.

Ensuite, nous suivons le même protocole que celui exposé dans la macro-méthode (homogénéisation, incubation sous agitation et centrifugation de la plaque, puis transfert des plasmas surnageants sur une autre plaque). Toutefois, comme chaque échantillon de sang est analysé en double, deux plasmas surnageants par échantillon sont alors obtenus et mélangés dans la plaque de transfert.

II.1.2. Etape 2 : le dosage d'IFN γ par la méthode ELISA

Le dosage d'IFN γ par la méthode ELISA en « sandwich » est réalisé en double pour chaque échantillon de plasma contenu dans la plaque de transfert et en triple pour les témoins positif (TP) et négatif (TN) du kit ainsi que pour le contrôle positif interne (traceur utilisé depuis 2007-2008), selon le mode opératoire du kit Bovigam[®] (Cf. Annexe VII). Compte tenu de la similitude entre micro- et macro-méthodes, les résultats ont été regroupés en négligeant le biais éventuellement induit par ce regroupement. Concernant les R (ESAT6 et CFP10) testés séparément, comme tous les résultats positifs étaient positifs pour les deux Ag et tous les résultats négatifs étaient négatifs pour les deux Ag, alors les résultats des R testés individuellement et en mélange ont été regroupés.

II.2. Interprétation des résultats d'une analyse IFN γ modifiée

II.2.1. Critères de validation de l'analyse ELISA par les témoins

Avant de procéder à l'interprétation des résultats des échantillons, il est nécessaire de valider l'analyse à partir des résultats des témoins TP et TN, de l'ELISA. Les valeurs de DO

(moyenne des DO des *triplicates*) obtenues pour ces témoins par plaque d'analyse, doivent répondre aux critères suivants : $DO_{TN} < 0,130$ et $dTN < 0,04$ et, $DO_{TP} > 0,700$ et $CV_{TP} < 30 \%$ (Notice Bovigam[®]).

II.2.2. Critères de validation de la qualité de chaque échantillon

Après la validation de l'analyse ELISA par ses témoins, il est nécessaire de contrôler la qualité des échantillons analysés.

Il s'agit de vérifier les résultats de chaque échantillon stimulé avec les témoins négatif, PBS (N) et positif, PWM. Les valeurs de DO (moyenne des DO des *duplicates*) obtenues pour ces témoins pour chaque échantillon, doivent répondre aux critères suivants : $DO_N < 0,3$ (utilisé par Coad *et al.*, 2008) et $DO_{PWM} - DO_N > 0,4$ – Ces seuils ont été déterminés à partir des distributions des valeurs de $DO_{PWM} - DO_N$ et DO_N obtenues pour les échantillons de notre étude de spécificité absolue du test IFN γ et par comparaison avec les seuils décrits dans la littérature (Coad M. *et al.*, 2008 ; Schiller I. *et al.*, 2009) – (Cf. Annexe X).

Ainsi, la qualité de l'échantillon ne peut être validée si $DO_N \geq 0,3$ (résultat de l'échantillon testé « ininterprétable ») et/ou si $DO_{PWM} - DO_N \leq 0,4$ (résultat de l'échantillon analysé « inhibé »). Il est donc nécessaire de recommencer l'analyse à partir d'une nouvelle prise de sang.

A contrario, si la qualité de l'échantillon est validée ($DO_N < 0,3$ et $DO_{PWM} - DO_N > 0,4$), il est possible de procéder au calcul et à l'interprétation des résultats (individuels) obtenus en PPD et protéines recombinantes (R) et enfin à l'interprétation du résultat final du test.

Comme chaque échantillon est analysé en double, les moyennes des deux valeurs de DO de PPDB, PPDA, ESAT6 et CFP10 (en individuel ou mélange) sont également calculées pour chaque échantillon.

II.2.3. Méthodes d'interprétation des résultats d'un échantillon analysé avec la technique IFN γ modifiée

II.2.3.1. Interprétation des résultats individuels

Deux modes de calcul des résultats individuels ont été étudiés : un mode de calcul "initial" basé sur les recommandations du kit Bovigam[®] et sur la littérature et, un mode de calcul

“normalisé” établi selon les recommandations de la norme française ELISA, NF U 47-019 et également utilisé par Olsen I. *et al.* en 2005 (à partir du kit de Biosource[®]).

II.2.3.1.1. Mode de calcul “initial”

Les formules “initiales” pour calculer les résultats individuels d’un échantillon, c’est-à-dire les résultats en PPD (seulement la formule $DO_{PPDB}-DO_{PPDA}$ du kit Bovigam[®]) et en R (la formule DO_R-DO_N employée par Rhodes S.G. *et al.* (2000), Buddle B.M. *et al.* (2001, 2009), Cockle *et al.* (2006), Vordermeier H.M. *et al.* (2006a), Ewer K. (cité dans Coad M. *et al.*, 2008), Schiller I. *et al.* (2009)), sont décrites dans le Tableau II.1.1.

Ainsi, un échantillon est considéré comme positif en PPD si la valeur de DO obtenue à l’issue du calcul « $DO_{PPDB}-DO_{PPDA}$ » est supérieure à 0,10 (Ryan T.J. *et al.*, 2000 et Schiller I. *et al.*, 2009 : valeur supérieure ou égale à 0,10 et, Buddle B.M. *et al.*, 2001, Thom M.L. *et al.*, 2006, Vordermeier H.M. *et al.*, 2006ab, Ewer K. cité dans Coad M. *et al.*, 2008 : valeur supérieure à 0,10).

De même, l’échantillon est considéré comme positif en R si la valeur de DO obtenue à l’issue du calcul « DO_R-DO_N » est supérieure à 0,10 (Buddle B.M. *et al.*, 2001, Vordermeier H.M. *et al.*, 2006a, Ewer K. cité dans Coad M. *et al.*, 2008 : valeur supérieure à 0,10 et, Schiller I. *et al.*, 2009 : supérieure ou égale à 0,10).

Tableau II.1.1. Critères d’interprétation des résultats individuels des échantillons, obtenus avec les PPD et avec les R calculés selon le mode de calcul “initial”.

	Formules “initiales” pour calculer les résultats individuels	Interprétation des résultats individuels	
		Résultat > 0,10 unité DO	Résultat \leq 0,10 unité DO
PPD	$DO_{PPDB}-DO_{PPDA}$	Positif	Négatif
R	DO_R-DO_N	Positif	Négatif

II.2.3.1.2. Mode de calcul “normalisé”

Le mode de calcul “initial” des résultats individuels ne prend pas en compte les absorbances des témoins de l’ELISA (TP et TN), et donc les variations d’absorbance dues aux conditions l’analyse (températures, opérateurs, lots, matériels,... différents), comme le recommande la norme française ELISA, NF U 47-019, pour que les résultats soient plus reproductibles.

Il était donc nécessaire de définir un nouveau mode de calcul (“normalisé”) des résultats individuels des échantillons qui intègre les valeurs de DO obtenues pour les TP et TN par plaque d'analyse (utilisé par Olsen I. *et al.*, en 2005).

En effet, la figure II.1.2, présentant les résultats (en unité de DO) du traceur obtenus après 85 analyses et transformations des valeurs de DO brutes en suivant la formule de calcul “initiale” ($DO_{\text{Traceur}} - DO_{\text{TN}}$) et la formule de calcul “normalisée” ($(DO_{\text{Traceur}} - DO_{\text{TN}}) / (DO_{\text{TP}} - DO_{\text{TN}})$), montre que le coefficient de variation estimé à partir des résultats obtenus après normalisation est plus faible (CV_{Traceur} de 17,1 % avec le mode de calcul initial versus 12,3 % avec le mode de calcul normalisé). Les résultats calculés avec la formule normalisée sont donc plus reproductibles et comparables entre eux.

Par conséquent, cette figure II.1.2 permet de démontrer que si les valeurs des TP et TN ne sont pas intégrées dans l’expression du résultat d’un échantillon analysé lors de différentes épreuves (plusieurs plaques), cela entraîne des fluctuations entre les résultats obtenus pour différentes plaques d’analyse; le résultat d’un même échantillon peut donc être surestimé ou au contraire sous-estimé (par exemple, un échantillon peut être positif à une première analyse et négatif après).

La normalisation permet donc une meilleure reproductibilité des analyses et les résultats entre différents laboratoires sont ainsi comparables.

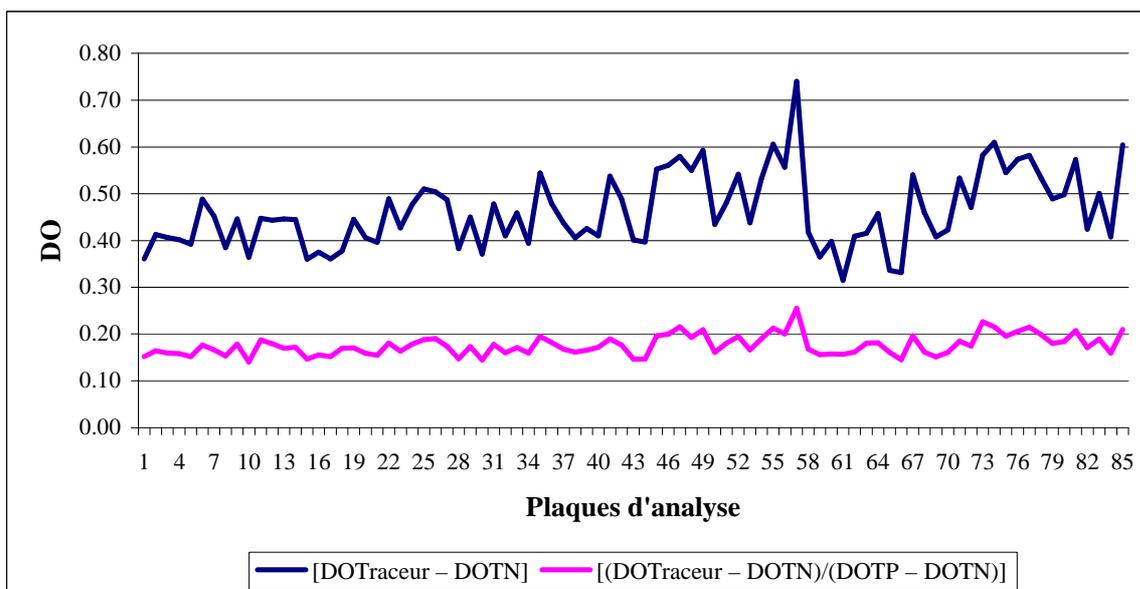


Figure II.1.2. Distributions des 85 valeurs de DO du traceur, transformées en suivant soit le mode de calcul initial soit le mode de calcul normalisé.

Ainsi, les formules “normalisées” sont les suivantes : pour les PPD « $(DO_{PPDB}-DO_{PPDA})/(DO_{TP}-DO_{TN})$ » et pour les R « $(DO_R-DO_N)/(DO_{TP}-DO_{TN})$ » (Tableau II.1.2).

De plus, le seuil de positivité pour chacune de ces formules a été également redéfini.

Le seuil de positivité de 0,10 du mode de calcul “initial” a ainsi été adapté au mode de calcul “normalisé” (Tableau II.1.2), c’est-à-dire à la formule incluant la médiane de $DO_{TP}-DO_{TN}$ à 2,4 : $(DO_{PPDB}-DO_{PPDA})/(DO_{TP}-DO_{TN})= 0,10/2,4= 0,04$ (Faye S. *et al.*, 2008 et sous presse).

Cette médiane de $DO_{TP}-DO_{TN}$ a été calculée à partir des valeurs de DO des TP et TN (pour chaque plaque d’analyse) obtenues lors de l’analyse des échantillons inclus dans nos études de spécificité absolue et sensibilité relative du test IFN γ).

Ainsi, un échantillon est considéré comme positif en PPD si la valeur de DO obtenue à l’issue du calcul “normalisé” « $(DO_{PPDB}-DO_{PPDA})/(DO_{TP}-DO_{TN})$ » est supérieure à 0,04. De même, un échantillon est considéré comme positif en R si la valeur de DO obtenue à l’issue du calcul “normalisé” « $(DO_R-DO_N)/(DO_{TP}-DO_{TN})$ » est supérieure à 0,04.

Tableau II.1.2. Critères d’interprétation des résultats individuels des échantillons, obtenus avec les PPD et avec les R calculés selon le mode de calcul “normalisé”.

	Formules “normalisées” pour calculer les résultats individuels	Interprétation des résultats individuels	
		Résultat > 0,04	Résultat ≤ 0,04
PPD	$DO_{PPDB}-DO_{PPDA}/ DO_{TP}-DO_{TN}$	Positif	Négatif
R	$DO_R-DO_N/ DO_{TP}-DO_{TN}$	Positif	Négatif

II.2.3.2. Interprétation du résultat final à partir des résultats individuels

Selon les résultats individuels (PPD et R) obtenus, le résultat final de l’échantillon analysé avec le test IFN γ modifié peut être de trois types : positif (résultats individuels positifs), négatif (résultats individuels négatifs) ou divergent (résultats individuels discordants), (Tableau II.1.3).

Tableau II.1.3. Les différents types de résultat final du test IFN γ modifié (Faye S. *et al.*, 2008).

Résultats individuels		Résultat final du test IFN γ modifié
PPD	R	
Positif	Positif	POSITIF (Pos)
Négatif	Négatif	NEGATIF (Nég)
Positif	Négatif	DIVERGENT (Div)
Négatif	Positif	

III. Intégration à titre expérimental en Dordogne, du test IFN γ modifié en complément des tests actuels employés pour la lutte contre la Tb

A partir de la campagne de prophylaxie 2006-2007, le test IFN γ modifié a été employé en Dordogne, avec l'accord des autorités locales et la participation financière de l'Etat. Son utilisation en Dordogne a été validée en juin 2008 par un avis scientifique et technique de l'Afssa.

III.1. Modification de la séquence diagnostique de la Tb à partir du dépistage en prophylaxie (par IDS)

Réalisation de l'IDS en prophylaxie puis devenir du cheptel en fonction du résultat

L'IDS, test de dépistage très sensible à l'échelle du troupeau, est toujours utilisée en première intention en prophylaxie. Selon l'arrêté préfectoral du 19 décembre 2006, tous les bovins de plus de 18 mois de l'ensemble des cheptels de Dordogne doivent être testés en IDS. Si tous les bovins testés d'un cheptel sont négatifs, le cheptel conserve sa qualification. Si au moins un des bovins testés donne un résultat non-négatif (positif ou douteux), le vétérinaire déclare le cheptel comme ayant réagi à l'IDS, auprès de la DDCSPP (ex DDSV). L'éleveur est alors prévenu de la suspension de qualification de son cheptel vis-à-vis de la Tb (APMS) et, de la possibilité d'effectuer une analyse IFN γ (seulement pour la campagne prophylactique 2006-2007 car les années suivantes, réalisation du test IFN γ directement à la lecture du résultat de l'IDS).

Réalisation d'une analyse IFN γ sur des cheptels à IDS non-négative

Pour la campagne prophylactique 2006-2007, la prise de sang pour l'analyse IFN γ était réalisée environ 10 jours après l'IDS. Depuis la campagne 2007-2008, elle est généralement effectuée le jour de la lecture de l'IDS (3 jours après l'injection de tuberculine bovine).

Les prises de sang se font sur tube hépariné (10 ml). Ensuite, les prélèvements sanguins homogénéisés sont placés dans une enveloppe auto-scillante et cachetée par le vétérinaire avec les documents d'accompagnement des prélèvements (DAP) renseignant notamment l'heure du prélèvement, les conditions de réalisation de l'IDS, l'identification de l'élevage et des bovins concernés. L'acheminement des prélèvements jusqu'au Laboratoire est à la charge de l'éleveur ou du laboratoire (préleveurs). Il doit être fait dans les 6 h qui suivent la prise de sang et entre 17 et 27 °C.

Ainsi, les analyses IFN γ sont réalisées en moyenne entre 6 et 8 h après la prise de sang.

Cela nécessite une bonne organisation entre les vétérinaires sanitaires, les éleveurs et le laboratoire : planification au préalable du nombre d'échantillons (prises de sang) et de leur arrivée au laboratoire afin que toutes les analyses puissent débuter suffisamment tôt (en début d'après-midi) pour que la phase d'incubation des échantillons (pour la stimulation cellulaire) se déroule pendant la nuit.

Devenir du cheptel selon le résultat du test IFN γ

Le Laboratoire transmet les résultats du test à la DDSV sous forme qualitative (négatif, positif ou divergent) en moyenne dans les 3 jours qui suivent la réception du prélèvement. La DDSV communique les résultats à l'éleveur et au vétérinaire concerné et indique la suite des démarches à suivre (Cf. Figures II.1.3 et II.1.4, arbres décisionnels).

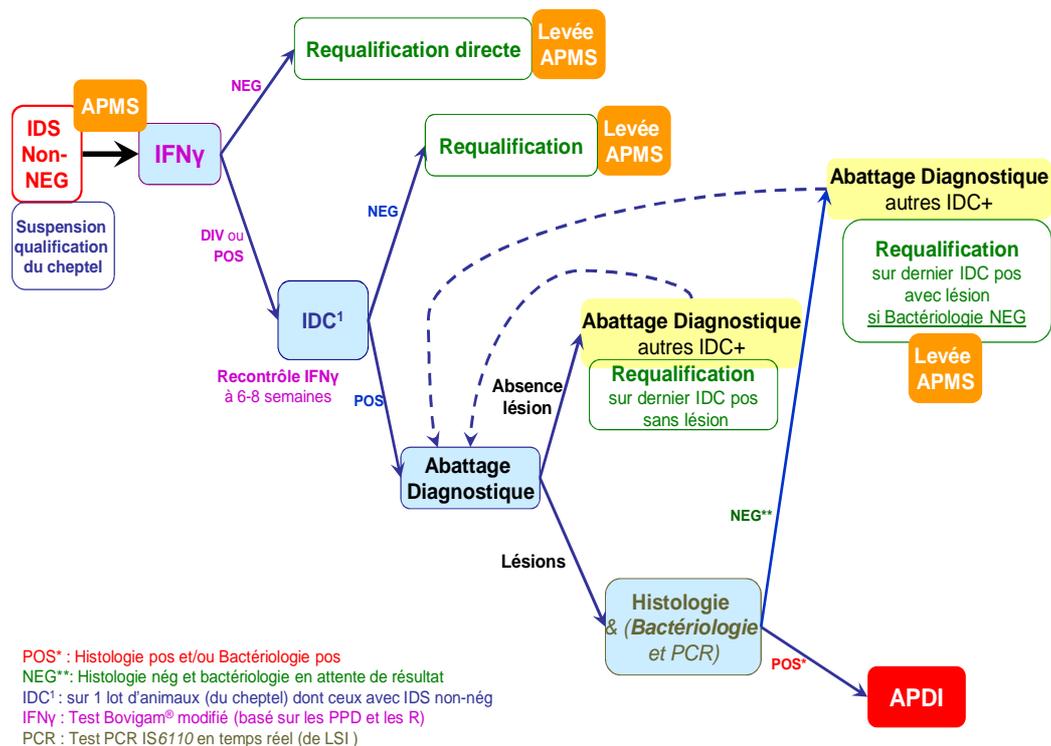


Figure II.1.3. Schéma décisionnel en cheptel à risque (susceptible), présentant une IDS non-négative selon le protocole expérimental utilisé en Dordogne (2007-2009).

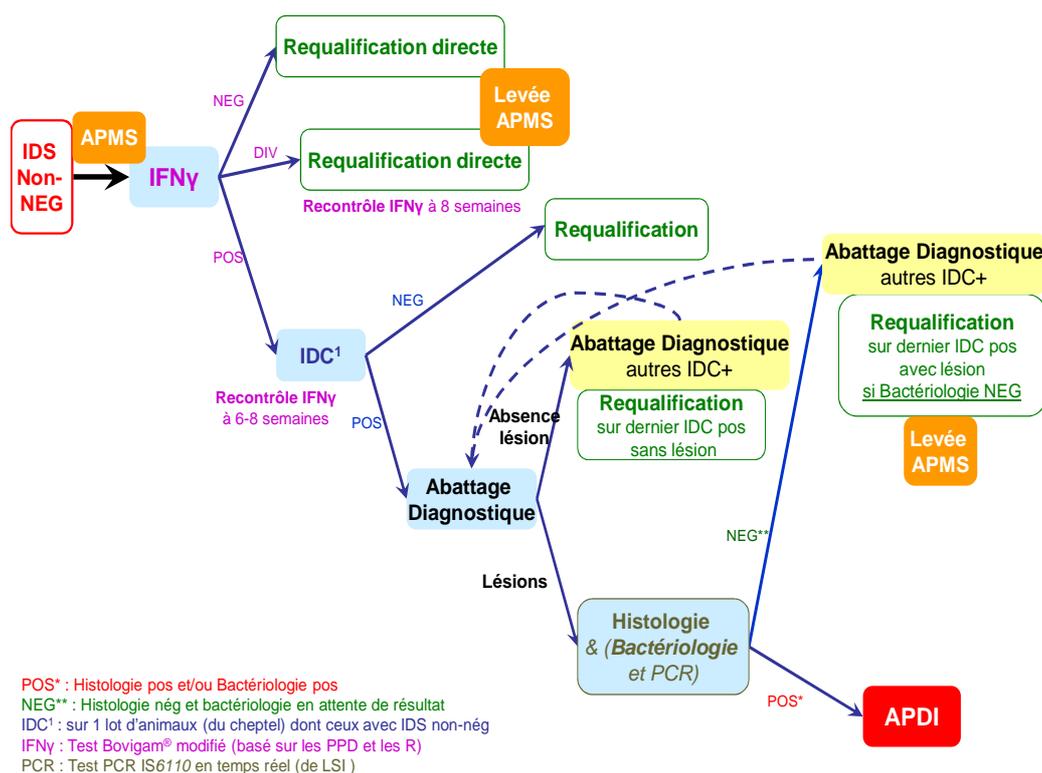


Figure II.1.4. Schéma décisionnel en cheptel n'ayant aucun risque connu et présentant une IDS non-négative (suspect) selon le protocole expérimental utilisé en Dordogne (2007-2009).

Le résultat du test IFN γ au niveau du cheptel et le statut suspect ou susceptible de l'élevage (Cf. Tableaux I.2.1 et I.2.2 (*statuts des animaux et cheptels définis par l'AM du 15/09/03 modifié**)) déterminent la requalification ou le maintien de la suspension, ainsi que les actions à mettre en place par la suite. Le Tableau II.1.4 présente les différentes actions menées sur le cheptel en fonction du résultat du test IFN γ .

III.2. Utilisation du test IFN γ en parallèle à l'IDS lors d'enquête épidémiologique

Lors d'enquêtes épidémiologiques, il est nécessaire de maximiser la sensibilité du dépistage. Or, le test IFN γ permet de détecter des bovins qui ne seraient pas détectés en IDS (Neill S.D. *et al.*, 1994 ; Pollock J.M. *et al.*, 2001 ; Vordermeier H.M. *et al.*, 2006ab ; De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006a).

Par conséquent, le test IFN γ modifié est utilisé en parallèle à l'IDS, lors d'enquêtes épidémiologiques, c'est-à-dire sur les animaux des cheptels susceptibles.

Tableau II.1.4. Les différentes actions menées sur le cheptel en fonction du résultat du test IFN γ modifié (au niveau cheptel).

RESULTAT du test IFNγ au niveau du cheptel	ACTIONS	
NEGATIF	« REQUALIFICATION » du cheptel (<u>suspect ou susceptible</u>) <i>Levée de la restriction de mouvement du cheptel</i>	- Pas de contrôle ultérieur requis
DIVERGENT	« REQUALIFICATION » du cheptel si <u>suspect</u> <i>Maintien de la restriction de mouvement uniquement pour les animaux avec un résultat divergent</i>	- Demande de recontrôle IFN γ des bovins IFN γ Div (après un délai 8 semaines) ⁽¹⁾
	SUSPENSION de la qualification du cheptel si <u>susceptible</u> (en lien épidémiologique avec un cheptel reconnu infecté) APMS	- Recontrôle IDC des bovins IDS Non-Nég et un lot ^(*) (après un délai 6 semaines) ⁽²⁾ - Recontrôle IFN γ le jour de l'IDC des bovins IFN γ Div.
POSITIF	SUSPENSION de la qualification du cheptel (<u>suspect ou susceptible</u>) APMS	- Recontrôle IDC des bovins IDS Non-Nég et un lot ^(*) (après un délai 6 semaines) ⁽²⁾ - Recontrôle IFN γ le jour de l'IDC des bovins IFN γ Pos et Div

Légende :

NEGATIF : tous les animaux testés du cheptel ont eu un résultat négatif au test IFN γ ;

DIVERGENT : au moins un animal du cheptel a eu un résultat divergent au test IFN γ mais aucun n'a eu un résultat positif ;

POSITIF : au moins un animal du cheptel a eu un résultat positif au test IFN γ ;

⁽¹⁾ : Si des bovins fournissent encore un résultat IFN γ divergent ou positif, la DDSV demande à l'éleveur d'abattre à des fins diagnostiques un des bovins concernés et procède de nouveau à un contrôle du cheptel ;

⁽²⁾ : le cheptel rejoint alors la procédure classique de dépistage, avec abattage diagnostique des bovins avec une IDC non-négative et l'enchaînement des autres actions (Cf. Figures II.1.3 et II.1.4). Lors de l'abattage diagnostique d'un bovin, des prélèvements sont systématiquement réalisés en vue d'une PCR, même sur les bovins sans lésion apparente ;

^(*) : Lot de bovins testés en IDC : 25 % du cheptel avec un minimum de 25 bovins ou la totalité si inférieur ;

IV. Les différentes études relatives à l'utilisation du test IFN γ modifié en Dordogne

L'objectif de ce travail était d'estimer les qualités du test IFN γ modifié, c'est-à-dire sa sensibilité conditionnelle à la confirmation *post mortem* de Tb (sensibilité relative), sa spécificité indépendamment des autres tests (spécificité absolue) et sa spécificité conditionnelle à une IDS non-négative (spécificité relative ou opérationnelle), selon les conditions de terrain de la Dordogne et en vue d'une validation de son utilisation.

La démarche adoptée a été la suivante :

Dans un premier temps, il s'agissait de comparer le mode de calcul "normalisé" par rapport au mode de calcul "initial" à partir des valeurs de sensibilité et de spécificité du test IFN γ modifié estimées avec les deux modes de calcul.

Dans un deuxième temps, c'est-à-dire après avoir déterminé un mode de calcul préférentiel, il fallait déterminer les valeurs de seuil décisionnel pour les PPD et les R pour lesquelles les valeurs de sensibilité et spécificité du test Bovigam[®] modifié, dans une région à faible prévalence, sont optimales, d'une part, dans la population générale et, d'autre part, dans la population d'IDS non-négatives.

Le but était ainsi d'optimiser l'utilité diagnostique du test IFN γ modifié dans cette région à faible prévalence en vue d'une classification optimale des cheptels et des animaux infectés et non infectés.

IV.1. Etudes de la spécificité absolue, de la spécificité et la sensibilité relatives du test IFN γ modifié : description des échantillons et processus de sélection

En l'absence de gold standard, la sensibilité du test IFN γ modifié a été étudiée rétrospectivement, dans des cheptels reconnus infectés de Tb c'est-à-dire où au moins un animal du cheptel a fourni un résultat positif en bactériologie (identification de *M. bovis*) et, conditionnellement à la confirmation *post mortem* de Tb, c'est à dire par la présence de lésions suspectes de Tb à l'abattoir sur les bovins, avec ou sans confirmation par au moins une des trois méthodes de diagnostic direct, l'histologie, la bactériologie et le test PCR MTBC (PCR IS6110 de LSI, France). Cette sensibilité relative à la confirmation *post mortem* de Tb du test IFN γ modifié a été notée Se_r (utilisation du terme « relative » par opposition à « absolue »).

La spécificité du test IFN γ modifié a été conduite dans des cheptels indemnes de Tb c'est-à-dire dans des cheptels où aucun animal n'avait fourni un résultat positif en bactériologie (pas de mise en évidence de *M. bovis*) depuis 2001, d'une zone indemne (où aucun animal positif à l'IDT et aucun foyer déclaré, depuis au moins 10 ans (condition utilisée par Aagaard C. *et al.*, 2006)). De plus, cette étude a été réalisée de manière absolue, c'est-à-dire indépendamment des autres tests pratiqués (processus de sélection des bovins sans tenir

compte des résultats des autres tests). Cette spécificité absolue du test IFN γ modifié, notée Sp est donc valide lorsque le test est utilisé en parallèle à l'IDS.

Toutefois, comme le test IFN γ modifié a été largement utilisé en routine comme méthode de confirmation des IDS non-négatives (utilisation en série dans les programmes de contrôles de la Tb dans tout le département depuis 2006), la spécificité opérationnelle du test, c'est-à-dire sa spécificité conditionnelle à une IDS non-négative a été étudiée rétrospectivement dans des cheptels indemnes de zones infectées ou pas. Cette spécificité opérationnelle du test IFN γ modifié a été également nommée spécificité relative à l'IDS non-négative (notée Sp_r) par opposition à sa spécificité absolue.

Concernant la méthode statistique utilisée, les différentes valeurs de sensibilité et de spécificité du test ont été estimées avec un intervalle de confiance à 95 %, utilisant la loi binomiale et à l'aide du logiciel de statistique R (version 2.9.2 du logiciel R (August 2009), R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche, <http://www.R-project.org>).

IV.1.1. Etude de la sensibilité relative à la confirmation *post mortem* de Tb (Se_r) du test IFN γ modifié

L'étude de la sensibilité relative à la confirmation *post mortem* de Tb (Se_r) du test IFN γ modifié a été menée *a posteriori*, à partir des résultats obtenus durant les campagnes de dépistage de la Tb, 2006-2007, 2007-2008 et 2008-2009 en Dordogne.

Cette Se_r du test a donc été réalisée rétrospectivement à partir de 73 bovins issus de 28 cheptels reconnus infectés (d'une zone infectée du département). Ces bovins présentaient tous des lésions évocatrices de Tb à l'abattoir, c'est pourquoi ils ont donc été classés comme positifs pour la Tb (classification déjà utilisée par Vordermeier H.M. *et al.*, 2001 et Gormley E. *et al.*, 2005 et Aagaard C. *et al.*, 2006). De plus, 40 parmi ces 73 animaux ont été analysés et confirmés infectés de Tb par des méthodes de diagnostic direct (Vordermeier H.M. *et al.*, 2001; Aagaard C. *et al.*, 2006) : 26 par la bactériologie et, l'histologie et/ou le test PCR MTBC (LSI, France) puis, 14 par l'histologie et/ou le test PCR MTBC (Tableau II.1.5). Les 33 animaux restants n'ont pas été analysés par les méthodes de diagnostic direct.

En outre, 71/73 bovins avaient été dépistés (non-négatifs) par IDS pratiquée à l'encolure. Ainsi, les prises de sang (PS) pour l'analyse IFN γ de ces 71 animaux avaient été réalisées entre 3 (59 PS pour les périodes 2007-2008 et 2008-2009) et 10 jours (12 PS pour la période

2006-2007) après l'injection de tuberculine bovine (IDS). Les deux animaux avec une IDS négative (et non testés en IDC) ont été analysés avec le test IFN γ lors du recontrôle (avec le test IFN γ) d'animaux IFN γ positifs du même cheptel. Toutefois, ces deux animaux ont été détectés positifs par la suite en histologie et PCR MTBC (et 1/2 en bactériologie).

Parmi ces 71 bovins non négatifs en IDS, 64 ont été également détectés non-négatifs en IDC alors que seulement 4 ont été trouvés négatifs en IDC. Les trois animaux restants n'ont pas subi d'IDC. Toutefois, ils ont été détectés positifs en histologie, PCR MTBC et bactériologie.

Par ailleurs, les 12 échantillons analysés en 2006-2007 ont été testés en IFN γ avec la macro-méthode (volumes recommandés par Bovigam[®] et utilisation d'ESAT6 et CFP10 individuellement). Les 61 échantillons analysés en 2007-2008 et 2008-2009 ont été testés avec la micro-méthode (volumes réduits pour l'analyse et utilisation d'ESAT6 et CFP10 en mélange).

Tableau II.1.5. Description des 73 bovins présentant des lésions suspectes de Tb à l'abattoir et issus de cheptels infectés et sélectionnés pour l'étude de la Se_r du test IFN γ modifiée selon la période de dépistage de la Tb, la méthode utilisée pour la stimulation cellulaire, le nombre (Nb) de bovins testés en IFN γ , le nombre de bovins analysés par 3 méthodes de diagnostic direct et ceux positifs (Pos) en bactériologie (identification *M. bovis*), en histologie (lésions évocatrices de Tb avec ou sans BAAR), en PCR MTBC.

Période dépistage de la Tb	Méthode stimulation cellulaire	Nb bovins testés en IFN γ	40 bovins testés en IFN γ et analysés par 3 méthodes de diagnostic direct			
			Nb d'analyses	Nb Bactériologie Pos	Nb Histologie Pos	Nb PCR MTBC Pos
2006-2007	macro-méthode	12	12	5	11	8
2007-2008	micro-méthode	14	14	8	14	10
2008-2009	micro-méthode	47	14	13	14	13
	<i>Total</i>	73	40	26	39	31

IV.1.2. Etude de la spécificité absolue (Sp) du test IFN γ modifié

L'étude de la spécificité absolue a été conduite en début d'année 2008 sur 500 bovins issus de 25 cheptels indemnes qui avaient été initialement sélectionnés (soit 20 bovins par cheptel). Ces 25 cheptels étaient considérés comme indemnes de Tb et cela est toujours le cas au moment de la rédaction de ce manuscrit, et ils provenaient d'une zone indemne de Tb (condition utilisée par Aagaard C. *et al.* (2006)) en Dordogne.

Une prise de sang a donc été réalisée le jour de l'IDS (pratiquée à l'encolure), sur ces 500 bovins en vue d'une analyse IFN γ modifiée avec la micro-méthode (Cf. § II.1.1.2.).

Or, 4 animaux (parmi les 500) provenant d'un des 25 cheptels sélectionnés n'ont pas pu être analysés en raison d'un volume de sang prélevé trop faible pour réaliser le test. Ainsi, seulement 496 animaux ont été testés. Par ailleurs, ils ont tous été retrouvés négatifs en IDS (résultats également retrouvés dans les études de Vordermeier H.M. *et al.* (2001) et Aagaard C. *et al.* (2006)).

IV.1.3. Etude de la spécificité relative à l'IDS non-négative (Sp_r) du test IFN γ modifié

L'étude de la spécificité relative à l'IDS non-négative (Sp_r) du test IFN γ modifié a été menée *a posteriori*, à partir des résultats obtenus durant les campagnes de dépistage de la Tb 2007-2008 et 2008-2009 en Dordogne (Faye S. *et al.*, sous presse).

Cette Sp_r ou spécificité opérationnelle du test a donc été réalisée rétrospectivement à partir de 578 bovins avec une IDS (pratiquée à l'encolure) non-négative issus de 176 cheptels indemnes qui par la suite ont été contrôlés annuellement et, au moment de la rédaction de ce chapitre, étaient encore tous considérés indemnes de Tb. Toutefois, contrairement à l'étude de spécificité absolue (mentionnée au § VI.1.2.), ces 176 cheptels provenaient d'une zone infectée de Tb en Dordogne, c'est-à-dire une zone où plusieurs cas de Tb avaient été détectés depuis ces dernières années.

Par ailleurs, chaque prise de sang pour l'analyse IFN γ avait été généralement réalisée 3 jours après l'injection de tuberculine bovine (IDS).

IV.2. Etude comparative entre les deux modes de calcul ("initial" et "normalisé") et entre deux seuils différents à partir des estimations des Se_r , Sp et Sp_r individuelles et finales du test IFN γ modifié : *description de la méthode employée*

Les Se_r , Sp et Sp_r individuelles (des R et des PPD) et finales du test IFN γ modifié ont été estimées à partir des résultats individuels calculés selon deux méthodes, d'une part le mode de calcul "initial" et d'autre part le mode de calcul "normalisé". De plus, deux critères d'interprétation (seuils de positivité) des résultats individuels (des PPD et des R) des échantillons ont été étudiés pour chacun des modes de calcul utilisés.

IV.2.1. Modes de calcul et critères d'interprétation des résultats individuels (des PPD et R) des échantillons de chacune des études

Tableau II.1.6. Formules de calcul des résultats individuels des échantillons analysés avec les PPD et avec les R selon les modes de calcul “initial” et “normalisé” et critères de positivité selon le type de seuil choisi.

Mode de calcul		Calcul des résultats individuels (formules)	Seuil de positivité	
			<i>haut</i>	<i>bas</i>
“initial”	PPD	$DO_{PPDB} - DO_{PPDA}$	> 0,10	> 0,04
	R	$DO_R - DO_N$	> 0,10	> 0,04
“normalisé”	PPD	$DO_{PPDB} - DO_{PPDA} / DO_{TP} - DO_{TN}$	> 0,04	> 0,02
	R	$DO_R - DO_N / DO_{TP} - DO_{TN}$	> 0,04	> 0,02

IV.2.1.1. Mode de calcul “initial” et seuils décisionnels étudiés

Pour chacune des trois études (Se_r , Sp et Sp_r) du test IFN γ modifié, les formules “initiales” utilisées pour calculer les résultats individuels du test IFN γ de chaque échantillon ont été les suivantes : $DO_{PPDB} - DO_{PPDA}$ pour les PPD et $DO_R - DO_N$ pour les R (Tableau II.1.6).

Deux valeurs de seuil de positivité pour interpréter les résultats individuels obtenus avec ces deux formules “initiales” ont été employées afin de définir le seuil décisionnel optimal, c'est-à-dire permettant d'obtenir les meilleures valeurs de sensibilité et spécificité du test IFN γ modifié.

D'une part, nous avons utilisé un seuil de positivité à 0,10 unité de DO (*désigné comme le seuil « haut »*), recommandé par Bovigam[®], utilisé notamment par Ryan T.J. *et al.* (2000) et approuvé en Nouvelle-Zélande lorsque le test est utilisé pour reconstrôler les animaux ayant réagi à l'IDS (pratiquée au pli sous-caudal) (Buddle B.M. *et al.*, 2001), (Tableau II.1.6).

D'autre part, nous avons employé un seuil de positivité à 0,04 unité de DO (*désigné comme le seuil « bas »*) étudié par Buddle B.M. *et al.* (2001) (Tableau II.1.6). En effet, ce seuil bas est couramment adopté pour une utilisation du test en parallèle avec les tests tuberculiques pour les cheptels à risque (Buddle B.M. *et al.*, 2001), puisque le fait d'abaisser le seuil permet de d'augmenter la sensibilité.

Ce seuil est même (de surcroît) plus intéressant pour les R qui sont plus spécifiques que les PPD et donc à priori moins sensibles (Buddle B.M. *et al.*, 2001).

IV.2.1.2. Mode de calcul “normalisé” et seuils décisionnels étudiés

Pour chacune des trois études (Se_r , Sp et Sp_r) du test IFN γ modifié, les formules “normalisées” utilisées pour calculer les résultats individuels du test IFN γ de chaque échantillon ont été les suivantes : $(DO_{PPDB}-DO_{PPDA})/(DO_{TP}-DO_{TN})$ pour les PPD et $(DO_R-DO_N)/(DO_{TP}-DO_{TN})$ pour les R (Tableau II.1.6).

Deux valeurs de seuil de positivité correspondant à celles utilisées pour le mode de calcul “initial” ont été également employées.

Le seuil de positivité de 0,10 du mode de calcul “initial” (seuil haut) a été adapté au mode de calcul “normalisé” (Cf. § II.2.3.1.2.). La valeur du seuil haut, comme nous l’avons déjà démontrée dans l’introduction de ce chapitre, a donc été redéfinie à 0,04 unité de DO pour le mode de calcul “normalisé” (Tableau II.1.6).

Concernant le seuil de positivité de 0,04 du mode de calcul “initial” (seuil bas), il a également été adapté au mode de calcul “normalisé”, c’est-à-dire à la formule incluant la médiane de $DO_{TP}-DO_{TN}$ à 2,4 : $(DO_{PPDB}-DO_{PPDA})/(DO_{TP}-DO_{TN})= 0,04/2,4= 0,02$ (Faye S. *et al.*, 2008). Ainsi, en utilisant le même procédé que celui employé pour redéfinir le seuil haut, la valeur du seuil bas a donc été redéfinie à 0,02 unité de DO pour le mode de calcul “normalisé” (Tableau II.1.6).

IV.2.2. Interprétation du résultat final à partir des résultats individuels

Pour chacune des trois études (Se_r , Sp et Sp_r) du test IFN γ modifié, le résultat final du test IFN γ modifié pour chaque échantillon a été interprété en fonction des résultats individuels obtenus pour les PPD et les R.

Ainsi, le résultat final de chaque échantillon testé a été interprété positif si les résultats individuels (PPD et R) étaient positifs, ou négatif si les résultats individuels étaient négatifs ou bien interprété divergent dans le cas de résultats individuels discordants (positif et négatif), (Tableau II.1.3).

IV.2.3. Définitions des Se_r , Sp et Sp_r individuelles et finales du test IFN γ modifié

IV.2.3.1. Calcul des Se_r , Sp et Sp_r individuelles (R et PPD) du test IFN γ

Concernant les Se_r individuelles des PPD (Se_r PPD) et des R (Se_r R), il s'agit respectivement du pourcentage de résultats positifs en PPD et du pourcentage de résultats positifs en R, dans l'étude de la sensibilité relative à la confirmation *post mortem* de Tb (Se_r) du test IFN γ modifié.

De même, concernant les Sp individuelles des PPD (Sp PPD) et des R (Sp R), il s'agit respectivement du pourcentage de résultats négatifs en PPD et du pourcentage de résultats négatifs en R, dans l'étude de la spécificité absolue (Sp) du test IFN γ modifié.

Enfin, concernant les Sp_r individuelles des PPD (Sp_r PPD) et des R (Sp_r R), il s'agit respectivement du pourcentage de résultats négatifs en PPD et du pourcentage de résultats négatifs en R, dans l'étude de la spécificité relative à l'IDS non-négative (Sp_r) du test IFN γ modifié.

IV.2.3.2. Calcul des Se_r , Sp et Sp_r finales du test IFN γ

La sensibilité et la spécificité finales du test IFN γ modifié peuvent être estimées selon deux méthodes c'est-à-dire en considérant les résultats finaux positifs et divergents (PPDUR) ou bien uniquement les résultats finaux positifs ($PPD \cap R$) (Tableau II.1.3) (Vordermeier H.M. et Ewer K., 2006a ; Coad M. *et al.*, 2008).

Il existe donc deux méthodes d'interprétation (PPDUR ou $PPD \cap R$) permettant de calculer les Se_r , Sp et Sp_r finales du test IFN γ modifié.

Avec la méthode d'interprétation PPDUR, la Se_r finale (Se_r PPDUR) du test correspond au pourcentage de résultats finaux positifs et divergents, dans notre étude de sensibilité relative (Se_r) du test IFN γ modifié et, la Sp finale (Sp PPDUR) et la Sp_r finale (Sp_r PPDUR) du test correspondent au pourcentage de résultats finaux négatifs seulement, dans nos études respectives de spécificité absolue (Sp) et de spécificité relative (Sp_r) du test IFN γ modifié.

Au contraire, avec la méthode d'interprétation $PPD \cap R$, la Se_r finale (Se_r $PPD \cap R$) du test correspond au pourcentage de résultats finaux positifs seulement, dans notre étude de sensibilité relative (Se_r) du test IFN γ modifié et, la Sp finale (Sp $PPD \cap R$) et la Sp_r finale

(Sp_r PPD \cap R) du test correspondent au pourcentage de résultats finaux négatifs et divergents, dans nos études respectives de spécificité absolue (Sp) et de spécificité relative (Sp_r) du test IFN γ modifié.

IV.3. Evaluation des valeurs de sensibilité & spécificité individuelles optimales permettant de déterminer des seuils décisionnels normalisés et ainsi d'estimer la sensibilité et la spécificité finales du test IFN γ avec les deux méthodes d'interprétation, selon les différentes conditions d'utilisation du test en Dordogne

Les combinaisons des résultats de sensibilités et spécificités individuelles des différentes études pour différentes valeurs de seuils décisionnels normalisés (seuils relatifs aux formules "normalisées" de calcul des résultats des PPD et des R) avaient pour objectif de déterminer des valeurs-seuils permettant d'obtenir des valeurs optimales de sensibilités et spécificités individuelles, selon deux conditions différentes d'application du test IFN γ modifié (dans la population générale (dépistage en parallèle avec l'IDS) ou pour confirmer les animaux non-négatifs en IDS (diagnostic)) dans cette région à une faible prévalence de Tb.

Différentes valeurs-seuils pour les PPD et les R ont donc été testées afin de déterminer leurs effets sur les valeurs de sensibilités relatives individuelles et de spécificités absolues et opérationnelles individuelles du test (également réalisé par Lauzi S. *et al.* (2000) pour étudier la spécificité des PPD).

Or, l'utilisation de courbe ROC (*receiver-operating characteristic*) recommandée par l'OIE (OIE, 2008b), permet de représenter graphiquement sur un plan orthonormé, les différents couples de sensibilité et spécificité calculés pour chaque valeur-seuil possible (Biteau-Coroller F. *et al.*, 2003). Cet outil graphique permet de représenter la capacité d'un test à discriminer entre les populations d'animaux infectés et indemnes (Perneger T. et Perrier A., 2004).

Le graphique a pour abscisse le taux de faux-positifs (dans une population indemne) soit le complément de la spécificité (« 1–spécificité ») et en ordonnée le taux de vrai-positifs (dans une population infectée) soit la sensibilité.

La valeur-seuil optimale, c'est-à-dire donnant le meilleur couple de sensibilité et spécificité est le point de la courbe ROC le plus près du coin supérieur gauche (point de coordonnées

($x=0$; $y=1$) ou autrement dit le plus éloigné de la diagonale représentant le test d'apport nul [c'est-à-dire ne produisant aucune discrimination entre les individus des deux populations (infectée et indemne)] (Delacour H., Servonnet A. et Roche C., 2009).

Ainsi, quatre courbes ROC ont donc été nécessaires pour sélectionner graphiquement les valeurs-seuils des PPD et des R selon les deux conditions d'application du test IFN γ modifié (courbes également utilisées par Ryan T.J. *et al.* (2000), Cockle P.J. *et al.* (2006), Schiller I. *et al.* (2009)).

Par conséquent, afin de déterminer les valeurs-seuils optimales des PPD et des R lorsque le test est employé dans la population générale, nous avons tracé d'une part, la courbe ROC des PPD représentant la sensibilité relative des PPD (Se_r PPD) en fonction du complément de la spécificité absolue des PPD (« $1-Sp$ PPD »), obtenue pour différentes valeurs-seuils (de 0,00 à 1,25) et d'autre part, la courbe ROC des R représentant la sensibilité relative des R (Se_r R) en fonction du complément de la spécificité absolue des R (« $1-Sp$ R »), obtenue pour différentes valeurs-seuils (de 0,00 à 1,70).

De même, afin de déterminer les valeurs-seuils optimales des PPD et des R lorsque le test est employé dans la population d'animaux non-négatifs en IDS, nous avons tracé d'une part, la courbe ROC des PPD représentant la Se_r PPD en fonction du complément de la spécificité opérationnelle des PPD (« $1-Sp_r$ PPD »), obtenue pour différentes valeurs-seuils (de 0,00 à 1,25) et d'autre part, la courbe ROC des R représentant la Se_r R en fonction du complément de la spécificité opérationnelle des R (« $1-Sp_r$ R »), obtenue pour différentes valeurs-seuils (de 0,00 à 1,70).

Subséquentement, il était alors possible pour chacune des conditions d'utilisation, d'estimer les valeurs de sensibilité et spécificité finales du test à partir des résultats de sensibilités et spécificités individuelles optimales obtenus et selon deux méthodes d'interprétation des résultats finaux ($PPD \cap R$ et $PPD \cup R$).

Résultats et Interprétations :

I. Résultats des études de sensibilité et spécificité (Se_r , Sp et Sp_r) du test IFN γ modifié, pour les comparaisons des deux modes de calcul et des deux types de seuils utilisés

I.1. Résultats de l'étude de la sensibilité relative à la confirmation *post mortem* de Tb (Se_r) du test IFN γ modifié

I.1.1. Contrôle de la qualité des 73 échantillons sélectionnés

Les valeurs des témoins négatif (PBS) et positif (PWM) de l'ensemble des échantillons répondent aux critères qualité ($DO_{N<} < 0,3$ et $DO_{PWM-DO_{N>}} > 0,4$).

La qualité des 73 échantillons sélectionnés pour cette étude est donc validée.

I.1.2. Estimation des Se_r individuelles et finales du test IFN γ à partir de différents critères d'interprétation des résultats (*2 modes de calcul et 2 types de seuil décisionnel*)

13/73 animaux sélectionnés pour l'étude ont obtenu des résultats individuels invalides en PPD alors que leurs résultats en R sont valides – *de surcroît, ces 13 échantillons ont tous un résultat positif en R* –. En effet, ces 13 échantillons présentent des valeurs de DO de PPDA (DO_{PPDA}) élevées en même temps que celles de PPDB (DO_{PPDB}) et supérieures à 2,5 unités de DO, avec un rapport DO_{PPDB}/DO_{PPDA} compris entre 0,850 et 1,150. Or, au-delà de 2,5 unités de DO, le graphique représentant la valeur de DO en fonction de la concentration en IFN γ n'est plus linéaire en raison d'un phénomène de saturation de l'absorbance (résultats présentés en Annexe XI).

Par conséquent, seuls les 60 animaux restants (issus de 20 cheptels) ont été conservés pour notre étude. Ainsi, 9 et 51 animaux ont été analysés respectivement par la macro-méthode (en 2006-2007) et par la micro-méthode (9 en 2007-2008 et 42 en 2008-2009), (Cf. Annexe XI).

I.1.2.1. Estimation des Se_r individuelles (Se_r PPD et Se_r R) du test IFN γ

Si l'on compare les deux modes de calcul aux seuils hauts (0,10 du mode de calcul "initial" et 0,04 du mode de calcul "normalisé"), les Se_r R sont identiques (80 % [68-89]) alors que la Se_r PPD obtenue avec le mode de calcul "initial" (85 % [73-93]) est supérieure à celle

obtenue avec le mode de calcul “normalisé” (83 % [72-92]) (Tableau II.1.7) bien que les écarts ne soient pas statistiquement significatifs.

En effet, 59/60 échantillons présentent des résultats en PPD identiques pour les deux modes de calcul. Ainsi, 50 échantillons sont considérés positifs en PPD pour une interprétation des résultats calculés à partir de formule “normalisée” contre 51 avec la formule “initiale”. Toutefois, l’examen des valeurs de DO obtenues à l’issue des calculs “initial” et “normalisé” pour cet échantillon aux résultats discordants pour les PPD montre que l’échantillon est positif proche de la limite de détection pour une utilisation de la formule “initiale” ($DO_{PPDB} - DO_{PPDA} = 0,105$ soit 0,11) et, négatif proche de la limite de détection pour un emploi de la formule “normalisée” ($(DO_{PPDB} - DO_{PPDA}) / (DO_{TP} - DO_{TN}) = 0,038$ soit 0,04).

De plus, le test du Chi 2 de Mac Némar permet de confirmer que cette différence de Se_r PPD n’est pas significative entre les deux modes de calcul.

A l’inverse, si l’on compare les deux modes de calcul aux seuils bas (0,04 du mode de calcul “initial” et 0,02 du mode de calcul “normalisé”), les Se_r PPD sont identiques (93 % [84-98]) alors que la Se_r R obtenue avec le mode de calcul “initial” (93 % [84-98]) est supérieure à celle obtenue avec le mode de calcul “normalisé” (88 % [76-95]) (Tableau II.1.7).

En effet, 57/60 échantillons présentent des résultats en R identiques pour les deux modes de calcul. Ainsi, 53 échantillons sont considérés positifs en R pour une interprétation des résultats calculés à partir de formule “normalisée” contre 56 avec la formule “initiale”. Toutefois, l’examen des valeurs de DO obtenues à l’issue des calculs “initial” et “normalisé” pour ces trois échantillons aux résultats discordants pour les R (1,2,3) montre qu’ils sont positifs proches de la limite de détection pour une utilisation de la formule “initiale” ($DO_R - DO_N = 0,041$ (1) ; 0,047 (2); 0,052 (3)) et négatifs proches de la limite de détection pour un emploi de la formule “normalisée” ($(DO_R - DO_N) / (DO_{TP} - DO_{TN}) = 0,016$ (1); 0,017 (2); 0,019 (3)).

De plus, le test du Chi 2 de Mac Némar permet de confirmer que cette différence de Se_r R n’est pas significative entre les deux modes de calcul.

Par conséquent, cette étude de sensibilité relative ne nous a pas permis de mettre en évidence de différence significative de Se_r individuelles entre les deux types de calcul.

Tableau II.1.7. Sensibilités individuelles relatives à la confirmation *post mortem* de Tb (Se_r) du test IFN γ modifié selon le mode de calcul et le seuil choisis (n=60).

		Mode de calcul			
		“initial”		“normalisé”	
		Seuil haut : <i>0,10</i>	Seuil bas : <i>0,04</i>	Seuil haut : <i>0,04</i>	Seuil bas : <i>0,02</i>
Se_r individuelles % [IC 95 %] (Nb)	Se_r PPD	85 % [73-93] (51)	93 % [84-98] (56)	83 % [72-92] (50)	93 % [84-98] (56)
	Se_r R	80 % [68-89] (48)	93 % [84-98] (56)	80 % [68-89] (48)	88 % [76-95] (53)

Nb : Nombre de résultats positifs.

Par ailleurs, concernant les différents seuils, les résultats individuels obtenus (Tableau II.1.7) montrent que la Se_r PPD est supérieure ou égale à la Se_r R.

Enfin, pour les deux modes de calcul, les Se_r individuelles sont logiquement meilleures si l'on abaisse le seuil (avec la formule “initiale” : augmentation de 13 % pour la Se_r R (significative) et 8 % pour la Se_r PPD ; avec la formule “normalisée” : augmentation de 8 % pour la Se_r R et 10 % pour la Se_r PPD (significative)) (Tableau II.1.7).

I.1.2.2. Estimation de la Se_r finale (Se_r PPD \cap R ou Se_r PPD \cup R) du test IFN γ

Si on compare les Se_r PPD \cap R pour les deux modes de calcul utilisés, celles-ci sont identiques aux seuils hauts (73 %) tandis qu'aux seuils bas, la Se_r PPD \cap R est supérieure pour le mode de calcul “initial” (90 %) par rapport à l'autre mode de calcul (85 %) toutefois, cette différence n'est pas significative (Tableau II.1.8).

A l'inverse, si on compare les Se_r PPD \cup R pour les deux modes de calcul employés, celles-ci sont identiques et optimales aux seuils bas (97 %) tandis qu'aux seuils hauts, la Se_r PPD \cup R du mode de calcul “initial” (92 %) est supérieure à celle de l'autre mode de calcul (90 %) toutefois, cette différence n'est pas significative (Tableau II.1.8).

Par conséquent, cette étude de sensibilité relative montre qu'il n'existe pas de différence significative de Se_r finales entre les deux types de calcul.

Tableau II.1.8. Etude de la sensibilité relative à la confirmation *post mortem* de Tb (Se_r) du test IFN γ modifié : Résultats finaux issus de l'association des résultats des PPD et des R selon le mode de calcul et le seuil choisis et estimation de la Se_r finale du test selon la méthode d'interprétation des résultats finaux choisie (n=60).

Mode de calcul	Seuil	Résultats finaux (Nb)			Se_r finale du test % [IC 95 %] (nombre d'animaux positifs)	
		POS	DIV	NEG	Se_r PPD \cap R	Se_r PPDUR
"initial"	haut : <i>0,10</i>	44	11	5	73 % [60-84] (44)	92 % [82-97] (55)
	bas : <i>0,04</i>	54	4	2	90 % [82-98] (54)	97 % [89-100] (58)
"normalisé"	haut : <i>0,04</i>	44	10	6	73 % [60-84] (44)	90 % [82-98] (54)
	bas : <i>0,02</i>	51	7	2	85 % [73-93] (51)	97 % [89-100] (58)

Se_r PPD \cap R : POS % ;

Se_r PPDUR : (POS + DIV) %.

Par ailleurs, pour les deux modes de calcul, les Se_r finales sont logiquement meilleures si l'on abaisse les seuils (avec le mode de calcul "initial" : augmentation de 17 % de la Se_r PPD \cap R (significative) et 5 % de la Se_r PPDUR ; avec le mode de calcul "normalisé" : augmentation de 12 % de la Se_r PPD \cap R et 7 % de la Se_r PPDUR) (Tableau II.1.8).

Enfin, les différentes Se_r PPDUR obtenues sont supérieures aux Se_r PPD \cap R (par exemple, au seuil haut la Se_r PPDUR est (significativement) supérieure à la Se_r PPD \cap R de 19 % avec le mode de calcul "initial" et de 17 % avec celui "normalisé") (Tableau II.1.8).

I.2. Résultats de l'étude de spécificité absolue (Sp) du test IFN γ modifié

I.2.1. Contrôle de la qualité des 496 échantillons analysés

496 animaux ont été analysés avec le test IFN γ afin d'évaluer sa spécificité absolue (Sp). Toutefois, 3/496 échantillons provenant de trois animaux issus de trois cheptels différents (de 20 animaux) ont été considérés comme inhibés car « $DO_{P_{WM}} - DO_N$ » est inférieur ou égal à 0,4 unité de DO (alors que leurs témoins négatifs respectifs sont valides ($DO_N < 0,3$)) c'est-à-dire le résultat de chaque échantillon stimulé avec du PWM (témoin positif) est invalide

(inhibition) (Cf. Annexe X (Figure A)). Par conséquent, les résultats de ces trois échantillons ne peuvent être interprétés.

De plus, le témoin négatif (PBS) d'un autre échantillon provenant d'un animal issu d'un autre cheptel (de 20 animaux) a également été considéré comme invalide car la DO_N est supérieure ou égale à 0,3 unité de DO (Cf. Annexe X (Figure B)). Par conséquent, le résultat de cet échantillon ne peut être interprété.

Ainsi, en raison de résultats des témoins non validés lors de l'analyse IFN γ , le nombre total d'animaux retenus pour l'étude de Sp a été réduit à 492 animaux issus de 25 cheptels (20 cheptels de 20 animaux, 1 cheptel de 16 animaux, 4 cheptels de 19 animaux).

I.2.2. Estimation des Sp individuelles et finales du test IFN γ à partir de différents critères d'interprétation des résultats (*2 modes de calcul et 2 types de seuil décisionnel*)

I.2.2.1. Estimation des Sp individuelles (Sp PPD et Sp R) du test IFN γ

Si l'on compare les deux modes de calcul aux seuils hauts (0,10 du mode de calcul "initial" et 0,04 du mode de calcul "normalisé"), les Sp R et Sp PPD sont identiques (99,4 % [98,2-99,9]) (Tableau II.1.9).

A l'inverse, si l'on compare les deux modes de calcul aux seuils bas (0,04 du mode de calcul "initial" et 0,02 du mode de calcul "normalisé"), les Sp PPD sont identiques (98,0 % [96,3-99,0]) alors que la Sp R obtenue avec le mode de calcul "normalisé" (98,6 % [97,1-99,4]) est supérieure à celle obtenue avec le mode de calcul "initial" (98,2 % [96,6-99,2]) (Tableau II.1.9).

En effet, 490/492 échantillons présentent des résultats en R identiques pour les deux modes de calcul. Ainsi, 483 échantillons sont considérés négatifs en R pour une interprétation des résultats calculés avec la formule "initiale" contre 485 avec la formule "normalisée". Toutefois, l'examen des valeurs de DO obtenues à l'issue des calculs "initial" et "normalisé" pour ces deux échantillons aux résultats discordants pour les R montre qu'ils sont négatifs proches de la limite de détection pour une utilisation de la formule "normalisée" (valeurs : 0,018 pour les deux) et positifs proches de la limite de détection pour un emploi de la formule "initiale" (valeurs : 0,044 ; 0,047).

De plus, le test du Chi 2 de Mac Némar permet de confirmer que cette différence de Sp R n'est pas significative entre les deux modes de calcul.

Par conséquent, cette étude de spécificité absolue montre qu'il n'existe pas de différence significative de Sp individuelles entre les deux types de calcul.

Tableau II.1.9. Spécificités absolues (Sp) individuelles du test IFN γ modifié selon le mode de calcul et le seuil choisis (n=492).

		Mode de calcul			
		"initial"		"normalisé"	
		Seuil haut : <i>0,10</i>	Seuil bas : <i>0,04</i>	Seuil haut : <i>0,04</i>	Seuil bas : <i>0,02</i>
Sp individuelles % [IC 95 %] (Nb)	Sp PPD	99,4 % [98,2-99,9] (489)	98,0 % [96,3-99,0] (482)	99,4 % [98,2-99,9] (489)	98,0 % [96,3-99,0] (482)
	Sp R	99,4 % [98,2-99,9] (489)	98,2 % [96,6-99,2] (483)	99,4 % [98,2-99,9] (489)	98,6 % [97,1-99,4] (485)

Nb : Nombre de résultats négatifs

Par ailleurs, concernant les différents seuils, les résultats individuels obtenus montrent que la Sp R est supérieure ou égale à la Sp PPD (Tableau II.1.9).

Enfin, pour les deux modes de calcul, les Sp individuelles sont logiquement plus élevées aux seuils hauts (avec la formule "initiale" : +1,2 % pour la Sp R et +1,4 % pour la Sp PPD ; avec la formule "normalisée" : +0,8 % pour la Sp R et 1,4 % pour la Sp PPD) (Tableau II.1.9).

I.2.2.2. Estimation de la Sp finale (Sp PPD \cap R ou Sp PPDUR) du test IFN γ

Si l'on compare les Sp PPD \cap R pour les deux modes de calcul utilisés, les Sp PPD \cap R sont identiques et optimales quel que soit le seuil (100 %) (Tableau II.1.10).

Néanmoins, si l'on compare les Sp PPDUR pour les deux modes de calcul employés, les Sp PPDUR sont identiques et optimales aux seuils hauts (98,8 %) tandis qu'aux seuils bas, la Sp PPDUR du mode de calcul "normalisé" (96,5 %) est supérieure à celle de l'autre mode de calcul (96,1 %) (Tableau II.1.10) ; toutefois, cette différence n'est pas significative.

Par conséquent, cette étude de spécificité absolue montre qu'il n'existe pas de différence significative de Sp finales entre les deux types de calcul.

Tableau II.1.10. Etude de la spécificité absolue (Sp) du test IFN γ modifié : Résultats finaux issus de l'association des résultats des PPD et des R selon le mode de calcul et le seuil choisis et estimation de la Sp finale du test selon la méthode d'interprétation des résultats finaux choisie (n=492).

		Résultats finaux (Nb)			Sp finale du test % [IC 95 %] (nombre d'animaux négatifs)	
Mode de calcul	Seuil	POS	DIV	NEG	Sp PPD \cap R	Sp PPDUR
"initial"	haut : 0,10	0	6	486	100 % [99,2-100] (492)	98,8 % [97,4-99,6] (486)
	bas : 0,04	0	19	473	100 % [99,2-100] (492)	96,1 % [94-97,6] (473)
"normalisé"	haut : 0,04	0	6	486	100 % [99,2-100] (492)	98,8 % [97,4-99,6] (486)
	bas : 0,02	0	17	475	100 % [99,2-100] (492)	96,5 % [94,5-98] (475)

$$Sp\ PPD\cap R : 1 - (POS\ \%) = (NEG + DIV)\ \%$$

$$Sp\ PPDUR : 1 - [(POS + DIV)\ \%] = NEG\ \%$$

Par ailleurs, pour les deux modes de calcul, les Sp PPDUR sont meilleures aux seuils hauts (+2,7 % et +2,3 % avec les modes de calcul "initial" et "normalisé" respectivement) (Tableau II.1.10).

Enfin, les Sp PPD \cap R obtenues sont supérieures aux Sp PPDUR (par exemple au seuil bas, la Se_r PPDUR est supérieure à la Sp PPD \cap R de 3,9 % (significatif) avec le mode de calcul "initial" et de 3,5 % avec celui "normalisé") (Tableau II.1.10).

I.3. Résultats de l'étude de spécificité opérationnelle ou relative à l'IDS non-négative (Sp_r) du test IFN γ modifié

I.3.1. Contrôle de la qualité des 578 échantillons sélectionnés

Les valeurs des témoins négatif (PBS) et positif (PWM) de l'ensemble des échantillons répondent aux critères qualité ($DO_N < 0,3$ et $DO_{PWM} - DO_N > 0,4$). La qualité des 578 échantillons sélectionnés pour cette étude est donc validée.

I.3.2. Estimation des Sp_r individuelles et finales du test IFN γ à partir de différents critères d'interprétation des résultats (*2 modes de calcul et 2 types de seuil décisionnel*)

Comme cela s'est produit dans l'étude de sensibilité relative (Se_r) du test, 31/578 animaux sélectionnés pour l'étude de spécificité opérationnelle (Sp_r) ont obtenu des résultats individuels invalides en PPD alors que leurs résultats en R sont valides. En effet, les absorbances obtenues pour ces 31 échantillons stimulés avec PPDA et PPDB sont saturées (résultats présentés en Annexe XI).

Par conséquent, seuls les 547 animaux restants (issus de 172 cheptels) ont été conservés pour notre étude.

I.3.2.1. Estimation des Sp_r individuelles (Sp_r PPD et Sp_r R) du test IFN γ

Si l'on compare les deux modes de calcul aux seuils hauts (0,10 du mode de calcul "initial" et 0,04 du mode de calcul "normalisé"), les Sp_r R et Sp_r PPD semblent meilleures avec le mode de calcul "normalisé" (Sp_r R de 93,1 % et Sp_r PPD de 73,3 %) par rapport au mode de calcul "initial" (Sp_r R de 92,7 % et Sp_r PPD de 72,9 %) (Tableau II.1.11).

En effet, 543/547 échantillons présentent des résultats en PPD identiques pour les deux modes de calcul. Ainsi, 399 échantillons sont considérés négatifs en PPD pour une interprétation des résultats calculés à partir de formule "initiale" contre 401 avec la formule "normalisée".

Toutefois, l'examen des valeurs de DO obtenues à l'issue des calculs "initial" et "normalisé" pour ces quatre échantillons aux résultats discordants pour les PPD (1,2,3,4) montre que les échantillons 1, 2 et 3 sont négatifs proches de la limite de détection pour une utilisation de la formule "normalisée" (valeurs : 0,036 (1) ; 0,039 (2); 0,039 (3)) mais positifs proches de la limite de détection pour un emploi de la formule "initiale" (valeurs : 0,101 (1) ; 0,106 (2); 0,107 (3)) alors que l'échantillon 4 est positif proche de la limite de détection pour un emploi de la formule "normalisée" (0,043) mais négatif proche de la limite de détection pour un emploi de la formule "initiale" (0,088).

Par ailleurs, le test du Chi 2 de Mac Némar permet de confirmer que cette différence de Sp_r PPD n'est pas significative entre les deux modes de calcul.

De même, 537/547 échantillons présentent des résultats en R identiques pour les deux modes de calcul. Ainsi, 507 échantillons sont considérés négatifs en R pour une interprétation des résultats calculés à partir de formule “initiale” contre 509 avec la formule “normalisée”.

Toutefois, l’examen des valeurs de DO obtenues à l’issue des calculs “initial” et “normalisé” pour ces dix échantillons aux résultats discordants pour les R montre que six échantillons sont négatifs proches de la limite de détection pour une utilisation de la formule “normalisée” (valeurs comprises entre 0,036 et 0,039) mais positifs proches de la limite de détection pour un emploi de la formule “initiale” (valeurs comprises entre 0,101 et 0,113) alors que les 4 autres échantillons sont positifs proches de la limite de détection pour un emploi de la formule “normalisée” (valeurs comprises entre 0,042 et 0,046) mais négatifs proches de la limite de détection pour un emploi de la formule “initiale”(valeurs comprises entre 0,089 et 0,100).

De plus, le test du Chi 2 de Mac Némar permet de confirmer que cette différence de Sp_r R n’est pas significative entre les deux modes de calcul.

A l’inverse, si l’on compare les deux modes de calcul aux seuils bas (0,04 du mode de calcul “initial” et 0,02 du mode de calcul “normalisé”), les Sp_r R et Sp_r PPD semblent également meilleures avec le mode de calcul “normalisé” (Sp_r R de 84,8 % et Sp_r PPD de 66,5 %) par rapport au mode de calcul “initial” (Sp_r R de 77,7 % et Sp_r PPD de 64,9 %) (Tableau II.1.11).

En effet, 538/547 échantillons présentent des résultats en PPD identiques pour les deux modes de calcul. Ainsi, 355 échantillons sont considérés négatifs en PPD pour une interprétation des résultats calculés à partir de formule “initiale” contre 364 avec la formule “normalisée”.

Toutefois, l’examen des valeurs de DO obtenues à l’issue des calculs “initial” et “normalisé” pour ces neuf échantillons aux résultats discordants pour les R montre qu’ils sont négatifs proches de la limite de détection pour une utilisation de la formule “normalisée” (valeurs comprises entre 0,015 et 0,020) mais positifs proches de la limite de détection pour un emploi de la formule “initiale” (valeurs comprises entre 0,041 et 0,054).

Cependant, le test du Chi 2 de Mac Némar permet de confirmer que cette différence de Sp_r PPD n’est pas significative entre les deux modes de calcul.

De même, 506/547 échantillons présentent des résultats en R identiques pour les deux modes de calcul. Ainsi, 425 échantillons sont considérés négatifs en PPD pour une interprétation des résultats calculés à partir de formule “initiale” contre 464 avec la formule “normalisée”.

Toutefois, l’examen des valeurs de DO obtenues à l’issue des calculs “initial” et “normalisé” pour les 41 échantillons aux résultats discordants pour les R montre que 40 échantillons sont négatifs proches de la limite de détection pour une utilisation de la formule “normalisée” (valeurs comprises entre 0,014 et 0,020) mais positifs proches de la limite de détection pour un emploi de la formule “initiale” (valeurs comprises entre 0,041 et 0,055) alors qu’un seul échantillon est positif proche de la limite de détection pour une utilisation de la formule “normalisée” (0,021) mais négatif proche de la limite de détection pour un emploi de la formule “initiale” (0,038).

Cependant, le test du Chi 2 de Mac Némar permet de confirmer que cette différence de Sp_r R n’est pas significative entre les deux modes de calcul.

Par conséquent, cette étude de spécificité opérationnelle montre qu’il n’existe pas de différence significative de Sp_r individuelles entre les deux types de calcul, bien que ces écarts de Sp_r individuelles soient plus grands pour les seuils bas.

Tableau I.1.11. Spécificités opérationnelles (Sp_r) individuelles du test IFN γ modifié selon le mode de calcul et le seuil choisis (n=547).

		Mode de calcul			
		“initial”		“normalisé”	
		Seuil haut : <i>0,10</i>	Seuil bas : <i>0,04</i>	Seuil haut : <i>0,04</i>	Seuil bas : <i>0,02</i>
Sp _r individuelles % [IC 95 %] (Nb)	Sp _r PPD	72,9 % [69-76,6] (399)	64,9 % [60,7-68,9] (355)	73,3 % [69,4-77,0] (401)	66,5 % [62,4-70,5] (364)
	Sp _r R	92,7 % [90,2-94,7] (507)	77,7 % [74-81,1] (425)	93,1 % [90,6-95,0] (509)	84,8 % [81,5-87,7] (464)

Nb : Nombre de résultats négatifs.

Par ailleurs, concernant les différents seuils étudiés des deux modes de calcul, les résultats individuels obtenus (Tableau II.1.11) montrent que la Sp_r R est largement supérieure à la Sp_r PPD (écart non-significatif seulement pour le seuil bas du mode de calcul initial).

Enfin, pour les deux modes de calcul, les Sp_r individuelles sont largement supérieures aux seuils hauts (avec la formule “initiale” : +15 % pour la Sp_r R et +8 % pour la Sp_r PPD ; avec la formule “normalisée” : +8,3 % pour la Sp_r R et +6,8 % pour la Sp_r PPD) (Tableau II.1.11).

I.3.2.2. Estimation de la Sp_r finale (Sp_r PPD \cap R ou Sp_r PPDUR) du test IFN γ

Si l'on compare les Sp_r PPD \cap R pour les deux modes de calcul utilisés, celles-ci sont identiques aux seuils hauts (95,4 %) alors qu'aux seuils bas, la Sp_r PPD \cap R du mode de calcul "normalisé" (91,2 %) est significativement supérieure (de 2,9 %) à celle de l'autre mode de calcul (88,3 %) (Tableau II.1.12).

De même, si l'on compare les Sp_r PPDUR pour les deux modes de calcul employés, celles-ci sont comparables aux seuils hauts (70,2 % et 70,9 % pour les modes de calcul initial et normalisé respectivement) tandis qu'aux seuils bas, la Sp PPDUR du mode de calcul "normalisé" (60,1 %) est supérieure (de 5,8 %) à celle de l'autre mode de calcul (54,3 %) (Tableau II.1.12).

Par conséquent, cette étude de spécificité opérationnelle montre qu'il n'existe pas de différence significative de Sp_r finales entre les deux types de calcul, bien que ces écarts de Sp_r finales soient plus grands pour les seuils bas.

Tableau II.1.12. Etude de la spécificité opérationnelle (Sp_r) du test IFN γ modifié
Résultats finaux issus de l'association des résultats des PPD et des R selon le mode de calcul et le seuil choisis et estimation de la Sp_r finale du test selon la méthode d'interprétation des résultats finaux choisie (n=547).

Mode de calcul	Seuil	Résultats finaux (Nb)			Sp _r finale du test % [IC 95 %] (nombre d'animaux négatifs)	
		POS	DIV	NEG	Sp _r PPD \cap R	Sp _r PPDUR
"initial"	haut : 0,10	25	138	384	95,4 % [93,3-97,0] (522)	70,2 % [66,2-74] (384)
	bas : 0,04	64	186	297	88,3 % [85,3-90,9] (483)	54,3 % [50-58,5] (297)
"normalisé"	haut : 0,04	25	134	388	95,4 % [93,3-97,0] (522)	70,9 % [66,9-74,7] (388)
	bas : 0,02	48	170	329	91,2 % [88,5-93,5] (499)	60,1 % [55,9-64,3] (329)

Sp_r PPD \cap R : $1 - (POS \%) = (NEG + DIV) \%$

Sp_r PPDUR : $1 - [(POS + DIV) \%) = NEG \%$

Par ailleurs, pour les deux modes de calcul, les Sp_r PPDUR sont logiquement largement supérieures aux seuils hauts (+15,9 % et +10,8 % avec les modes de calcul "initial" et "normalisé" respectivement) (Tableau II.1.12).

De plus, les Sp_r PPD \cap R obtenues sont significativement meilleures que les Sp_r PPDUR (par exemple au seuil haut, la Se_r PPDUR est supérieure à la Sp PPD \cap R de 25,2 % avec le mode de calcul “initial” et de 24,5 % avec celui “normalisé”) (Tableau II.1.12).

II. Combinaisons des résultats individuels des différentes études pour déterminer les seuils décisionnels, relatifs au mode de calcul “normalisé”, selon les différentes conditions d’utilisation du test en Dordogne et en déduire les valeurs de sensibilité et spécificité finales de ce test

II.1. Evaluation des Se_r (sensibilités relatives) et Sp (spécificités absolues) individuelles optimales et, estimation des Se_r et Sp finales du test pour des valeurs de seuil donnant des Se_r et Sp individuelles optimales

II.1.1. Détermination des seuils permettant des Se_r et Sp individuelles optimales

La détermination des valeurs de seuil décisionnel concernant les PPD et les R, pour lesquelles les sensibilités relatives (Se_r) et les spécificités absolues (Sp) individuelles (des PPD et des R) du test sont optimales, s’effectue par combinaison des résultats des Se_r et Sp individuelles obtenus pour différentes valeurs de seuils, dans les études de Se_r (60 échantillons) et de Sp (492 échantillons) du test IFN γ respectivement (Tableau II.1.13).

Tableau II.1.13. Résultats des Sensibilités relatives (Se_r) (n=60) et Spécificités absolues (Sp) (n=492) individuelles du test IFN γ pour différentes valeurs de seuils décisionnels (de 0,01 à 0,08) des formules “normalisées” de calcul des résultats des PPD et des R (Faye S. *et al.*, sous presse).

		Valeurs des seuils							
		0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08
PPD %	Se_r	93 % 84-98 (56)	93 % 84-98 (56)	87 % 75-94 (52)	83 % 72-92 (50)	83 % 72-92 (50)	75 % 62-85 (45)	75 % 62-85 (45)	75 % 62-85 (45)
	Sp	97,6 % 95,8-98,7 (480)	98,0 % 96,3-99,0 (482)	99,2 % 97,9-99,8 (488)	99,4 % 98,2-99,9 (489)				
R %	Se_r	97 % 89-100 (58)	88 % 76-95 (53)	87 % 75-94 (52)	80 % 68-89 (48)	72 % 59-83 (43)	68 % 55-80 (41)	67 % 53-78 (40)	62 % 48-74 (37)
	Sp	95,9 % 93,8-97,5 (472)	98,6 % 97,1-99,4 (485)	99,4 % 98,2-99,9 (489)	99,4 % 98,2-99,9 (489)	99,6 % 98,5-99,9 (490)	99,6 % 98,5-99,9 (490)	99,8 % 98,9-100 (491)	99,8 % 98,9-100 (491)

Nb : Nombre de résultats positifs dans l’étude de la Se_r du test ou de résultats négatifs dans l’étude de la Sp du test.

II.1.1.1. Résultats combinés des Se_r PPD & Sp PPD

Le Tableau II.1.13 présente les valeurs de Se_r PPD et de Sp PPD, obtenues en utilisant la formule “normalisée” pour calculer les résultats des PPD $[(DO_{PPDB}-DO_{PPDA})/(DO_{TP}-DO_{TN})]$ et huit valeurs différentes de seuil de positivité des résultats (de 0,01 à 0,08), dans les études de Se_r et de Sp du test IFN γ respectivement.

Ces résultats montrent que les PPD sont très spécifiques et assez sensibles (au seuil de 0,04, Se_r PPD de 83 % [IC 95 %, 72-92] et Sp PPD de 99,4 % [IC 95 %, 98,2-99,9]).

Une courbe ROC des PPD a été tracée à partir des valeurs de Se_r PPD et Sp PPD obtenues pour différentes valeurs de seuil (Figure II.1.5). Des valeurs optimales en Se_r PPD (93 % [84-98]) et Sp PPD (98,0 % [96,3-99,0]) ont été obtenues lorsque la valeur du seuil de positivité des résultats des PPD (calculés à partir de la formule de calcul “normalisée”), est de 0,02 (Figure II.1.5 et Tableau II.1.13).

N.B. : ce seuil décisionnel de 0,02 déterminé pour la formule “normalisée” de calcul des résultats des PPD (pour une utilisation du test IFN γ en parallèle à l’IDS) correspond à un seuil décisionnel de 0,04 pour la formule “initiale” de calcul des résultats des PPD ($DO_{PPDB}-DO_{PPDA}$).

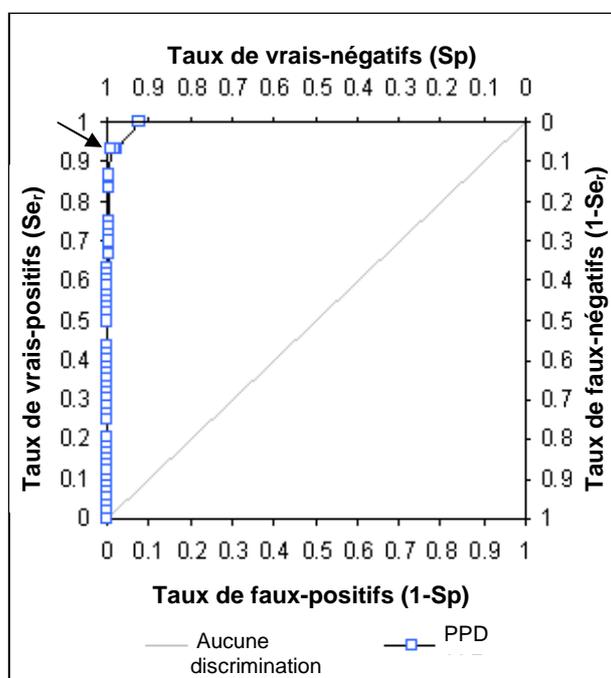


Figure II.1.5. Courbe ROC représentant la Se_r PPD (« taux de vrai-positifs » en PPD, dans l’étude de la Se_r) en fonction de « 1-Sp PPD » (« taux de faux-positifs », dans l’étude de la Sp), obtenue pour différentes valeurs-seuils (de 0,00 à 1,25) (Faye S. *et al.*, sous presse).

La flèche indique le seuil de positivité de 0,02 permettant d’obtenir une sensibilité relative et une spécificité absolue des PPD optimales.

II.1.1.2. Résultats combinés des Se_r R & Sp R

Les valeurs de Se_r R et de Sp R, obtenues en utilisant la formule “normalisée” pour calculer les résultats des R $[(DO_R - DO_N)/(DO_{TP} - DO_{TN})]$ et huit valeurs différentes de seuil de positivité des résultats (de 0,01 à 0,08), dans les études de Se_r et de Sp du test IFN γ respectivement sont indiquées au tableau II.1.13.

Ces résultats montrent que les R sont très spécifiques et assez sensibles (au seuil de 0,04, Se_r PPD de 80 % [IC 95 %, 68-89] et Sp PPD de 99,4% [IC 95 %, 98,2-99,9]), comme cela a déjà été décrit dans la littérature.

Une courbe ROC des R a été tracée à partir des valeurs de Se_r R et Sp R obtenues (Figure II.1.6). Des valeurs optimales en Se_r R (97 % [89-100]) et Sp R (95,9 % [93,8-97,5]) ont été obtenues lorsque la valeur du seuil de positivité des résultats des R (calculés à partir de la formule de calcul “normalisée”), est de 0,01 (Figure II.1.6 et Tableau II.1.13).

N.B. : ce seuil décisionnel de 0,01 déterminé pour la formule “normalisée” de calcul des résultats des R (pour une utilisation du test IFN γ en parallèle à l’IDS) correspond à un seuil décisionnel de 0,02 (0,01 x 2,4) pour la formule “initiale” de calcul des résultats des R ($DO_R - DO_N$).

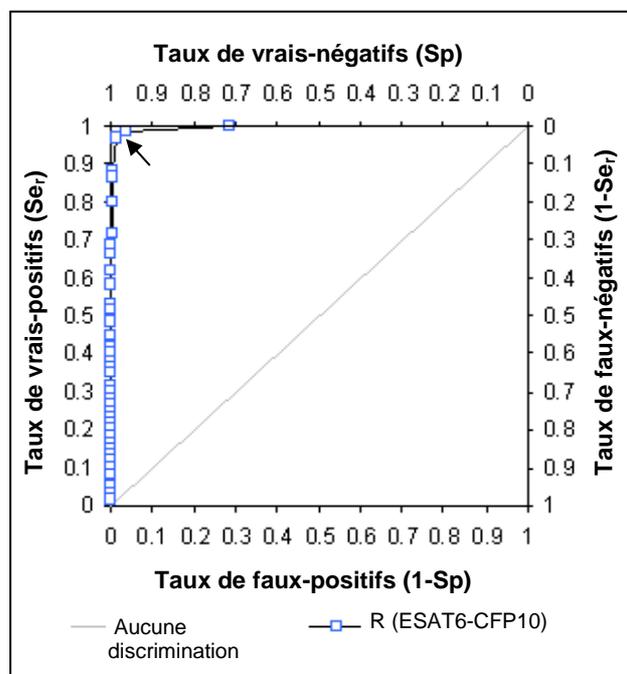


Figure II.1.6. Courbe ROC représentant la Se_r R (« taux de vrai-positifs » en R dans l’étude de la Se_r) en fonction de « 1-Sp R » (« taux de faux-positifs » dans l’étude de la Sp),

obtenue pour différentes valeurs-seuils (de 0,00 à 1,70) (Faye S. *et al.*, sous presse).

La flèche indique le seuil de positivité de 0,01 permettant d’obtenir une sensibilité relative et une spécificité absolue des R optimales.

II.1.2. Estimation des Se_r et Sp finales du test IFN γ aux seuils décisionnels déterminés pour des Se_r et Sp individuelles optimales

Les résultats finaux des études de Se_r et Sp du test IFN γ , obtenus à partir de l'association des résultats des PPD et R (résultats individuels de chaque étude respective, cf. Tableau II.1.13) déterminés pour des valeurs de seuil de positivité de 0,02 et de 0,01 respectivement sont exposés au tableau II.1.14.

De même, des estimations des Se_r et Sp finales du test IFN γ en suivant deux méthodes d'interprétation des résultats finaux ($PPD \cap R$ et $PPDUR$) sont présentées dans ce tableau.

Tableau II.1.14. Résultats finaux de l'étude de la sensibilité relative (Se_r) (n=60) et de l'étude de la spécificité absolue (Sp) (n=492) du test IFN γ , issus de l'association des résultats des PPD et des R obtenus pour des seuils de positivité de 0,02 et 0,01 respectivement ; Estimation de la Se_r et de la Sp finales à partir de deux méthodes d'interprétation des résultats finaux (Faye S. *et al.*, sous presse).

Nombre de	Résultats finaux	
	Etude de la Sp	Etude de la Se_r
POS	0	54
DIV	30	6
NEG	462	0
Méthode d'interprétation	Sp finale % [IC 95 %] (nombre d'animaux négatifs)	Se_r finale % [IC 95 %] (nombre d'animaux positifs)
PPD \cap R	100 % [99,2-100] (492)	90 % [82-98] (54)
PPDUR	93,9 % [91,4-95,8] (462)	100 % [95-100] (60)

$$Sp_{PPD \cap R} : 1 - (POS \%) = (NEG + DIV) \% ; Sp_{PPDUR} : 1 - [(POS + DIV) \%] = NEG \% ;$$

$$Se_r_{PPD \cap R} : POS \% ; Se_r_{PPDUR} : (POS + DIV) \%$$

La Se_r $PPD \cap R$ et la Se_r $PPDUR$ obtenues du test IFN γ (*dont l'analyse des résultats est basée sur des formules "normalisées" avec des seuils de 0,02 pour les PPD et de 0,01 pour les R) ont donc été estimées respectivement à 90 % [82-98] et 100 % [95-100] (Tableau II.1.14).

De même, la Sp $PPD \cap R$ et la Sp $PPDUR$ obtenues du test IFN γ * ont donc été estimées respectivement à 100 % [99,2-100] et 93,9 % [91,4-95,8] (Tableau II.1.14).

II.2. Evaluation des Se_r (sensibilités relatives) & Sp_r (spécificités opérationnelles) individuelles optimales et, estimation des Se_r & Sp_r finales du test pour des valeurs de seuils donnant des Se_r & Sp_r individuelles optimales

II.2.1. Détermination des seuils permettant des Se_r & Sp_r individuelles optimales

La détermination des valeurs des seuils décisionnels concernant les PPD et les R, pour lesquelles les sensibilités relatives (Se_r) et les spécificités opérationnelles (Sp_r) individuelles (des PPD et des R) du test sont optimales, s'effectue par combinaison des résultats des Se_r et Sp_r individuelles obtenus pour différentes valeurs de seuils, dans les études de Se_r (60 échantillons) et de Sp_r (547 échantillons) du test IFN γ respectivement (Tableau II.1.15).

Tableau II.1.15. Résultats des Sensibilités relatives (Se_r) (n=60) et Spécificités opérationnelles (Sp_r) (n=547) individuelles du test IFN γ pour différentes valeurs de seuils décisionnels (de 0,01 à 0,08) des formules “normalisées” de calcul des résultats des PPD et des R (Faye S. *et al.*, sous presse).

		Valeurs des seuils							
		0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08
PPD %	Se_r	93 % 84-98 (56)	93 % 84-98 (56)	87 % 75-94 (52)	83 % 72-92 (50)	83 % 72-92 (50)	75 % 62-85 (45)	75 % 62-85 (45)	75 % 62-85 (45)
	Sp_r	61,1 % 56,8-65,2 (334)	66,5 % 62,4-70,5 (364)	70,4 % 66,4-74,2 (385)	73,3 % 69,4-77,0 (401)	75,5 % 71,7-79,0 (413)	77,1 % 73,4-80,6 (422)	79,5 % 75,9-82,8 (435)	80,8 % 77,2-84,0 (442)
R %	Se_r	97 % 89-100 (58)	88 % 76-95 (53)	87 % 75-94 (52)	80 % 68-89 (48)	72 % 59-83 (43)	68 % 55-80 (41)	67 % 53-78 (40)	62 % 48-74 (37)
	Sp_r	60,9 % 56,6-65,0 (333)	84,8 % 81,5-87,7 (464)	90,7 % 87,9-93,0 (496)	93,1 % 90,6-95,0 (509)	94,5 % 92,3-96,3 (517)	95,4 % 93,3-97,0 (522)	96,0 % 94,0-97,5 (525)	96,5 % 94,6-97,9 (528)

Nb : Nombre de résultats positifs dans l'étude de la Se_r du test ou de résultats négatifs dans l'étude de la Sp_r du test.

II.2.1.1. Résultats combinés des Se_r PPD & Sp_r PPD

Le Tableau II.1.15 présente les valeurs de Se_r PPD et de Sp_r PPD, obtenues en utilisant la formule “normalisée” pour calculer les résultats des PPD $[(DO_{PPDB}-DO_{PPDA})/(DO_{TP}-DO_{TN})]$ et huit valeurs différentes de seuil de positivité des résultats (de 0,01 à 0,08), dans les études de Se_r et de Sp_r du test IFN γ respectivement.

Ces résultats montrent que les PPD sont assez sensibles mais beaucoup moins spécifiques (au seuil de 0,04, Se_r PPD de 83 % [IC 95 %, 72-92] et Sp_r PPD de 73,3 % [IC 95 %, 69,4-77,0]), par rapport au résultat (de Sp PPD) obtenu dans l'étude de spécificité absolue (Sp).

Une seconde courbe ROC des PPD a été tracée à partir des valeurs de Se_r PPD et Sp_r PPD obtenues (Figure II.1.7). Des valeurs optimales en Se_r PPD (83 % [72-92]) et Sp_r PPD (75,5 % [71,7-79,0]) ont été obtenues lorsque la valeur du seuil de positivité des résultats des PPD (calculés à partir de la formule de calcul "normalisée"), est de 0,05 (Figure II.1.7 et Tableau II.1.15).

N.B. : ce seuil décisionnel de 0,05 déterminé pour la formule "normalisée" de calcul des résultats des PPD (pour une utilisation du test IFN γ en série avec l'IDS) correspond à un seuil décisionnel de 0,12 (0,05 x 2,4) pour la formule "initiale" de calcul des résultats des PPD ($DO_{PPDB}-DO_{PPDA}$).

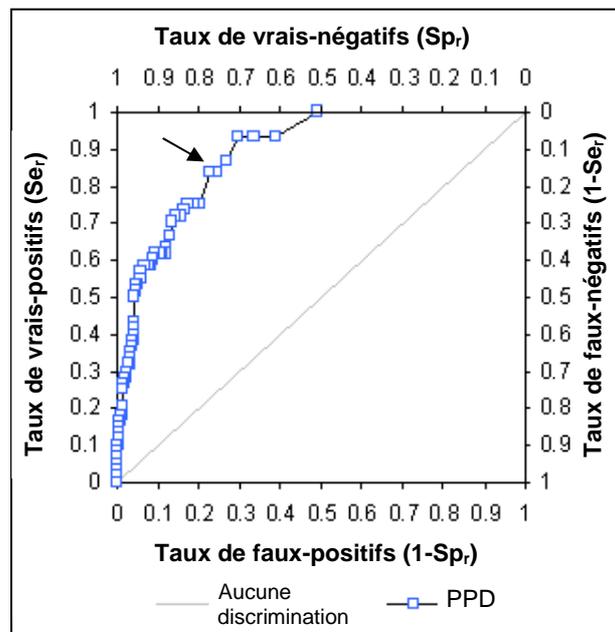


Figure II.1.7. Courbe ROC représentant la Se_r PPD (« taux de vrai-positifs » en PPD dans l'étude de la Se_r) en fonction de « $1-Sp_r$ PPD » (« taux de faux-positifs » dans l'étude de la Sp_r), obtenue pour différentes valeurs-seuils (de 0,00 à 1,25) (Faye S. *et al.*, sous presse).

La flèche indique le seuil de positivité de 0,05 permettant d'obtenir une sensibilité relative et une spécificité absolue des PPD optimales.

II.2.1.2. Résultats combinés des Se_r R & Sp_r R

Les valeurs de Se_r R et de Sp_r R, obtenues en utilisant la formule "normalisée" pour calculer les résultats des R $[(DO_R-DO_N)/(DO_{TP}-DO_{TN})]$ et huit valeurs différentes de seuil de positivité des résultats (de 0,01 à 0,08), dans les études de Se_r et de Sp_r du test IFN γ respectivement sont indiquées au tableau II.1.15.

Ces résultats montrent que les R sont bien spécifiques et assez sensibles (au seuil de 0,04, Se_r PPD de 80 % [IC 95 %, 68-89] et Sp_r PPD de 93,1 % [IC 95 %, 98,2-99,9]), comme cela a déjà été décrit dans la littérature et dans l'étude de spécificité absolue (Sp).

Une seconde courbe ROC des R a été tracée à partir des valeurs de Se_r R et Sp_r R obtenues (Figure II.1.8). Des valeurs optimales en Se_r R (87 % [75-94]) et Sp R (90,7 % [87,9-93,0]) ont été obtenues lorsque la valeur du seuil de positivité des résultats des R (calculés à partir de la formule de calcul "normalisée"), est de 0,03 (Figure II.1.8 et Tableau II.1.15).

N.B. : ce seuil décisionnel de 0,03 déterminé pour la formule "normalisée" de calcul des résultats des R (pour une utilisation du test IFN γ en série avec l'IDS) correspond à un seuil décisionnel de 0,07 (0,03 x 2,4) pour la formule "initiale" de calcul des résultats des R ($DO_R - DO_N$).

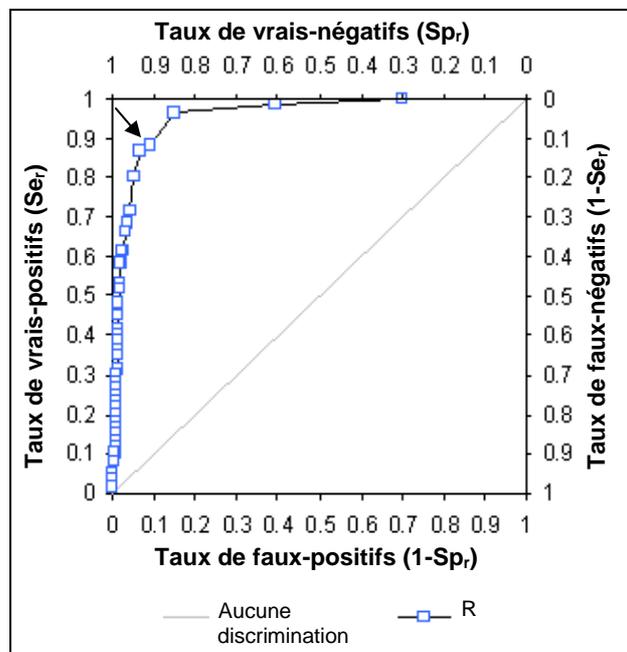


Figure II.1.8. Courbe ROC représentant la Se_r R (« taux de vrai-positifs » en R dans l'étude de la Se_r) en fonction de « $1-Sp_r$ R » (« taux de faux-positifs » en R dans l'étude de la Sp_r), obtenue pour différentes valeurs-seuils (de 0,00 à 1,70) (Faye S. *et al.*, sous presse). La flèche indique le seuil de positivité de 0,03 permettant d'obtenir une sensibilité relative et une spécificité absolue des R optimales.

II.2.2. Estimation des Se_r & Sp_r finales du test IFN γ aux seuils décisionnels déterminés pour des Se_r et Sp_r individuelles optimales

Les résultats finaux des études de Se_r et Sp_r du test IFN γ , obtenus à partir de l'association des résultats des PPD et R (résultats individuels de chaque étude respective, cf. Tableau II.1.15)

déterminés pour des valeurs de seuil de positivité de 0,05 et de 0,03 respectivement sont exposés dans le Tableau II.1.16.

De même, des estimations des Se_r et Sp_r finales du test IFN γ en suivant les deux méthodes différentes d'interprétation des résultats finaux (PPD \cap R et PPDUR) sont présentées dans ce tableau.

Tableau II.1.16. Résultats finaux de l'étude de la sensibilité relative (Se_r) (n=60) et de l'étude de la spécificité opérationnelle (Sp_r) (n=547) du test IFN γ , issus de l'association des résultats des PPD et des R obtenus pour des seuils de positivité de 0,05 et 0,03 respectivement ; Estimation de la Se_r et de la Sp_r finales à partir de deux méthodes d'interprétation des résultats finaux (Faye S. *et al.*, sous presse).

Nombre de	Résultats finaux	
	Etude de la Sp_r	Etude de la Se_r
POS	31	46
DIV	123	10
NEG	393	4
Méthode d'interprétation	Sp_r finale % [IC 95 %] (nombre d'animaux négatifs)	Se_r finale % [IC 95 %] (nombre d'animaux positifs)
PPD \cap R	94,3 % [92,0-96,1] (516)	77 % [64-87] (46)
PPDUR	71,8 % [67,9-75,6] (393)	93 % [84-98] (56)

Sp_r PPD \cap R : $1 - (POS \%) = (NEG + DIV) \%$; Sp_r PPDUR : $1 - [(POS + DIV) \%) = NEG \%$;

Se_r PPD \cap R : $POS \%$; Se_r PPDUR : $(POS + DIV) \%$

La Se_r PPD \cap R et la Se_r PPDUR obtenues du test IFN γ modifié (**dont l'analyse des résultats est basée sur des formules "normalisées" avec des seuils de 0,05 pour les PPD et de 0,03 pour les R) ont donc été estimées respectivement à 77 % [64-87] et 93 % [84-98] (Tableau II.1.16). De même, la Sp_r PPD \cap R et la Sp_r PPDUR obtenues du test IFN γ modifié** ont donc été estimées respectivement à 94,3 % [92,0-96,1] et 71,8 % [67,9-75,6] (Tableau II.1.16).

Discussion :

I. Validité de l'échantillonnage

I.1. Etude de la spécificité du test IFN γ modifié

L'échantillonnage des études de spécificité (spécificités absolue, Sp et opérationnelle, Sp_r) a été réalisé conditionnellement au statut connu des élevages indemnes. L'étude de spécificité absolue a été réalisée sur un nombre certes important de prélèvements (500 prévus, 492

finalement utilisables), mais limité d'élevages (25). Pour les causes de sensibilisation non spécifiques indépendantes des conditions épidémiologiques de l'élevage (et donc intervenant au niveau de l'animal), cette étude donne une bonne estimation. Pour des causes qui seraient liées aux conditions spécifiques des élevages, cette étude n'a qu'une portée limitée du fait du nombre réduit d'élevages étudiés.

Les conditions modulant la spécificité peuvent être très variables au plan géographique (prévalence des agents responsables de réactions non spécifiques, pratiques d'élevage pouvant moduler l'exposition des animaux à ces agents) ; il était donc indispensable de procéder à une étude devant permettre de refléter les conditions propres aux élevages de Dordogne, ce que nous avons fait (spécificité opérationnelle), en complément de la première étude réalisée (spécificité absolue). Toutefois, pour des raisons aisément compréhensibles, il ne nous était pas possible de procéder à cette étude dans la zone même où sont concentrés les élevages infectés. Nous pouvons cependant considérer que les résultats obtenus doivent être suffisamment représentatifs de la situation des élevages de Dordogne, et en particulier des zones infectées.

On peut se poser la question de la validité du classement des élevages étudiés : nous avons vérifié (au moment de la rédaction de ce chapitre) qu'ils étaient bien restés indemnes. Le risque d'erreur de ce classement se renforcera avec le temps, mais on voit bien qu'il est faible, puisqu'il est limité à la valeur du taux d'incidence, qui, heureusement est faible.

I.2. Etude de la sensibilité du test IFN γ modifié

L'échantillonnage de l'étude de sensibilité (Se_T) a été réalisé de façon rétrospective, à partir des résultats disponibles dans notre laboratoire, concernant des animaux qui ont permis l'isolement de *M. bovis*, qui ont donc présenté des lésions. L'historique des ces animaux a montré qu'ils avaient en fait été envoyés à l'abattoir dans le cadre d'une procédure d'abattage diagnostique, c'est-à-dire dans le but de rechercher des lésions éventuelles et dans ce cas, de réaliser les prélèvements devant permettre la confirmation du diagnostic.

Ces animaux ne constituent par conséquent qu'une partie du flux des animaux ayant subi une IDS, puis un test IFN γ et enfin un abattage diagnostique. On peut être en droit de se demander si cette procédure particulière d'échantillonnage soumise à toute une série de conditions successives, dont une seule catégorie nous est parvenue, n'est pas de nature à altérer la valeur de nos résultats : sous estimation, sur estimation ?

Une chose est sûre : nos résultats permettent de comparer les différentes modalités du test IFN γ entre elles. Nos travaux permettent donc de conclure sur leurs valeurs relatives.

Le fait que tous les animaux étudiés aient été trouvés porteurs de lésions constitue certainement un biais très important, car on sait bien que de nombreux animaux infectés peuvent ne pas présenter de lésion tuberculeuse. Or, la question de la sensibilité du test IFN γ , même conditionnellement à l'IDS non-négative, reste posée également pour les animaux non porteurs de lésion tuberculeuse macroscopique.

Parmi les animaux à la fois non-négatifs à l'IDS et positifs au test IFN γ qui n'ont pas présenté de lésion suspecte à l'abattoir, et n'ont donc pas fait l'objet d'un prélèvement, il est probable qu'un certain nombre soit toutefois infecté. Ceci constitue même un des avantages du test IFN γ qui est de révéler de façon très précoce des animaux infectés, bien avant la présence de lésions détectables par observation macroscopique.

Pour s'en assurer, il conviendrait de procéder à un échantillonnage systématique sur de tels animaux (prélèvement d'une série de ganglions, même en l'absence de lésion visible) en vue de l'analyse PCR MTBC^{*}. Ce biais est de nature à sous-estimer la sensibilité du test IFN γ .

Pour les animaux ayant présenté des lésions suspectes mais n'ayant pas permis l'isolement de *M. bovis*, l'interprétation est similaire.

Cette étude complémentaire permettrait d'en apprécier la fréquence, que nous pensons malgré tout limitée. La valeur de nos indicateurs aurait plutôt tendance à légèrement sous-estimer les valeurs réelles, et de ce fait, ce biais n'est pas de nature à remettre en question nos conclusions, sur un plan pragmatique.

En revanche, nos résultats ne pourraient pas être utilisés tels quels pour une modélisation bien que les types d'études réalisées ressemblent à celles présentées dans la littérature.

* Ce procédé est déjà réalisé à titre expérimental depuis plus d'un an et quelques animaux abattus à des fins diagnostiques (avec une IDS non-négative, un test IFN γ positif et une IDC non-négative) mais finalement sans lésion macroscopique ont été confirmés infectés par bactériologie (et PCR MTBC).

II. Comparaison des sensibilités et spécificités individuelles et finales du test obtenues avec les deux modes de calcul et pour deux seuils différents selon ses différentes conditions d'utilisation

II.1. Application du test IFN γ dans la population générale

II.1.1. Sensibilités relatives et spécificités absolues individuelles

Concernant les résultats de sensibilités relatives et spécificités absolues individuelles obtenus avec le mode de calcul initial associé à un seuil haut (recommandé par Bovigam[®]), les Se_r PPD et Se_r R ont été estimées à 85 % et 80 % respectivement et les Sp PPD et Sp R ont été estimées à 99,4 % pour les deux.

L'analyse de la littérature concernée permet de disposer d'un aperçu des différentes valeurs de sensibilité et spécificité individuelles obtenues pour des conditions d'application du test et pour des méthodes d'analyse des résultats individuels différentes, dans plusieurs pays.

En effet, Aagaard C. et ses collègues (2006) ont estimé les Se PPD et Se R à 66 % et 85 % respectivement et, les Sp PPD et Sp R à 84 % et 97 % respectivement.

Au contraire, Vordermeier H.M. et ses collaborateurs (2001) ont obtenu une meilleure spécificité des R (Sp R de 100 %) mais une moins bonne sensibilité (Se R de 77,9 %). Néanmoins, Vordermeier H.M. et Ewer K. ont présenté en 2006, une Sp R identique à celle exposée par Aagaard C. *et al.* (2006) mais une meilleure Sp PPD (96,7 %).

Nous avons donc obtenu d'une part, des valeurs de spécificité absolue (Sp R) et sensibilité (Se_r R) des R relativement proches de celles publiées par Vordermeier H.M. et ses collaborateurs (2001) et d'autre part, des valeurs de spécificité absolue (Sp PPD) et sensibilité (Se_r PPD) des PPD semblables à celles de Wood P.R. *et al.* (1992) et Cockle P.J. *et al.* (2006) et, Gonzalez Llamazares O.R. *et al.* (1999) respectivement (Cf. Tableau I.1.3)

Par ailleurs, comme les résultats des études de spécificité absolue et de sensibilité relative, ont montré qu'il n'existait pas de différence significative de Sp et de Se_r individuelles entre les deux types de calcul, ce constat permet alors de supporter la décision d'utiliser le mode de calcul normalisé établi selon les recommandations de l'AFNOR, ce qui permet ainsi une meilleure reproductibilité des analyses et donc d'obtenir des résultats comparables intra et inter laboratoires.

De plus, le choix d'un seuil bas de 0,02 permet d'améliorer distinctement les sensibilités individuelles (Se_r PPD de 93 % et Se_r R de 88 %) sans trop réduire leurs spécificités (Sp PPD de 98,0 % et Sp R de 98,6 %). En effet, cela apporte un gain de Se_r PPD de 10 % et de Se_r R de 8 % et seulement une perte de Sp PPD de 1,4 % et de Sp R de 0,8 %.

Ces valeurs de spécificité absolue (Sp R) et sensibilité (Se_r R) des R sont donc très proches de celles publiées par Aagaard C. *et al.* (2006) et par Vordermeier H.M. et Ewer K. (2006a) et Cockle P.J. *et al.* (2006) (pour la spécificité seulement). De même, les valeurs de spécificité absolue (Sp PPD) et de sensibilité (Se_r PPD) des PPD sont semblables à celles diffusées par Wood P.R. *et al.* (1991) (Se_r PPD de 93,6 % et Sp R de 98,1 %, (Cf. Tableau I.1.3). De plus, la valeur de Sp PPD est proche de celle obtenue par Cagiola M. *et al.* (2004) et Vordermeier H.M. et Ewer K. (2006a) et la valeur de Se_r PPD est voisine de celle obtenue par Buddle B.M. *et al.* (2001 et 2003) (Cf. Tableaux I.1.3 et I.1.4)

Par conséquent, il serait intéressant d'utiliser le seuil de positivité bas lorsque le test IFN γ est appliqué dans la population générale.

II.1.2. Sensibilité relative et spécificité absolue finales du test

La sensibilité relative et la spécificité absolue finales du test ont été évaluées selon deux méthodes d'interprétation des résultats finaux c'est-à-dire en considérant les résultats positifs et divergents comme positifs (PPDUR) ou seulement les résultats positifs (PPD \cap R).

II.1.2.1. Méthode d'interprétation PPD \cap R

La spécificité absolue PPD \cap R est estimée à 100 % quel que soit le mode de calcul et le seuil choisi. Cette valeur est supérieure à celles publiées par Vordermeier H.M. *et al.* (2006a) (99,2 %) et Coad M. *et al.* (2008) (98,7 %). La sensibilité relative PPD \cap R est estimée à 73 % pour le mode de calcul initial associé au seuil haut. Cette valeur est également supérieure à celle publiée par Coad M. *et al.* (2008) (55 %). Toutefois, la sensibilité relative PPD \cap R est meilleure au seuil bas : soit de 85 % pour le mode de calcul normalisé et de 90 % mode de calcul initial. Ainsi, l'utilisation du mode de calcul normalisé n'affecte donc pas la Sp PPD \cap R mais occasionne une diminution, bien que non-significative, de la Se_r PPD \cap R.

Cela permet donc de confirmer qu'il est préférable d'utiliser le mode de calcul normalisé associé à un seuil décisionnel bas (0,02) pour une application du test IFN γ dans la population générale.

II.1.2.2. Méthode d'interprétation PPDUR

L'utilisation du mode de calcul initial associé à un seuil haut, recommandé par Bovigam[®], permet d'obtenir une spécificité absolue PPDUR de 98,8 % qui est identique à celle obtenue avec le mode de calcul normalisé. Cette valeur est supérieure à celles publiées par Vordermeier H.M. *et al.* (2006a) (94,6 %) et Coad M. *et al.* (2008) (81,2 %).

De plus, la sensibilité relative PPDUR obtenue (92 %) qui est également supérieure à celle publiée par Coad M. *et al.* (2008) (81,2 %) est non-significativement différente de celle obtenue avec le mode de calcul normalisé (90 %).

Si un seuil de positivité plus bas est appliqué, la Se_r PPDUR est alors estimée à 97 % pour les deux modes de calcul et la Sp PPDUR est évaluée à 96,5 % pour le mode de calcul normalisé et à 96,1 % pour l'autre mode de calcul.

L'utilisation du mode de calcul normalisé n'a donc pas d'incidence significative sur les qualités du test. De plus, le choix d'un seuil bas de 0,02 assure un gain de sensibilité de 7 % mais une perte de spécificité de 2,3 %.

Cela permet encore de confirmer qu'il est préférable d'utiliser le mode de calcul normalisé associé à un seuil décisionnel bas (0,02) pour une application du test IFN γ dans la population générale.

II.2. Application du test IFN γ sur des animaux avec une IDS non-négative

II.2.1. Sensibilités relatives et spécificités opérationnelles individuelles

Concernant les résultats de spécificités opérationnelles individuelles obtenus avec le mode de calcul initial associé à un seuil haut (recommandé par Bovigam[®]), les Sp_r PPD et Sp_r R ont été estimées à 72,9 % et 92,7 % respectivement.

Comme les résultats des études de spécificité opérationnelle et de sensibilité relative ont montré qu'il n'existait pas de différence significative de Sp_r et Se_r individuelles entre les deux types de calcul, ce constat permet également de supporter la décision d'utiliser le mode de calcul normalisé.

De plus, le choix d'un seuil haut de 0,04 par rapport à un seuil bas (0,02), permet d'améliorer les spécificités opérationnelles individuelles et ainsi de disposer d'une Sp_r R satisfaisante (93,1 %) et d'une Sp_r PPD convenable (73,3 %), et engendre une réduction des sensibilités individuelles qui restent néanmoins acceptables (Se_r R de 80 % et Se_r PPD de 83 %).

Par conséquent, il serait intéressant d'utiliser le seuil de positivité haut lorsque le test IFN γ est appliqué sur des animaux avec une IDS non-négative, en population sans risque spécifique identifié.

En outre, ces résultats montrent que les R sont significativement plus spécifiques que les PPD, comme l'indique la littérature (Van Pinxteren L.A.H. *et al.*, 2000; Buddle B.M. *et al.*, 2001, 2003, 2009; Vordermeier H.M. *et al.*, 2001, 2006a; Wood P.R. *et al.*, 2001 ; Aagaard C. *et al.*, 2006; De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006a; Coad M. *et al.*, 2008).

II.2.2. Sensibilité relative et spécificité opérationnelle finales du test

La spécificité opérationnelle finale du test a été évaluée en procédant de même que pour l'évaluation de sa sensibilité relative (indiquée précédemment, § I.1.2.), c'est-à-dire selon les deux méthodes différentes d'interprétation des résultats finaux (PPDUR et PPD \cap R).

II.2.2.1. Méthode d'interprétation PPDUR

L'utilisation du mode de calcul initial associé à un seuil haut, recommandé par Bovigam[®], permet d'obtenir une sensibilité relative PPDUR satisfaisante (92 %) et supérieure, bien que non-significativement différente, à celle obtenue avec le mode de calcul normalisé (90 %) mais une spécificité opérationnelle PPDUR médiocre (70,2 %) et quasi-identique à celle obtenue avec le mode de calcul normalisé (70,9 %). Toutefois, comme la sensibilité du test est relativement bonne avec cette méthode d'interprétation PPDUR, alors on peut considérer que dans un contexte précis c'est-à-dire où l'on souhaite privilégier la sensibilité du test (utilisation de la méthode PPDUR), cette valeur de spécificité est finalement acceptable.

Si un seuil de positivité plus bas est appliqué, la Se_r PPDUR est alors meilleure, avec des valeurs identiques pour les deux modes de calcul (97 %), alors que la Sp_r PPDUR est encore plus médiocre, avec une valeur supérieure (écart non-significatif) pour le mode de calcul normalisé (60,1 %) par rapport à l'autre mode de calcul (54,3 %).

L'utilisation du mode de calcul normalisé n'a donc pas d'incidence significative sur les qualités du test. De plus, le choix d'un seuil haut de 0,04 assure un gain de spécificité opérationnelle de 10,8 % afin qu'elle devienne acceptable mais engendre une perte de sensibilité relative de 7 % qui reste toutefois, satisfaisante.

Cela permet de confirmer qu'il est préférable d'utiliser le mode de calcul normalisé, associé à un seuil décisionnel haut (0,04) pour une application du test IFN γ sur une population d'IDS non-négatives.

II.2.2.2. Méthode d'interprétation PPD \cap R

L'utilisation du mode de calcul initial associé à un seuil haut, recommandé par Bovigam[®], permet d'obtenir une spécificité opérationnelle PPD \cap R satisfaisante (95,4 %) et une sensibilité relative PPD \cap R convenable (73 %). Ces valeurs sont identiques à celles obtenues avec le mode de calcul normalisé.

Ainsi, les résultats obtenus montrent que l'utilisation des R permet d'améliorer significativement la spécificité opérationnelle du test IFN γ (Sp_r du test Bovigam[®] de 72,9 % (Sp_r PPD); Sp_r du test Bovigam[®] modifié de 95,4 % (Sp_r PPD \cap R)), comme cela a déjà été démontré dans la littérature (concernant la spécificité absolue) (Vordermeier H.M. *et al.*, 2006a, Sp PPD de 96,7 % et Sp PPD \cap R de 99,2 %).

Si un seuil de positivité plus bas est appliqué, la Se_r PPD \cap R est alors estimée à 90 % et 85 % pour les modes de calcul initial et normalisé respectivement (écart non-significatif) et, la Sp_r PPD \cap R est évaluée à 88,3 % et 91,2 % pour les mêmes modes de calcul respectifs (écart non-significatif).

L'utilisation du mode de calcul normalisé n'a donc pas d'incidence significative sur les qualités du test. Par ailleurs, le choix d'un seuil bas de 0,02 entraîne une perte de Sp_r PPD \cap R de 4,2 % et un gain de Se_r PPD \cap R de 12 %. Toutefois, lors de l'évaluation des Se_r et Sp_r individuelles et des Se_r PPDUR et Sp_r PPDUR, le seuil haut semblait le plus adapté afin de minimiser la baisse de spécificité due à une application du test sur une population avec une IDS non-négative (spécificité opérationnelle) par rapport à la spécificité obtenue pour une application du test dans la population générale (spécificité absolue).

Par conséquent, il est envisageable d'utiliser le mode de calcul normalisé, associé à un seuil décisionnel haut (0,04) pour une application du test IFN γ sur une population d'IDS non-négatives.

II.3. Conclusion de l'étude comparative entre 2 modes de calcul avec 2 seuils différents

Ce travail a donc permis de montrer que l'utilisation du mode de calcul normalisé n'affectait ni la sensibilité relative (Se_r) du test et ni sa spécificité absolue (Sp) quel que soit le seuil décisionnel, lorsque le test est appliqué dans la population générale (en parallèle avec l'IDS).

De même, l'utilisation de ce mode de calcul associé à un seuil décisionnel haut, permet d'augmenter, quoique non-significativement prouvé, la spécificité opérationnelle (Sp_r) du test sans en affecter sa sensibilité relative (Se_r), lorsque le test est employé dans la population d'IDS non-négatives (en série avec l'IDS).

Par ailleurs, le choix du seuil de positivité des résultats individuels calculés à partir des formules normalisées est déterminant et dépend également des conditions d'utilisation du test.

En effet, le seuil bas de 0,02 semble être le plus adapté pour une utilisation du test dans la population générale puisqu'il permet d'obtenir, dans le cas de la méthode PPDUR pour l'interprétation des résultats finaux, des valeurs comparables et excellentes de spécificité absolue (96,5 %) et sensibilité relative (97 %) du test. Dans le cas de la méthode d'interprétation PPD \cap R, ce seuil permet d'assurer une spécificité absolue excellente (100 %) et sa sensibilité relative est satisfaisante (85 %).

Au contraire, quand le test est appliqué sur des animaux avec une IDS non-négative, il devient moins spécifique (spécificité opérationnelle inférieure à la spécificité absolue). Il s'avère alors nécessaire d'utiliser un seuil plus haut afin de minimiser cette baisse de spécificité opérationnelle. Toutefois, cela conduit à une réduction de la sensibilité relative du test.

Le seuil haut de 0,04 permet ainsi d'assurer, dans le cas de la méthode d'interprétation PPD \cap R, une spécificité opérationnelle (95,4 %) excellente et une sensibilité relative (73 %) convenable. Dans le cas de la méthode d'interprétation PPDUR, ce seuil permet d'obtenir une sensibilité relative satisfaisante (90 %) et une spécificité opérationnelle convenable (70,9 %).

Par conséquent, comme il a été précédemment décrit par certains auteurs (Rothel J.S. *et al.*, 1990 ; Wood P.R. *et al.*, 1991, 2001; Ryan T.J. *et al.*, 2000 ; Gormley E. *et al.*, 2005), le test Bovigam[®] apparaît être un outil complémentaire très utile pour la détection de la Tb pour des régions à faible prévalence, d'autant plus quand le test est utilisé avec des antigènes spécifiques selon un protocole adapté.

En outre, étant donné que les R sont plus spécifiques que les PPD, il serait alors intéressant de disposer de valeurs différentes de seuils de positivité des résultats individuels calculés avec les formules normalisées des PPD et des R. Les valeurs de ces seuils devraient être ajustées pour des valeurs optimales de sensibilité et de spécificité individuelles (des PPD et des R).

Ainsi, il conviendrait, selon les conditions d'utilisation du test (en parallèle ou en série avec l'IDS), d'établir les courbes ROC des PPD et des R afin de déterminer les meilleures valeurs de sensibilité relative et spécificité des PPD et des R et enfin, en déduire les valeurs des seuils décisionnels correspondants.

III. Evaluation des valeurs de sensibilité & spécificité individuelles optimales permettant de déterminer des seuils décisionnels pour le mode de calcul normalisé et ainsi d'estimer les qualités finales du test IFN γ modifié pour les deux méthodes d'interprétation, selon les conditions d'utilisation du test

III.1. Application du test IFN γ modifié dans la population générale

Les combinaisons des résultats des sensibilités relatives individuelles (Se_r PPD et Se_r R) avec les résultats des spécificités absolues individuelles (Sp PPD et Sp R) ont permis de déterminer des valeurs de seuils de positivité, pour les résultats des PPD et des R obtenus avec la formule normalisée, pour lesquelles les valeurs des Se_r et Sp correspondantes sont optimales.

Ainsi, la valeur du seuil décisionnel des PPD est estimée à 0,02 pour une Se_r PPD de 93 % [84-98] et une Sp PPD de 98,0 % [96,3-99,0] alors que la valeur du seuil décisionnel des R est estimée à 0,01 pour une Se_r R de 97 % [89-100] et une Sp R de 95,9 % [93,8-97,5] (Tableau II.1.13). Pour une application du test IFN γ modifié dans la population générale, les résultats obtenus montrent donc que la spécificité des R, bien que satisfaisante est inférieure à celle des PPD. A l'inverse, la sensibilité des PPD bien qu'également satisfaisante, est inférieure à celle des R.

Ensuite, les résultats finaux des deux études (sensibilité relative et spécificité absolue du test), c'est-à-dire les résultats issus de l'association des résultats des PPD et des R obtenus pour des seuils de positivité de 0,02 et 0,01 respectivement, ont permis d'évaluer la sensibilité relative et la spécificité absolue du test selon les deux méthodes d'interprétation des résultats finaux (PPD \cup R et PPD \cap R).

Ainsi, avec la méthode d'interprétation PPD \cap R, la sensibilité relative et la spécificité absolue du test IFN γ modifié ont été estimées à 90 % [82-98] et 100 % [99,2-100] respectivement (Tableau II.1.14), pour les valeurs de seuils décisionnels préalablement établis (0,01 pour les R & 0,02 pour les PPD) pour un contexte de faible prévalence de Tb et une application du test dans la population générale, en l'absence de réaction non-spécifique.

Avec la méthode d'interprétation PPDUR, la sensibilité relative et la spécificité absolue du test IFN γ modifié ont été estimées à 100 % [95-100] et 93,9 % [91,4-95,8] respectivement (Tableau II.1.14).

Nous pouvons alors proposer d'interpréter différemment les résultats finaux du test en fonction du contexte épidémiologique rencontré (favorable ou défavorable).

Un animal dans un contexte défavorable correspond à un animal appartenant à un cheptel anciennement infecté (risque de résurgence) et/ou nouvellement infecté et/ou lié épidémiologiquement à un autre cheptel reconnu infecté de Tb.

A l'inverse, un animal dans un contexte favorable correspond à un animal appartenant à un cheptel considéré comme indemne de Tb depuis plusieurs années et ne présentant aucun lien épidémiologique avec un cheptel infecté ou bien un cheptel provenant d'une zone indemne de Tb.

Ainsi, dans le cas d'animaux dans un contexte défavorable, la sensibilité du test doit être privilégiée par rapport à sa spécificité. Il est alors préférable de choisir le procédé d'interprétation PPDUR. Avec cette méthode, la sensibilité du test est donc excellente (Se_r PPDUR de 100 %) et sa spécificité est satisfaisante (Sp PPDUR de 93,9 %).

Au contraire, dans le cas d'animaux dans un contexte favorable, la spécificité du test doit être privilégiée par rapport à sa sensibilité. Alors, le procédé d'interprétation PPD \cap R serait le plus approprié. Avec cette méthode, la spécificité du test est donc excellente (Sp PPD \cap R de 100 %) et sa sensibilité est satisfaisante (Se_r PPD \cap R de 90 %). D'autant que dans ce contexte favorable, la question posée concerne l'élevage, pour lequel on peut disposer de plusieurs prélèvements : or, on sait que la sensibilité « troupeau » est bien meilleure que la sensibilité individuelle. Dans ces conditions, le choix de privilégier la spécificité aux dépens de la sensibilité peut être assumée par le gain de sensibilité collective.

Cependant, comme le test IFN γ modifié a été largement utilisé après une IDS non-négative, nous avons donc étudié la spécificité opérationnelle du test (Sp_r).

III.2. Application du test IFN γ sur des animaux avec une IDS non-négative

Dans cette population avec une IDS non-négative, les spécificités opérationnelles des PPD et des R, aux seuils respectifs de 0,02 et 0,01, sont respectivement de 66,5 % (Sp_r PPD inférieure de 31,5 % à Sp PPD) et 60,9 % (Sp_r R inférieure de 35,0 % à Sp R)

(Tableaux II.1.13 et II.1.15). De plus, sa spécificité finale, à ces seuils, est de 62,9 % pour la méthode d'interprétation $PPD \cap R$ (Sp_r $PPD \cap R$ inférieure de 37,1 % à Sp $PPD \cap R$) et de 45,2 % pour l'autre méthode (Sp_r $PPDUR$ inférieure de 48,7 % à Sp $PPDUR$).

Cette perte importante de spécificité nécessite donc un réajustement des valeurs des seuils décisionnels afin d'améliorer les spécificités opérationnelles individuelles et subséquentement la spécificité opérationnelle finale. Néanmoins, cela va inévitablement engendrer une diminution des sensibilités individuelles et subséquentement de la sensibilité finale.

Les combinaisons des résultats des sensibilités relatives individuelles (Se_r PPD et Se_r R) avec les résultats des spécificités opérationnelles individuelles (Sp_r PPD et Sp_r R) ont donc permis de déterminer des valeurs de seuils de positivité, pour les résultats des PPD et des R obtenus avec la formule normalisée, pour lesquelles les valeurs des Se_r et Sp_r correspondantes sont optimales.

Ainsi, la valeur du seuil décisionnel des PPD est estimée à 0,05 pour une Se_r PPD de 83 % [72-92] et une Sp_r PPD de 75,5 % [71,7-79,0] alors que la valeur du seuil décisionnel des R est estimée à 0,03 pour une Se_r R de 87 % [75-94] et une Sp_r R de 90,7 % [87,9-93,0] (Tableau II.1.15). Les pertes de sensibilités individuelles sont donc de 10 % et les pertes de spécificités individuelles (opérationnelles par rapport à absolues) dues à l'application du test dans une population d'IDS non-négatives sont largement minimisées par l'adaptation des valeurs seuils de positivité (0,05 au lieu de 0,02 pour les PPD et 0,03 au lieu de 0,01 pour les R). Cet effet est plus important pour les PPD (22,5 %) que pour les R (5,2 %). Pour une application du test IFN γ modifié dans une population d'IDS non-négatives, les résultats obtenus montrent donc que la spécificité des PPD , bien qu'encore acceptable, est faible et significativement inférieure à celle des R . De même, la sensibilité des PPD bien que convenable, est inférieure à celle des R .

Ensuite, les résultats finaux des deux études (sensibilité relative et spécificité opérationnelle du test), c'est-à-dire les résultats issus de l'association des résultats des PPD et des R obtenus pour des seuils de positivité de 0,05 et 0,03 respectivement, ont permis d'évaluer la sensibilité relative et la spécificité opérationnelle du test selon les deux méthodes d'interprétation des résultats finaux ($PPDUR$ et $PPD \cap R$).

Ainsi, avec la méthode d'interprétation $PPD \cap R$, la sensibilité relative et la spécificité opérationnelle du test IFN γ modifié ont été estimées à 77 % [64-87] et 94,3 % [92,0-96,1]

respectivement (Tableau II.1.16), pour les valeurs de seuils décisionnels préalablement établis (0,03 pour les R & 0,05 pour les PPD) pour un contexte de faible prévalence de Tb, en milieu présentant peu de réactions non-spécifiques et une application du test dans une population d'IDS non-négatives. La perte de sensibilité du test est alors de 7 % tandis que la perte de spécificité (opérationnelle par rapport à absolue) due à l'application du test dans ce contexte, n'est plus que de 22,7 %.

Avec la méthode d'interprétation PPDUR, la sensibilité relative et la spécificité opérationnelle du test IFN γ modifié ont été estimées à 93 % [84-98] et 71,8 % [67,9-75,6] respectivement (Tableau II.1.16). La perte de sensibilité du test est alors de 13 % tandis que la perte de spécificité due à l'application du test dans ce contexte, n'est plus que de 5,7 %.

Par conséquent, dans un contexte défavorable, le procédé d'interprétation PPDUR permettrait une bonne sensibilité (Se_r PPDUR de 93 %) et une spécificité acceptable (Sp_r PPDUR de 71,8 %). Au contraire, dans un contexte favorable, le procédé d'interprétation PPD \cap R permettrait à une spécificité satisfaisante (94,3 %) et une sensibilité convenable (77 %).

En résumé, les valeurs de sensibilité et spécificité individuelles dépendent des conditions d'application du test sur le terrain (population totale ou seulement d'IDS non-négatives). Par conséquent, les valeurs de leurs seuils décisionnels correspondants varient selon les mêmes conditions. En effet, Buddle B.M. *et al.* (2009) ont proposé un seuil décisionnel pour les PPD plus bas (0,07 au lieu de 0,10) lorsque le test est utilisé en parallèle à l'IDS.

Subséquentement au choix des valeurs des seuils décisionnels, les valeurs de sensibilité et spécificité finale du test dépendent de la méthode d'interprétation des résultats finaux (méthodes PPD \cap R ou PPDUR) sélectionnée selon le contexte épidémiologique rencontré (favorable ou défavorable).

Conclusion :

A partir des résultats de la première étude, nous pouvons conclure qu'il est préférable d'utiliser pour ce test IFN γ Bovigam[®] modifié, un mode de calcul normalisé prenant en compte les variations d'absorbances liées aux conditions de l'analyse, comme le recommande la norme NF-U 47 019, afin que les résultats des analyses soient plus reproductibles et donc puissent être plus comparables intra et inter laboratoires.

De plus, pour une application du test dans la population générale, il est nécessaire de choisir un seuil décisionnel plus bas que le seuil redéfini pour le mode de calcul normalisé (redéfini par rapport au seuil proposé par Bovigam[®]). De surcroît, il est indispensable d'ajuster les valeurs des seuils de positivité des résultats individuels, calculés à partir des formules normalisées des PPD et des R, pour obtenir des valeurs optimales de sensibilité et de spécificité individuelles, comme le recommande l'OIE.

Ainsi, la seconde étude a permis de fixer les valeurs des seuils décisionnels à 0,02 et 0,01, pour les résultats des PPD et des R respectivement calculés avec les formules normalisées, pour une application du test IFN γ Bovigam[®] modifié, dans la population générale d'une région à faible à prévalence de Tb et en l'absence de réaction atypique (Tableau II.1.17).

Concernant son application dans la population d'animaux avec une IDS non-négative issue d'une région à faible à prévalence de Tb et où des réactions atypiques sont possibles, les valeurs des seuils ont alors été fixées à 0,05 et 0,03, pour les PPD et les R respectivement. Pour ces valeurs-seuils, les valeurs de sensibilité et de spécificité du test sont estimées respectivement dans un contexte épidémiologique défavorable à 93 % [84-98] et 71,8 % [67,9-75,6] (en suivant la méthode PPDUR), et dans un contexte épidémiologique favorable à 77 % [64-87] et 94,3 % [92,0-96,1] (en suivant la méthode PPD \cap R), (Tableau II.1.17).

Tableau II.1.17. Synthèse des principales recommandations pour une utilisation appropriée du test IFN γ modifié en région à faible prévalence de Tb et présentant pas* ou peu** de réactions non-spécifiques (Dordogne).

Application du test IFN γ modifié dans la population...	Valeurs de seuils décisionnels des formules "normalisées"		Contexte épidémiologique	Méthode d'interprétation des résultats finaux	Résultats finaux % [IC 95 %]	
	PPD	R			Spécificité finale	Sensibilité finale
générale*	0,02	0,01	Favorable	PPD \cap R	<u>100 %</u> [99,2-100]	90 % [82-98]
			Défavorable	PPDUR	93,9 % [91,4-95,8]	<u>100 %</u> [95-100]
d'IDS non-négative**	0,05	0,03	Favorable	PPD \cap R	<u>94,3 %</u> [92,0-96,1]	77 % [64-87]
			Défavorable	PPDUR	71,8 % [67,9-75,6]	<u>93 %</u> [84-98]

En conclusion, le test IFN γ modifié n'est pas parfait. Néanmoins, sa complémentarité vis-à-vis de l'IDS en fait un atout indéniable qui justifie notre étude mais, il faut souligner que ce test ne saurait remplacer purement et simplement tout autre dispositif.

L'adaptation des critères d'analyse aux statuts infectieux régional d'une part, c'est-à-dire une région avec une prévalence de Tb faible ou forte, des réactions non-spécifiques rares ou fréquentes (...) et aux conditions d'application du test d'autre part, c'est-à-dire pour un dépistage dans la population générale en parallèle à l'IDS ou pour une confirmation de résultats non-négatifs en IDS (...), est essentielle pour une utilisation appropriée de ce test IFN γ modifié.

Ainsi, en fonction du statut infectieux de la région étudiée et des conditions d'application du test IFN γ modifié, il est nécessaire d'étudier les sensibilités et spécificités individuelles (des PPD et des R) en fonction des seuils décisionnels afin de définir les valeurs-seuils des PPD et des R pour lesquelles les valeurs de sensibilité et de spécificité sont optimales. Ensuite, la méthode d'interprétation des résultats PPDUR doit être choisie quand une estimation élevée du risque de Tb est établie, (c'est à dire dans un contexte épidémiologique défavorable). Au contraire, la méthode d'interprétation des résultats $PPD \cap R$ est à choisir de préférence pour une estimation faible du risque de Tb, (c'est-à-dire dans un contexte épidémiologique favorable).

Chapitre 2 :

Un test PCR *IS6110* en temps réel

pour renforcer la lutte contre la Tuberculose bovine

Introduction :

Mise en place d'un test PCR IS6110 en temps réel en Dordogne

Le test PCR IS6110 en temps réel, kit TaqVet[®] MTBC de LSI, est utilisé à titre expérimental en Dordogne depuis 2006.

En effet, il permet de compléter le diagnostic règlementaire basé sur l'histologie et la bactériologie. Cependant, les résultats de la PCR ne pouvaient alors être pris en compte dans la décision sanitaire, car ce test ne figurait pas dans les textes réglementaires et l'évaluation de ses performances (analytiques et diagnostiques) n'était que partielle (Figures II.1.3 et II.1.4).

Ainsi, l'objectif du travail exposé dans ce chapitre a été d'évaluer la sensibilité et la spécificité analytiques de ce test PCR IS6110 en temps réel. Cependant, cette approche analytique n'étant pas suffisante pour valider l'intégration du test dans les séquences diagnostiques opérationnelles de la Tb, il a fallu impérativement disposer d'éléments de confirmation sur le terrain. En effet, l'évaluation de la sensibilité et la spécificité diagnostiques de cette méthode PCR par comparaison aux techniques officielles de diagnostic de la Tb (histologie et bactériologie) devait permettre de déterminer si l'utilisation de cette méthode en complément des tests officiels pouvait améliorer le diagnostic de la Tb.

Les études de sensibilité et spécificité analytiques sont exposées dans le sous-chapitre 1 et celles de sensibilité et spécificité diagnostiques sont présentées dans le sous-chapitre 2.

Sous-Chapitre 1 :

Etude analytique du test PCR IS6110 en temps réel utilisé en Dordogne

Comme nous l'avons présenté dans la première partie de ce manuscrit, le kit PCR TaqVet[®] MTBC a été développé afin de permettre l'amplification et la détection exclusives d'un fragment de la séquence d'insertion IS6110 à l'aide d'un couple amorces et sonde Taqman[®] spécifiques. Sachant que l'IS6110 est rapportée comme présente uniquement dans le génome de toutes les mycobactéries du MTBC, il était nécessaire de vérifier la capacité de détection par ce test PCR de ces bactéries, c'est-à-dire sa sensibilité analytique.

La spécificité analytique d'un test PCR est sa capacité à distinguer de manière univoque l'agent cible d'autres agents proches génétiquement de la cible d'intérêt et/ou se trouvant dans le domaine d'application. Par conséquent, l'étude de la spécificité analytique du test a également été effectuée afin de vérifier s'il ne permettait pas l'amplification et la détection de bactéries autres que celles présentes dans le MTBC qui présenteraient une séquence analogue ou proche de la cible génétique IS6110.

Matériels et Méthodes

I. Description des échantillons pour les études de sensibilité et spécificité analytiques du test PCR IS6110

I.1. Etude de la sensibilité analytique du test PCR IS6110

Pour vérifier la sensibilité analytique du test PCR IS6110, les ADN des espèces bactériennes incluses dans le MTBC, présentant une concentration faible de 100 fg/μl, ont été analysés avec ce test.

Cette concentration correspond à 105 copies d'IS6110 pour *M. bovis* monocopie étudiée (Cf. Annexes XII et XIII), comme le recommande la norme AFNOR NF T 90-471 – relative à la détection et la quantification des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel – (AFNOR, 2010)). Nous avons tenu compte de cette norme car elle est à ce jour la seule norme AFNOR diffusée traitant de la technique PCR. En effet, au moment de la rédaction de ce manuscrit, la normalisation (AFNOR) de la technique PCR employée en santé animale

n'était encore qu'en projet (rédaction) (PR NF U 47-600 relative à la « Guide de bonnes pratiques pour la mise en œuvre de la PCR en biologie vétérinaire »).

Les mycobactéries du MTBC testées ont été les suivantes : *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. africanum* (souches sauvages caractérisées par l'Afssa par PCR RFLP (Annexe IV)) et *M. tuberculosis* (souche ATCC 27294). *M. canetti* n'était pas disponible.

I.2. Etude de la spécificité analytique du test PCR IS6110

Bien que la spécificité du couple amorces et sonde ait été auparavant vérifiée *in silico* par la société LSI, à partir du logiciel d'alignement de séquences NCBI BLAST, il était cependant nécessaire d'évaluer la spécificité analytique de ce test à partir de l'analyse d'ADN de bactéries (isolées) autres que celles présentes dans le MTBC.

I.2.1. Mycobactéries n'appartenant pas au MTBC

La liste des mycobactéries excluant celles appartenant au MTBC, à tester a été établie à partir d'une analyse approfondie de la littérature (Tableau II.2.1).

En effet, Jordao Junior C.M. et ses collègues ont démontré en 2009 la présence de mycobactéries non tuberculeuses (MNT) (*M. simiae*, *M. kansasii*, *M. flavescens*, *M. gordonae*) dans le lait cru de buffle d'eau, au Brésil. Ils ont également montré que ces résultats étaient en accord avec des publications antérieures, par exemples de Leite C.Q.F. *et al.* en 2003 (*M. fortuitum*, *M. marinum*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, identifiées dans des échantillons de lait (pasteurisé ou non) au Brésil), de Konuk M. *et al.* en 2007 (lait bovin pasteurisé ou non au Brésil), de Jha V.C. *et al.* en 2007 (*M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, isolées de lait cru de buffle au Népal), de Harris N.B. *et al.* en 2007 (*M. fortuitum* retrouvée dans du fromage en Californie).

De plus, Hughes M.S. *et al.* (2005) ont identifié par PCR *M. nonchromogenicum*, *M. malmoense*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *avium*, *M. kansasii* à partir de ganglions de bovins d'Irlande du Nord.

Par ailleurs, *M. smegmatis* possède une séquence similaire à l'IS6110 (Coros A., DeConno E. et Derbyshire K.M., 2008).

Tableau II.2.1. Etude de la spécificité analytique du test PCR IS6110 –
Liste des mycobactéries n'appartenant pas au MTBC à tester et effectivement disponibles

Mycobactéries autres que MTBC	Source (codification)	Références^c
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> ^b	ATCC 25291	0, 2, 4, 7, 8, 9
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> ^b	ATCC 19698	2, 9
<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> ^b	*	–
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i> ^a	ATCC (35752) ^T	0, 1, 3, 4, 7, 8, 10, 13, 14
<i>M. facinogenes</i>	Non disponible	–
<i>M. flavescens</i> ^b	CIP 104533	0, 1, 4, 8
<i>M. fortuitum</i> <i>fortuitum</i> ^a	ATCC (6841) ^T	0, 1, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15
<i>M. gastri</i> ^b	CIP 104530	0, 4, 8, 10
<i>M. gordonae</i> ^a	ATCC (14470) ^T	0, 1, 3, 4, 5, 4, 7, 8, 9, 10
<i>M. intermedium</i> ^b	*	–
<i>M. intracellulare</i> ^a	ATCC (15985) ^T	0, 4, 7, 8, 9, 13, 14, 15
<i>M. kansasii</i> ^a	ATCC (12478) ^T	0, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 13, 14, 15
<i>M. marinum</i> ^a	ATCC (927) ^T	1, 3, 4, 8, 9
<i>M. nonchromogenicum</i> ^b	*	2, 4, 6, 8
<i>M. malmoeense</i>	Non disponible	2, 13, 14, 15
<i>M. paraffinicum</i> ^b	*	12
<i>M. scrofulaceum</i>	Non disponible	3, 4, 8
<i>M. simiae</i> ^a	ATCC (25275) ^T	0, 1, 3, 4
<i>M. smegmatis</i> ^a	ATCC (19420) ^T	3, 4, 7, 10, 11
<i>M. szulgai</i>	Non disponible	3, 4, 10
<i>M. phlei</i> ^b	ATCC 354	4, 7, 8
<i>M. terrae</i> complex ^b	*	2, 3, 4, 8
<i>M. triviale</i> ^b	*	4, 8
<i>M. ulcerans</i> ^a	CPS (CR08085632)	1, 3, 4, 8, 10
<i>M. vaccae</i>	Non disponible	0, 3, 4, 8, 10
<i>M. xenopi</i>	*	0, 1, 3, 7, 8, 9, 13, 14

^a/ ADN provenant du Laboratoire Eau Environnement et Systèmes Urbains, Ecole des Ponts, Paris (Radomski N., doctorant) ; ^b/ ADN provenant de ATCC/ American Type Culture Collection ; T/ Souche type ; CPS/ Collection de la Pitié-Salpêtrière (Paris, France) ; */ Identification bactérienne des isolats par séquençage ADN_r 16S, par l'Afssa-Lerpaz ;

^c/ Références des articles citant l'utilisation des mycobactéries pour vérifier la spécificité de PCR MTBC et/ou IS6110. 0/ Hénault S, Karoui C. et Boschirolu M.L., 2006 ; 1/ Jordao Junior C.M. *et al.*, 2009 ; 2/ Hugues M.S. *et al.*, 2005 ; 3/ Tasara T., Hoelzle L.E. et Stephan R., 2005 ; 4/ Rodriguez J.G. *et al.*, 1995 ; 5 : Skuce R.A. *et al.*, 1994 ; 6/ McCorry T.P. *et al.*, 2004 ; 7/ Bakshi C.S. *et al.*, 2005 ; 8/ Liébana E. *et al.*, 1996 ; 9/ Taylor G.M. *et al.*, 2007 ; 10/ Parra A. *et al.*, 2008 ; 11/ Coros A., DeConno E. et Derbyshire K.M., 2008 ; 12/ Wang S.H. *et al.*, 2008 ; 13/ Hellyer T.J. *et al.*, 1996 ; 14/ Kent L. *et al.*, 1995 ; 15/ McHugh T.D., Newport L.E. et Gillespie S.H., 1997.

Au total, 26 mycobactéries ont été sélectionnées mais en pratique, certaines souches n'étaient pas disponibles. Par conséquent, seules 21 mycobactéries ont été effectivement testées (Tableau II.2.1.).

Sachant que la norme AFNOR NF T 90-471 recommande que les essais d'exclusivité soient réalisés sur des extraits d'ADN de façon à obtenir au minimum 10 000 unités génomes (AFNOR, 2010), toutes les mycobactéries disponibles sauf *M. xenopi* (soit 20 échantillons, Tableau II.2.1) ont donc été testées pour une concentration en ADN de 0,01 ng/μl (soit 0,05 ng/puits) (Annexe XII). *M. xenopi* a été testée à partir du lysat d'une colonie (non purifiée et donc non quantifiée).

I.2.2. Bactéries n'appartenant pas au genre *Mycobacterium*

La liste des bactéries à tester n'appartenant pas au genre *Mycobacterium*, a été établie en tenant compte des critères suivants : Bactéries appartenant à l'ordre des Actinomycétales, et/ou engendrant des lésions similaires à celles dues à une infection par les mycobactéries du MTBC et/ou possédant une séquence d'insertion similaire à l'IS6110.

Seuls les échantillons d'ADN de 10 bactéries (10 échantillons) ont été testés par PCR à la concentration de 0,01 ng/μl (AFNOR, 2010) (Tableau II.2.2).

Tableau II.2.2. Etude de la spécificité analytique du test PCR IS6110 – Liste des bactéries testées n'appartenant pas au genre *Mycobacterium*.

Bactéries n'appartenant pas au genre <i>Mycobacterium</i>	Source (codification)
<i>Escherichia coli</i> ^a	* (SC35)
<i>Mycoplasma bovis</i>	ATCC 25523
<i>Nocardia farcinica</i> ^a	IFM 10152
<i>Rhodococcus spp.</i> ^a	* (SC48)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 27956
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	ATCC 27957
<i>Streptococcus uberis</i>	ATCC 27958
<i>Streptomyces spp.</i> ^a	* (SC49)
<i>Pseudomonas spp.</i> ^a	* (SC32)

^a/ ADN provenant provenant du Laboratoire Eau Environnement et Systèmes Urbains, Ecole des Ponts, Paris (Radomski N., doctorant) ; IFM/ Collection de Culture du Centre de Recherche sur les champignons pathogènes et les mycobactéries toxiques, Chiba, Japon.* Identification bactérienne des isolats par séquençage ADNr 16S.

D'autres mycobactéries telles que *Actinobacillus lignieresii*, *Actinomyces pyogenes*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Nocardia asteroides*, qui étaient prévues dans la liste auraient méritées d'être testées mais elles n'étaient malheureusement pas disponibles.

II. Protocole d'amplification et de détection par PCR IS6110 de la cible génétique et Méthode d'interprétation des résultats

L'étude analytique de ce test PCR a porté uniquement sur la cible génétique IS6110 du test. En effet, la cible génétique IPC (contrôle d'extraction) n'était pas utile pour cette étude puisque les échantillons d'ADN analysés ne contenaient pas d'IPC (Annexe IX).

II.1. Protocole d'amplification et de détection par PCR de la cible génétique IS6110

Pour cette approche analytique, nous avons donc préparé uniquement le mix nécessaire à la réaction PCR permettant l'amplification et la détection d'un fragment d'IS6110 (Mix IS6110). Le Mix IS6110 a été reconstitué à partir des réactifs suivants : Master mix et couple amorces et sonde Taqman[®] spécifiques du fragment d'IS6110 recherché (Annexe IX).

Pour chacune des études (sensibilité et spécificité analytiques du test, ainsi que pour sa limite inférieure de détection étudiée en (Annexe XIII)), le volume final de chaque réaction PCR était de 25 µl. Dans chaque puits (ou cupule) où une réaction PCR était à réaliser, 5 µl d'échantillon d'ADN ont été distribués dans les 20 µl de Mix IS6110 préalablement déposés. Par ailleurs, afin de valider l'analyse PCR, un contrôle positif d'amplification de la cible génétique IS6110 (EPC) distribué comme un échantillon, a été utilisé pour chacune des études de sensibilité et spécificité du test. De même, une cupule contenant 25 µl de Mix IS6110 réservée au contrôle négatif d'amplification (NC) a été également employée (Annexe IX).

L'amplification et la détection du fragment cible ont été réalisées avec le thermocycleur ABIPRISM™ 7500 et en utilisant le programme décrit en Annexe IX (avec un changement dans le nombre de cycles à l'étape 3, soit 50 répétitions au lieu de 45).

II.2. Méthode d'interprétation des résultats

Les résultats des témoins positif (EPC) et négatif (NC) d'amplification ont dû être préalablement validés avant d'interpréter les résultats des échantillons. En effet, la valeur du

Ct_{IS6110} obtenue pour l'EPC devait être comprise entre 25 et 28 et la valeur du Ct_{IS6110} obtenue pour le NC devait être supérieure à 50 (nombre de cycles réalisés).

Un système d'interprétation des résultats des échantillons analysés avec le test PCR basé uniquement sur la cible génétique IS6110, est décrit en Annexe XIII (établi suite à la détermination de la limite de détection du test à 3 copies correspondant à une valeur de Ct_{IS6110} de 38). Ainsi, le résultat d'un échantillon est interprété positif (positif MTBC) si la valeur du Ct_{IS6110} est inférieure à 38 ou négatif (négatif MTBC) si la valeur du Ct_{IS6110} est supérieure à 50 (aucun signal détecté). Il faut également tenir compte de l'aspect de la courbe (exponentielle).

Résultats et Discussion

Dans les deux études analytiques, l'analyse PCR a été validée par les témoins et les résultats des échantillons testés ont ainsi pu être interprétés.

I. Etude de la sensibilité analytique du test PCR IS6110

Les valeurs des Ct_{IS6110} obtenues pour les six ADN des mycobactéries du MTBC (*M. bovis*, *M. caprae*, *M. tuberculosis*, *M. microti*, *M. africanum* et *M. pinnipedii*) ont été inférieures à la valeur de Ct correspondant à la limite de détection (Ct_{IS6110} < 38). Ces résultats apportent la confirmation que ce test PCR permet la détection des espèces présentes dans le MTBC. Sa sensibilité analytique est donc excellente d'autant que la concentration des ADN testés étaient relativement faible (100 fg/μl).

II. Etude de la spécificité analytique du test PCR IS6110

Parmi les 21 échantillons testés, fortement concentrés en ADN de mycobactéries autres que MTBC, 5 ont présenté un signal positif (Ct_{IS6110} < 38). Il s'agissait de mycobactéries atypiques : *M. flavescens* (36,3), *M. gastri* (34,6), *M. gordonae* (35,0) et *M. paraffinicum* (34,3) et *M. xenopi* (28,8). Toutefois, les ADN des mycobactéries testés étaient 100 fois plus concentrés (0,01 ng/μl soit 10 000 fg/μl) que ceux des mycobactéries du MTBC.

De plus, ces mycobactéries ont été également analysées avec un autre test PCR IS6110 en temps réel développé par l'Afssa-Lerpaz (noté PCR-Afssa), (Hénault S., Karoui C. et Boschioli M.L., 2006) et les deux dernières mycobactéries (*M. paraffinicum* et *M. xenopi*)

ont présenté également un signal positif (Ct respectivement similaires à ceux obtenus avec le test PCR IS6110 étudié dans cet article) (résultats non présentés).

En outre, le test PCR IS6110 étudié n'a pas permis la détection des mycobactéries du complexe *M. avium* (MAC) (en particuliers *M. avium* subsp. *paratuberculosis* et *M. avium* subsp. *avium* couramment retrouvés chez les bovins) et des bactéries n'appartenant pas au genre *Mycobacterium*. En effet, parmi les 10 autres échantillons testés d'ADN de bactéries autres que *Mycobacterium* spp., aucun signal n'a été détecté ($Ct_{IS6110} > 50$).

Au regard de ces résultats, la spécificité analytique du test PCR IS6110 semble donc convenable.

Conclusion

L'objectif du travail exposé dans ce sous-chapitre était d'évaluer d'un point de vue analytique, le test PCR6110 de LSI développé pour détecter seulement les mycobactéries du MTBC. En effet, il s'agissait d'évaluer la sensibilité et la spécificité analytiques des amorces et sonde IS6110, créées pour être spécifiques d'un fragment d'IS6110 qui est, d'après la littérature, présent uniquement dans le génome des mycobactéries du MTBC.

Les résultats analytiques obtenus ont montré que ce test était très sensible puisqu'il a permis la détection des mycobactéries du MTBC, à partir de faibles quantités d'ADN extraits de souches isolées. De plus, sa spécificité analytique semblait acceptable puisque ni les mycobactéries du MAC, ni les bactéries autres que *Mycobacterium* spp. (testées) n'ont été détectées. Cependant, il a permis la détection de quelques mycobactéries atypiques (*M. flavescens*, *M. gastri*, *M. gordonae* et *M. paraffinicum* et *M. xenopi*) à partir de très grandes quantités d'ADN extraits de souches isolées, mais les signaux d'amplification obtenus pour les quatre mycobactéries quantifiées étaient faibles.

Sous-Chapitre 2 :

Etude de la valeur opérationnelle de cette méthode PCR IS6110 utilisée en Dordogne

Après cette approche analytique, une évaluation terrain de ce test PCR IS6110 en temps réel devait permettre d'apprécier son intérêt opérationnel (sensibilité et spécificité diagnostiques) notamment par rapport aux méthodes officielles de diagnostic de la Tb (bactériologie et histologie).

Dans ce sous-chapitre 2, deux versions du kit PCR TaqVet[®] MTBC ont été étudiées. La différence entre les versions reposait sur la nature du contrôle interne d'extraction (IPC endogène pour la 1^{ère} version et exogène pour la 2^{nde}).

Matériels et Méthodes

I. Description des échantillons et processus de sélection rétrospectif

Toutes les études ont été réalisées rétrospectivement à partir de bovins suspectés de Tb, car présentant des lésions macroscopiques évoquant des lésions de Tb, découvertes par l'inspection à l'abattoir. Ces bovins étaient tous issus de cheptels situés dans des régions infectées en France (Dordogne et/ou région Bourgogne, Côte d'Or notamment).

Les échantillons prélevés sur ces lésions suspectes, envoyés par les abattoirs entre fin 2006 et début 2010, ont été traités par le LDAR24 ; il s'agissait de ganglions (rétropharyngien, trachéobronchique, médiastinal, notamment) et d'organes (poumons, foie, notamment).

Tous les échantillons ont été soumis à un examen histologique avec coloration de Ziehl Neelsen (*Hist.* pour l'histologie), une culture et identification de souches (*Bact.* pour la bactériologie) et une PCR IS6110 en temps réel, (kit TaqVet[®] MTBC) (*PCR*).

Au fur et à mesure du travail de thèse, la technique *PCR* a évolué et différentes études de sensibilité diagnostique liées aux modifications ont ainsi été réalisées.

Deux versions du test *PCR* ont été évaluées.

En effet, nous avons réalisé une première étude de la sensibilité diagnostique de la 1^{ère} version de la *PCR* (*PCR1*) pour laquelle l'IPC était endogène et la détection des deux cibles génétiques (IS6110 et IPC endogène) était réalisée dans le même puits (monocupule).

Or, en raison d'un problème lié à cet IPC endogène (problème d'invalidité des résultats *PCR1* en l'absence d'inhibition), une seconde version du test *PCR* (*PCR2*) reposant sur l'utilisation d'un IPC exogène a été développée et utilisée pour la détection des deux cibles génétiques (IS6110 et IPC exogène) en monocupule (*PCR2m*) et cupules séparées ou bicupule (*PCR2b*). Une étude comparative entre *PCR1*, *PCR2m* et *PCR2b* a donc été nécessaire pour déterminer si les problèmes d'inhibition pouvaient, sans réduire la sensibilité de la méthode, être réduits avec cette nouvelle version (*PCR2*) et suivant quel système de détection (monocupule ou bicupule).

Enfin, il a été indispensable d'étudier la sensibilité diagnostique de la version *PCR* retenue (*PCR2b*).

Par ailleurs, la spécificité diagnostique « opérationnelle » du test *PCR* a été étudiée à partir de la *PCR1* et *PCR2b* qui ont été employées « en routine » en Dordogne (*PCR1* de fin 2006 à fin 2007 et *PCR2b* depuis 2008).

Pour compléter l'approche analytique de la spécificité de la cible génétique IS6110 du test, la spécificité de la *PCR2b* conditionnelle à l'identification de bactéries n'appartenant pas au MTBC (absence de bactérie du MTBC après recherche d'identification des colonies isolées) a été également étudiée rétrospectivement.

I.1. Etude de la sensibilité diagnostique de la 1^{ère} version de la *PCR* (*PCR1*)

La sensibilité diagnostique de la première version de la *PCR* (*PCR1*) a été étudiée à partir de 149 tissus présentant des lésions macroscopiques suspectes de Tb, découvertes à l'inspection à l'abattoir (fin 2006 et 2007). Ces échantillons provenaient de 77 bovins issus de 44 cheptels déclarés infectés de Tb* par la suite (d'une région infectée, Dordogne).

Pour cette étude, les échantillons ont tous été analysés par histologie, bactériologie et *PCR1*. Dans le cas de résultat *PCR1* invalide, l'échantillon (*éluat*) était dilué au 1/10 puis ré-analysé. La particularité de cette 1^{ère} version de la *PCR* est que l'IPC est endogène (IPC_{endo}). De plus, l'amplification et la détection des cibles IS6110 et IPC_{endo} s'effectuent dans la même cupule (amplifications géniques en monocupule) (Annexe IX).

* **Cheptel infecté de Tb** : cheptel où au minimum 1 animal a fourni un résultat positif en bactériologie (*M. bovis*) laquelle est à ce jour le gold standard.

Cependant, l'absence de détection d'IPC_{endo} (résultat invalide) a été constatée à plusieurs reprises en l'absence d'inhibition et ceci constituait un problème à résoudre rapidement. Une seconde version de cette PCR (PCR2), utilisant un IPC exogène (ajouté après l'étape de décontamination à l'acide de façon à éviter sa dénaturation) a donc été développée et comparée à la PCR1.

I.2. Deux études comparatives entre les sensibilités diagnostiques de PCR1 et PCR2

I.2.1. Première étude comparative entre PCR1 et PCR2

42/149 échantillons « ribolysés » (§ II.2.2.2.), utilisés pour l'étude de la sensibilité diagnostique de la PCR1 (étude initiale), ont été ré-extraits et analysés deux fois par PCR2 avec un système d'amplification génique d'une part, en monocupule (notée PCR2m) et d'autre part, en cupules séparées ou bicupule (notée PCR2b). De plus, ces échantillons ont été ré-analysés par PCR1, avec le même système d'amplification génique, soit en monocupule. Dans le cas de résultat PCR invalide, l'échantillon (éluat) était dilué au 1/10 puis ré-analysé. Par ailleurs, 31 de ces 42 échantillons (éluates) ont été envoyés à l'Afssa-Lerpaz qui les a également analysés (PCR-Afssa) (Hénault *et al.*, 2006). Les résultats obtenus sont présentés en Annexe XV.

I.2.2. Deuxième étude comparative entre PCR1 et PCR2b

Une seconde étude comparative a été effectuée dans le but de vérifier les résultats obtenus lors de la première étude. Ainsi, 23 échantillons ribolysés supplémentaires, décrits au Tableau II.2.3, (parmi les 149 échantillons étudiés dans l'étude initiale de la sensibilité de la PCR1 (§ I.1.)), ont été choisis selon les résultats obtenus dans l'étude initiale, de façon à disposer d'un panel de résultats différents (cas A à F).

Tableau II.2.3. Caractéristiques des échantillons utilisés pour la seconde étude comparative entre PCR1 et PCR2b.

Cas	Nombre d'échantillons	Résultats PCR1 (étude initiale)	Résultats Bact.
A	10	$Ct_{IS6110} < 38$	Positif
B	2	$38 \leq Ct_{IS6110} < 40$	Positif
C	1	$Ct_{IS6110} > 40$	Négatif
D	1	$Ct_{IS6110} > 40$	Invalide
E	7	$Ct_{IS6110} < 38$	Négatif
F	2	$38 \leq Ct_{IS6110} < 40$	Négatif

Ensuite, ils ont tous été extraits et analysés simultanément par *PCR1* et *PCR2b*. Dans le cas de résultat *PCR* invalide, l'échantillon (*éluat*) était dilué au 1/10 puis ré-analysé.

I.3. Etude de la sensibilité diagnostique de la *PCR2b*

L'étude de la sensibilité diagnostique de la *PCR2b* a été effectuée à partir de 126 tissus présentant des lésions macroscopiques suspectes de Tb, découvertes à l'inspection à l'abattoir (en 2008). Ces échantillons provenaient de 67 bovins issus de 29 cheptels déclarés infectés¹ de Tb par la suite (des deux régions infectées, citées précédemment).

Dans cette étude, les échantillons ont tous été analysés par histologie, bactériologie et *PCR2b*. Dans le cas de résultat *PCR2b* invalide, l'échantillon (*éluat*) était dilué au 1/10 puis ré-analysé.

I.4. Etude de la spécificité diagnostique « opérationnelle » de la *PCR*

L'étude de la spécificité diagnostique de la *PCR* devait être réalisée à partir d'échantillons de bovins présentant à l'abattoir des lésions suspectes de Tb mais reconnus non infectés de Tb (bactériologie négative) par la suite. De plus, ces bovins auraient dû provenir de cheptels indemnes de Tb, d'une région elle-même indemne. Cependant, en raison des difficultés pour obtenir rapidement le nombre nécessaire d'échantillons (afin d'avoir des résultats statistiquement fiables) et pour réaliser les analyses dans le temps imparti, il n'a pas été possible de mesurer directement la spécificité diagnostique de la *PCR*.

Il a donc été convenu de s'appuyer sur l'approche analytique (souches de la liste d'exclusivité non détectées) mais il fallait impérativement disposer d'éléments de confirmation sur le terrain.

Pour cela, une estimation de la spécificité diagnostique « opérationnelle » du test a été effectuée. Cette spécificité a donc été évaluée à partir des résultats trouvés négatifs en *PCR* pour des cheptels qui par la suite avaient été reconnus non infectés (bactériologie négative pour tous les bovins testés du cheptel).

Par conséquent, la spécificité diagnostique opérationnelle de la *PCR* a été étudiée à partir de 47 tissus présentant des lésions macroscopiques suspectes de Tb, découvertes à l'inspection à l'abattoir (entre fin 2006 et début 2008). Ces échantillons provenaient de 38 bovins issus de 37 cheptels initialement classés indemnes de Tb* (des deux régions infectées, citées

* **Cheptel indemne de Tb** : cheptel où aucun animal n'a été retrouvé positif en bactériologie depuis 2001 (absence de donnée avant cette date).

précédemment) et pour lesquels la suite des observations (y compris tuberculinations) n'a pas permis de confirmer la suspicion initiale de tuberculose.

Dans cette étude, les échantillons ont tous été analysés par histologie, bactériologie et *PCR* (*PCR1* (25 échantillons soit 20 animaux) ou *PCR2b* (22 échantillons soit 18 animaux)). Dans le cas de résultat *PCR* invalide, l'échantillon (*éluat*) était dilué au 1/10 puis ré-analysé.

I.5. Etude complémentaire de la spécificité de la *PCR2b* conditionnelle à l'identification de bactéries n'appartenant pas au MTBC

Pour compléter l'approche analytique, la spécificité de la *PCR2b* conditionnelle à l'identification de bactéries n'appartenant pas au MTBC (absence de bactérie du MTBC après recherche d'identification des colonies isolées) a été étudiée rétrospectivement à partir de 65 tissus provenant de bovins (Dordogne) avec des lésions macroscopiques suspectes de Tb, analysés par histologie, bactériologie et *PCR2b* (pendant la période de janvier 2007 à juin 2010) et dont les résultats bactériologiques étaient tous négatifs (absence de bactérie du MTBC) après identification des colonies isolées.

De plus, pour élargir le spectre de discrimination de la *PCR2b*, il a été décidé d'inclure dans cette étude, 3 autres échantillons (également avec des lésions macroscopiques suspectes et négatifs en bactériologie après identification), car les résultats après identification des colonies isolées de ces échantillons avaient montré la mise évidence de trois mycobactéries non retrouvées chez les bovins étudiés en Dordogne (*M. intracellulare*, *M. szulgai* et *M. xenopi*) ; Parmi ces trois échantillons, l'un provenait d'un rat-kangourou (parc zoologique) et les deux autres de blaireaux (Côte d'Or).

L'étude a donc finalement compté 68 échantillons.

II. Description des techniques utilisées (Histologie, Bactériologie et Méthode PCR IS6110)

II.1. Histologie réalisée par les laboratoires agréés (LDA22 et ENV/Afssa-Lyon)

Les échantillons (ganglions ou organes) fixés au formol par le LDAR24 ont ensuite été envoyés à un des laboratoires agréés pour la recherche de Tb par examen histo-pathologique (LDA22 ou ENV/Afssa-Lyon en fonction de la provenance des échantillons).

Chaque échantillon a donc été analysé par examen microscopique de coupes histologiques (colorations au HE et de ZN). Ensuite, un résultat définitif global par animal (même si plusieurs échantillons traités pour un même animal) a été rendu au LDAR24.

De plus, l'ENV/Afssa-Lyon a utilisé, en complément, d'autres techniques spécifiques des mycobactéries telles que la coloration à l'AOR et l'IHC utilisant des Ac anti-*M. bovis*.

Toutefois, une étude comparative des méthodes employées par les deux laboratoires (Annexe XIV) a montré qu'il n'existait pas de différence significative entre les méthodes.

La méthode d'interprétation des résultats histologiques par animal a été la suivante : les résultats indiquant la présence de lésions évocatrices de Tb avec ou sans BAAR ont été interprétés positifs (*Hist.* +) tandis que les résultats montrant l'absence de lésion ou bien la présence de lésions non tuberculeuses ont été interprétés négatifs. (*Hist.* -).

II.2. Bactériologie (culture selon la méthode de référence & identification) et Méthode PCR

II.2.1. Préparation des échantillons : Décontamination & Broyage des échantillons

Préalablement à la mise en culture des échantillons et à l'étape d'extraction d'ADN (des échantillons) en vue de l'analyse PCR, les échantillons ont été préparés selon le protocole décrit dans la norme AFNOR NF U 47-104, version en vigueur de 2003 (AFNOR, 2003), (protocole détaillé en Annexe III).

Ainsi, quelques grammes de chaque échantillon analysé ont été coupés en petits morceaux puis homogénéisés par broyage péristaltique dans de l'acide sulfurique à 4% (solution de décontamination) (Hénault *et al.*, 2006). Ensuite, une solution de soude à 6% a été utilisée pour neutraliser la suspension.

II.2.2. Analyses des échantillons décontaminés

II.2.2.1. Recherche bactériologique des mycobactéries du MTBC

Le surnageant de chaque échantillon préalablement broyé et décontaminé a été inoculé dans plusieurs tubes de culture sur milieu solide (Löwenstein-Jensen[®] et Coletsos[®]) (norme NF U 47-104). Puis, les tubes ont été incubés à différentes températures (($30 \pm 2^\circ\text{C}$, $37 \pm 2^\circ\text{C}$ et $40 \pm 2^\circ\text{C}$) pendant trois mois (protocole détaillé en Annexe III).

L'identification des colonies isolées a été ensuite réalisée par l'Afssa-Lerpaz (Annexe IV).

La méthode d'interprétation des résultats bactériologiques par échantillon a été la suivante : les résultats indiquant l'isolement de mycobactéries appartenant au MTBC ont été interprétés positifs (*Bact. +*) et les résultats montrant l'absence de colonie en culture ou bien, l'identification de mycobactéries autres que celles du MTBC ou de bactéries n'appartenant pas au genre *Mycobacterium* ont été interprétés négatifs (*Bact. -*).

II.2.2.2. Méthode PCR IS6110 pour la recherche des mycobactéries du MTBC

La méthode PCR IS6110 pour la recherche des mycobactéries du MTBC comprenait plusieurs étapes : la purification du surnageant de l'échantillon broyé et décontaminé suivi d'une lyse mécanique (sous agitation avec des microbilles) ou ribolyse[®] puis, de l'extraction d'ADN à partir de l'échantillon *ribolysé* et enfin, de l'analyse PCR (*PCR1* ou *PCR2m* ou *PCR2b*) des échantillons d'ADN extrait.

II.2.2.2.1. Purification du surnageant puis Ribolyse[®]

Le surnageant de chaque échantillon préalablement broyé et décontaminé a été également purifié en suivant le protocole décrit ci-après.

Ainsi, 1500 µl de surnageant ont été transférés dans un microtube DNase/RNase free.

Puis, ce microtube a été centrifugé pendant 2 min à 12 000 g et le surnageant éliminé. Ensuite, le culot a été remis en suspension dans 1 ml de tampon Tris-EDTA et, le microtube a été à nouveau centrifugé pendant 2 min à 12 000 g.

Ce procédé de lavage du culot a été renouvelé au minimum deux fois (jusqu'à l'obtention d'un culot clair stable).

Après, le culot a été remis en suspension dans 600 µl de PBS puis, transféré dans un microtube (pour ribolyser[®]) contenant des microbilles (de 0,5 mm de diamètre).

Enfin, l'échantillon a été *ribolysé* (à l'aide d'un ribolyser[®] de type FastPrep[®] 120 programmé à 6 m/sec 45 sec ou Precess 24[™] programmé à 5000 rpm 2 fois 20 sec) puis centrifugé quelques secondes (afin d'éviter les aérosols).

II.2.2.2.2. Extraction d'ADN à partir de l'échantillon *ribolysé*

L'extraction d'ADN à partir de l'échantillon *ribolysé* a été réalisée en utilisant le kit QIAamp[®] DNA de QIAGEN.

Un mélange contenant 20 µl de protéinase K, 200 µl de tampon AL, 200 µl d'échantillon *ribolysé* et, 5 µl d'IPC_{exo} (si analyse *PCR2* réalisée) a été incubé à 56 ± 2°C pendant une nuit (16 à 18 h).

Après refroidissement du microtube, le mélange a été centrifugé rapidement puis déposé sur colonne QIAamp[®] DNA afin de purifier l'ADN. Après les deux lavages et le séchage de la colonne, l'ADN a été finalement élué dans 100 µl de tampon AE.

L'échantillon était alors prêt pour être amplifié par PCR.

Remarque : Comme la quantité d'échantillon ribolysé était d'environ 600 µl, il était aisément possible de réaliser deux extractions d'ADN (quantité requise par extraction, 200 µl) par échantillon (ceci a été réalisé en particulier pour les études comparatives entre PCR1 et PCR2).

II.2.2.2.3. Analyse *PCR* des échantillons d'ADN extraits

II.2.2.2.3.1. Test *PCR* version 1, *PCR1*

Comme nous l'avons dit précédemment, la particularité de la première version de la *PCR* repose sur l'utilisation d'un IPC endogène. Le protocole d'analyse de la *PCR1* est décrit en Annexe IX. De même, les méthodes de validation de l'analyse *PCR1* par les témoins (NC, EPC et NCS) et d'interprétation des résultats (Tableau I.1.5) sont présentées au paragraphe III.2.2.2.1 du Chapitre I de la Partie I, de ce manuscrit.

II.2.2.2.3.2. Test *PCR* version 2, *PCR2*

➤ Caractéristiques de l'analyse *PCR2*

Comme nous l'avons vu précédemment, la particularité de la deuxième version de la *PCR* repose sur l'utilisation d'un IPC exogène (IPC_{exo}). Il s'agit d'un ADN viral inactivé ajouté au début de l'étape de lyse (en même temps que la protéinase K) et extrait ensuite comme l'ADN cible (IS6110).

Par ailleurs, le système d'amplification et détection des deux cibles génétiques (IS6110 et IPC_{exo}) par *PCR2* a été réalisé dans une seule cupule (*PCR2m*) et/ou deux cupules séparées (*PCR2b*) à la différence de la *PCR1* pour laquelle nous avons utilisé seulement un système en monocupule.

Par conséquent, dans le cas d'une analyse *PCR2m*, le mix réactionnel PCR (auquel l'échantillon ou les témoins à analyser sont ajoutés) appelé « mix 2 » comprenait le Master mix (identique à celui de la *PCR1*), et un mélange de séquences spécifiques du fragment d'IS6110 (identiques à celles de la *PCR1*) et de séquences spécifiques de l'IPC_{exo}.

Dans le cas d'une analyse *PCR2b*, deux mix réactionnels PCR ont été réalisés afin de les déposer dans deux cupules séparées : un « mix IS6110 » composé de Master mix (identique à celui des *PCR1* et *PCR2m*) et d'un mélange de séquences spécifiques du fragment d'IS6110 (identiques à celles des *PCR1* et *PCR2m*) et, d'un « mix IPC_{exo} » composé de Master mix (identique à celui des *PCR1* et *PCR2m*) et d'un mélange de séquences spécifiques de l'IPC_{exo} (identiques à celles de la *PCR2m*).

Comme pour la *PCR1*, les témoins EPC, NC et NCS ont été également utilisés. En effet, l'EPC constituait le témoin positif d'amplification de l'IS6110 et le NC représentait le témoin négatif d'amplification de l'IS6110 et de l'IPC_{exo}. Enfin, le NCS constituait un contrôle négatif pour l'IS6110 permettant de vérifier l'absence de contamination par l'IS6110 (MTBC) lors de l'extraction. Cependant, à la différence de la *PCR1*, il était aussi un témoin positif pour l'IPC_{exo}, c'est-à-dire permettant de vérifier l'efficacité de l'extraction de l'IPC_{exo} (car IPC_{exo} également ajouté au NCS (PBS) avant l'étape de lyse).

Le programme nécessaire à la réaction *PCR2* était identique à celui utilisé pour la réaction *PCR1* (Annexe IX).

➤ Méthodes de validation de l'analyse *PCR2* et d'interprétation des résultats

Les résultats du témoin positif d'amplification de l'IS6110 (EPC), du témoin négatif d'amplification de l'IS6110 et de l'IPC_{exo} (NC) et, du témoin d'extraction positif pour l'IPC_{exo} mais négatif pour l'IS6110 (NCS) ont dû être préalablement validés pour pouvoir procéder à l'interprétation des résultats des échantillons.

En effet, de manière analogue à la *PCR1*, la valeur du Ct_{IS6110} obtenue pour l'EPC devait être comprise entre 25 et 28 (et Ct_{IPC_{exo}} > 40). Les valeurs des Ct_{IS6110} et Ct_{IPC_{exo}} obtenues pour le NC devaient être supérieures à 45 (nombre de cycles réalisés).

Pour le NCS, la valeur du Ct_{IS6110} devait être supérieure à 40 mais à la différence de la *PCR1*, la valeur du Ct_{IPC_{exo}} devait être inférieure ou égale à 29 (valeur attendue du Ct_{IPC_{exo}} (27) majorée de 2 Ct).

Le système d'interprétation des résultats des échantillons analysés avec le test *PCR2* (Tableau II.2.4) était quelque peu différent de celui de la *PCR1* (les différences reposant sur les valeurs de Ct obtenues avec les détecteurs IPC).

Tableau II.2.4. Système d'interprétation des résultats des échantillons (analysés avec la *PCR2*) en fonction des valeurs de Ct obtenues avec les détecteurs IS6110 (Ct_{IS6110}) et IPC_{exo} (Ct_{IPCexo}).

Interprétation des résultats de l'échantillon	Valeur du Ct IS6110 obtenue pour l'échantillon	Valeur du Ct IPC _{exo} obtenue pour l'échantillon
Positif MTBC	≤ 40	≤ 40
Négatif MTBC	> 40	≤ Valeur du Ct IPC _{exo} obtenue pour NCS ^(a) + 3 Ct
Invalide ^(b)	> 40	> Valeur du Ct IPC _{exo} obtenue pour NCS ^(a) + 3 Ct

^(a)/ La valeur du Ct_{IPCexo} obtenue pour le NCS doit être inférieure ou égale à 27 majorée de 2 Ct, soit 29 (soit 1 des 3 critères de validation de l'analyse avant interprétation des résultats des échantillons);

^(b)/ Dans le cas d'un résultat invalide, il est nécessaire de diluer l'échantillon au 1/10 et de recommencer l'analyse *PCR2*. Pour l'interprétation, la valeur du Ct_{IPCexo} obtenue doit être inférieure ou égale à la valeur du Ct_{IPCexo} obtenue pour le NCS majorée de 6 Ct.

Ainsi, le résultat d'un échantillon a été :

- interprété positif (positif MTBC) si la valeur du Ct_{IS6110} était inférieure à 40 et que la valeur du Ct_{IPCexo} était inférieure ou égale à la valeur du Ct_{IPCexo} obtenue pour le NCS majorée de 3 Ct. Toutefois, si la valeur du Ct_{IPCexo} était supérieure à la valeur du Ct_{IPCexo} obtenue pour le NCS majorée de 3 Ct mais inférieure ou égale à 40, il s'agissait d'une inhibition partielle et par conséquent, l'échantillon a été également interprété comme positif.

- interprété négatif (négatif MTBC) si la valeur du Ct_{IS6110} était supérieure à 40 et que la valeur du Ct_{IPCexo} était inférieure ou égale à la valeur du Ct_{IPCexo} obtenue pour le NCS majorée de 3 Ct.

- reconnu invalide si la valeur du Ct_{IS6110} était supérieure à 40 et que la valeur du Ct_{IPCexo} était supérieure à la valeur du Ct_{IPCexo} obtenue pour le NCS majorée de 3 Ct.

II.3. Méthode d'analyse des différents résultats obtenus par animal dans les études de sensibilité diagnostique des *PCR1* et *PCR2b* et de spécificité diagnostique opérationnelle de la *PCR*

Les résultats des deux études de sensibilité diagnostique de la *PCR* (*PCR1* et *PCR2b*) et de l'étude de spécificité diagnostique opérationnelle de la *PCR* ont été exprimés par animal dans le but d'établir des comparaisons avec les résultats des autres tests (histologie, bactériologie).

En effet, les résultats histologiques ont été exprimés globalement par animal et non pour chaque échantillon d'un animal donné.

Les critères employés pour interpréter les résultats bactériologiques et *PCR* des échantillons par animal, sont décrits au Tableau II.2.5.

Tableau II.2.5. Critères d'interprétation des résultats bactériologiques et *PCR* des échantillons par animal, employés pour les études de sensibilité et spécificité diagnostiques de la *PCR*.

Tests	Résultat par animal	Critères
Bactériologie	Positif	Au moins un échantillon positif
	Négatif	Tous les échantillons négatifs
<i>PCR</i>	Positif	Au moins un échantillon positif
	Négatif	Tous les échantillons négatifs
	Invalide	Tous les échantillons invalides
		Au moins un échantillon invalide et les autres négatifs

Résultats et Interprétations

Dans la mesure où les différentes études diagnostiques ont été réalisées de manière rétrospective, seuls les échantillons dont les analyses *PCR* étaient validées (par les témoins) ont été sélectionnés pour nos études. Ainsi, les résultats de tous échantillons étudiés étaient interprétables (négatifs, positifs ou invalides).

Par ailleurs, les différents pourcentages présentés ont été calculés avec un intervalle de confiance à 95 % (IC 95 %).

I. Etudes de la sensibilité diagnostique de la *PCR*

I.1. Etude de la sensibilité diagnostique de la *PCR1*

Les résultats bruts indiquent plus d'animaux positifs en histologie ($82 \pm 9\%$) et *PCR1* ($77 \pm 10\%$) qu'en bactériologie ($60 \pm 11\%$) (Tableau II.2.6).

De plus, la combinaison des résultats des différentes techniques (par animal) montre des concordances de $84 \pm 8\%$ ($65/77$), $74 \pm 10\%$ ($57/77$), $73 \pm 10\%$ ($56/77$) et $66 \pm 11\%$ ($51/77$) respectivement entre la *PCR1* & l'histologie, la *PCR1* & la bactériologie, la bactériologie & l'histologie et, la *PCR1*, la bactériologie & l'histologie (Tableau II.2.6).

Tableau II.2.6. Résultats de la *PCR1*, de l'histologie (*Hist.*) et de la bactériologie (*Bact.*) obtenus dans l'étude de la sensibilité diagnostique de la *PCR1* (n=77).

		<i>Hist.</i> +	<i>Hist.</i> –	Total <i>Hist.</i>
<i>PCR1</i> +	<i>Bact.</i> +	42 (55 ± 11 %)	2	44 (57 ± 11 %)
	<i>Bact.</i> –	14	1	15 (19 ± 9 %)
	<i>Bact.</i> + & –	56 (73 ± 10 %)	3	59 (77 ± 10 %)
<i>PCR1</i> –	<i>Bact.</i> +	1	0	1
	<i>Bact.</i> –	4	9 (12 ± 7 %)	13 (17 ± 9 %)
	<i>Bact.</i> + & –	5	9	14
<i>PCR1</i> invalide	<i>Bact.</i> +	1	0	1
	<i>Bact.</i> –	1	2	3
	<i>Bact.</i> + & –	2	2	4
<i>Bact.</i> +		44 (57 ± 11 %)	2	46 (60 ± 11 %)
<i>Bact.</i> –		19	12 (16 ± 8 %)	31
Total <i>Bact.</i>		63 (82 ± 9 %)	15	77 (100 %)

Concernant les résultats discordants entre les différents tests, un animal a été détecté positif en bactériologie et histologie (sans BAAR) mais négatif en *PCR1*. A l'inverse, un animal a eu des résultats négatifs en bactériologie et histologie (lésions non tuberculeuses) mais positif en *PCR1*.

Par contre, 15 animaux ont été retrouvés positifs en *PCR1* et négatifs en bactériologie. La *PCR1* a donc apporté une amélioration de la détection de Tb par rapport à la bactériologie.

De plus, 16 animaux positifs en *PCR1* ont présenté des résultats bactériologiques et histologiques discordants : 2 animaux *Bact.* + & *Hist.* – (avec des lésions non tuberculeuses) et 14 animaux *Bact.* – & *Hist.* + dont 1/14 avec BAAR. Par conséquent, la bactériologie seule n'avait pas permis la détection d'un animal infecté, à partir d'échantillons trouvés positifs en *PCR1* et ayant présenté des lésions évocatrices de Tb avec des BAAR.

En outre, aucun animal n'a été confirmé positif en bactériologie alors qu'il était négatif en *PCR1* & histologie. De plus, 4 animaux avec des lésions évocatrices de Tb (sans BAAR) ont été trouvés négatifs en *PCR1* & bactériologie.

Par ailleurs, seulement 9 animaux ont présenté des résultats négatifs pour l'ensemble des tests (*PCR 1*, *Bact.* et *Hist.* (5/9 avec des lésions non tuberculeuses)). Au contraire, 60/77 animaux (soit 78 ± 9 %) ont présenté des résultats positifs à au moins 2 des 3 tests.

Enfin, la *PCR1* a donné 4 résultats invalides parmi lesquels un seul animal était positif en bactériologie (et histologie). Toutefois, deux de ces quatre animaux ont été trouvés négatifs par les tests officiels (*Hist.* & *Bact.*).

I.2. Etudes comparatives entre les sensibilités diagnostiques de *PCR1* et *PCR2*

Dans le but de résoudre les problèmes liés aux nombreux résultats invalides en *PCR1* (monocupule), la *PCR2* (en monocupule et en bicupule), a été comparée à la *PCR1* à partir de deux études successives.

➤ Etude comparative 1 entre *PCR1* et *PCR2*

Tout d'abord, les sensibilités de la *PCR2m* et la *PCR2b* ont été comparées à celle de la *PCR1* à partir de 42 échantillons utilisés dans l'étude de la sensibilité de la *PCR1* (Tableau II.2.8).

L'analyse des résultats positifs obtenus avec ces trois *PCR* montre que la *PCR1* a permis de détecter beaucoup plus d'échantillons positifs (16/42) que la *PCR2m* (9/42) (Tableaux II.2.7 et II.2.8). L'utilisation de la *PCR2* en monocupule a donc entraîné une baisse importante de sensibilité (7 échantillons) par rapport à la *PCR1*, alors qu'en bicupule, la *PCR2* a permis de détecter deux fois plus d'échantillons (18/42) qu'en monocupule, soit deux échantillons supplémentaires par rapport à la *PCR1* (monocupule) (Tableaux II.2.7 et II.2.8).

Tableau II.2.7. Résultats bactériologiques (*Bact.*) en fonction des résultats positifs ($Ct_{IS6110} < 40$) des différents tests *PCR* (*PCR1*, *PCR2m* et *PCR2b*) dans l'étude comparative 1 entre *PCR1* et *PCR2* (monocupule et bicupule) (n=42).

	<i>PCR1</i> +	<i>PCR2m</i> +	<i>PCR2b</i> +
<i>Bact.</i> +	13	9	15
<i>Bact.</i> -	3	0	3
<i>Total</i>	16	9	18

Par ailleurs, la comparaison entre les résultats des 42 échantillons obtenus avec la *PCR1* et la *PCR2m* montre que parmi les 7 échantillons positifs en *PCR1* mais négatifs en *PCR2m*, 3 avaient un résultat invalide ($Ct_{IS6110} > 40$ et $Ct_{IPCexo} > 30$) en *PCR2m* et 4 étaient négatifs ($Ct_{IS6110} > 40$ et $Ct_{IPCexo} \leq 30$). Concernant ces 4 cas, 3/4 ont été positifs en bactériologie (Tableau II.2.7). De plus, les valeurs des Ct_{IS6110} obtenues en *PCR1* étaient comprises entre 37,0 et 39,4 (37,0 ; 37,9 ; 38,8 et 39,4). En outre, ces 4 échantillons ont été positifs en *PCR2b* ($34,5 < Ct_{IS6110} < 38,4$).

Par ailleurs, l'analyse des différences entre les valeurs de Ct_{IS6110} des 9 échantillons positifs en *PCR1* et *PCR2m* montre que la valeur du Ct_{IS6110} obtenue avec la *PCR2m* était supérieure de 2 Ct à celle de la *PCR1* et dans les 7 autres cas, les valeurs de Ct_{IS6110} étaient similaires.

La *PCR2m* apparaît donc beaucoup moins sensible que la *PCR1*.

En outre, alors que 14 échantillons ont été invalides en *PCR1* ($Ct_{IS6110} > 40$ et $Ct_{IPCendo} > 40$), seulement 5 l'ont été également en *PCR2m* en raison d'une inhibition totale ($Ct_{IS6110} > 40$ et $Ct_{IPCexo} > 40$) (Tableau II.2.8). Néanmoins, 12 échantillons ont présenté une inhibition partielle en *PCR2m* ($Ct_{IS6110} > 40$ and $30 < Ct_{IPCexo} \leq 40$) (Tableau II.2.8). Ainsi, 17 échantillons ont eu un résultat invalide en *PCR2m* (Tableau II.2.8).

Par conséquent, la *PCR2m* comptabilisait beaucoup plus de résultats invalides que la *PCR1*.

Tableau II.2.8. Résultats des échantillons analysés par *PCR1* ($Ct_{IPCendo}$ & Ct_{IS6110}) et par *PCR2m* et *PCR2b* (Ct_{IPCexo} & Ct_{IS6110}) avant toute dilution au 1/10 (si nécessaire), dans l'étude comparative 1 entre *PCR1* (monocupule) et la *PCR2* (monocupule et bicupule) (n=42).

		$Ct_{IS6110} \leq 40$	$Ct_{IS6110} > 40$	Total
<i>PCR1</i> : $Ct_{IPCendo} \leq 40$ (validité) (a)		5	12	<u>17</u>
<i>PCR1</i> : $Ct_{IPCendo} > 40$ (invalidité) (b)		11	14	25
Total (a+b)		16	26	42
<i>PCR2m</i> : $Ct_{IPCexo} \leq 30^*$ (validité) (c)		5	16	<u>21</u>
<i>PCR2m</i> : (invalidité)	$30 < Ct_{IPCexo} \leq 40$ (inhibition partielle)	4	12	16
	$Ct_{IPCexo} > 40$ (inhibition totale)	0	5	5
	$Ct_{IPCexo} > 30$ (d)	4	17	21
Total (c+d)		9	33	42
<i>PCR2b</i> : $Ct_{IPCexo} \leq 30^*$ (validité) (e)		10	16	<u>26</u>
<i>PCR2b</i> : (invalidité)	$30 < Ct_{IPCexo} \leq 40$ (inhibition partielle)	8	3	11
	$Ct_{IPCexo} > 40$ (inhibition totale)	0	5	5
	$Ct_{IPCexo} > 30$ (f)	8	8	16
Total (e+f)		18	24	42

*Remarque concernant ce tableau II.2.8 : la valeur limite supérieure « 30 » correspond à la valeur du Ct_{IPCexo} obtenue pour le NCS majorée de 3 Ct.

Concernant la comparaison des résultats des 42 échantillons analysés avec la *PCR1* et la *PCR2b*, la *PCR2b* a permis la détection de deux échantillons supplémentaires (Ct_{IS6110} de 39,5 & Ct_{IPCexo} de 36,2 et Ct_{IS6110} de 39,9 & Ct_{IPCexo} de 33,6 (inhibition partielle de l' IPC_{exo}), Tableau II.2.8) qui étaient invalides en *PCR1* ($Ct_{IS6110} > 40$ & $Ct_{IPCendo} > 40$, Tableau II.2.8) même après avoir été dilués (seconde analyse $Ct_{IPCendo} > 40$, inhibition de l' IPC_{endo} , Tableau II.2.9). De plus, ces deux échantillons étaient également positifs en bactériologie (Tableaux II.2.7 et II.2.9).

En outre, la combinaison des résultats de bactériologie et de *PCR* par échantillon indique une concordance meilleure entre la *PCR2b* & la bactériologie ($88 \pm 10\%$ (37/42)) qu'entre la *PCR1* & la bactériologie ($76 \pm 13\%$ (32/42)) (Tableau II.2.9).

Tableau II.2.9. Résultats de *PCR1* & *PCR2b*, *PCR1* & *Bact.* et *PCR2b* & *Bact.* dans l'étude comparative 1 entre *PCR1* (monoculture) et *PCR2* (n=42).

		<i>PCR2b</i> +	<i>PCR2b</i> -	Total
<i>PCR1</i> +	<i>Bact.</i> +	13	0	13
	<i>Bact.</i> -	3	0	3
	<i>Bact.</i> + & -	16	0	16
<i>PCR1</i> -	<i>Bact.</i> +	0	1	1
	<i>Bact.</i> -	0	19	19
	<i>Bact.</i> + & -	0	20	20
<i>PCR1</i> invalide	<i>Bact.</i> +	2	1	3
	<i>Bact.</i> -	0	3	3
	<i>Bact.</i> + & -	2	4	6
<i>Bact.</i> +		15	2	17
<i>Bact.</i> -		3	22	25
<i>Bact.</i> + & -		18	24	42

Par ailleurs, la comparaison entre les valeurs de Ct_{IS6110} des échantillons testés avec la *PCR1* et la *PCR2b*, montre des différences significatives : seulement 1/16 des échantillons ont eu des résultats similaires aux deux *PCR* alors que les autres échantillons ont eu des valeurs de Ct_{IS6110} inférieures avec la *PCR2b* (différence d'un Ct).

L'ensemble des ces résultats montre que la *PCR2b* est plus sensible que la *PCR1*.

De plus, 14 échantillons ont été considérés invalides en *PCR1* ($Ct_{IS6110} > 40$ & $Ct_{IPCendo} > 40$) alors que seulement 8 échantillons ont été reconnus invalides en *PCR2b* ($Ct_{IS6110} > 40$ & $Ct_{IPCexo} > 30$), soit 5 avec une inhibition totale ($Ct_{IPCexo} > 40$) et 3 avec une inhibition partielle ($30 < Ct_{IPCexo} \leq 40$), (Tableau II.2.8). Toutefois, ces 3 derniers (3/8) ont été également trouvés invalides en *PCR1*. Après dilution au 1/10, ces 3 échantillons ont été ré-analysés par *PCR2b* et *PCR1* et retrouvés négatifs à ces deux tests (résultats de la *PCR2b* : $Ct_{IS6110} > 40$ & $Ct_{IPCexo} \leq 30$ et résultats de la *PCR1* : $Ct_{IS6110} > 40$ & $Ct_{IPCendo} < 40$) alors que 1/3 a été détecté positif en bactériologie (Tableau II.2.9).

Concernant les 5 autres échantillons (5/8) avec une inhibition partielle en *PCR2b*, ils ont été également reconnus invalides en *PCR1* – l'ensemble des échantillons invalides en *PCR2b* (14) a donc été reconnu invalide en *PCR1* -. Néanmoins, après dilution au 1/10, ces 5 échantillons ont été ré-analysés par *PCR2b* et *PCR1*. Les résultats obtenus ont tous été négatifs en *PCR2b* (résultats concordants avec la bactériologie), alors que 4/5 échantillons ont été trouvés négatifs en *PCR1* ($Ct_{IS6110} > 40$ & $Ct_{IPCendo} < 40$) et 1 seul a été de nouveau rendu invalide en *PCR1* ($Ct_{IS6110} > 40$ & $Ct_{IPCendo} > 40$).

Enfin, les 6 échantillons restant (6/14), invalides seulement en *PCR1*, ont été dilués au 1/10 puis ré-analysés par *PCR1*. Cependant, seulement un échantillon, négatif en *PCR2b* et bactériologie, a été retrouvé négatif à la seconde *PCR1*. Les 5 autres échantillons ont été de nouveau considérés invalides en *PCR1*. Or, parmi ces 5 échantillons invalides en *PCR1*, 2 ont été détectés comme positifs en *PCR2b* (même si inhibition partielle de l'IPC_{exo} ($Ct_{IS6110} < 40$ et $30 < Ct_{IPC_{exo}} \leq 40$) et en bactériologie (Tableau II.2.9) et, 3 ont été détectés négatifs en *PCR2b* alors que 1/3 a été identifié positif en bactériologie (Tableau II.2.9).

En conclusion, par contraste avec la *PCR1*, très peu de résultats *PCR2b* ont été reconnus invalides avant dilution et aucun après dilution.

➤ Etude comparative 2 entre *PCR1* et *PCR2b*

Les deux versions de la *PCR*, *PCR2b* et *PCR1*, ont été comparées à partir de 23 échantillons supplémentaires sélectionnés suivant une gamme de résultats variés (Tableau II.2.3).

Dans le cas C (1 échantillon : *Bact.* positive et *PCR1* négative), nous avons obtenu des résultats négatifs à la fois en *PCR1* et en *PCR2b*. Les deux types de *PCR* n'ont donc pas pu approuver le résultat bactériologique.

Dans le cas D (1 échantillon : *Bact.* positive et *PCR1* invalide), l'échantillon a été trouvé positif en *PCR2b* (Ct de 37,6) mais encore invalide en *PCR1*. Seule la *PCR2b* a alors pu confirmer le résultat de la bactériologie.

Au contraire, dans le cas F (2 échantillons : *Bact.* négative et *PCR1* positive), un échantillon sur deux a été trouvé positif en *PCR2b* (Ct de 36,1) tandis que ces deux échantillons ont été détectés positifs à la seconde *PCR1* (Ct de 38,5 & 38,0). La *PCR1* a donc permis de rendre un diagnostic positif sur un échantillon non confirmé par les autres tests (*PCR2b* et *Bact.*).

Cependant, la *PCR2b*, en accord avec la *PCR1* a permis de déceler un échantillon positif alors qu'il était négatif en bactériologie.

Enfin, dans les autres cas étudiés (A, B et E), les comparaisons entre les valeurs de Ct_{IS6110} des 19 échantillons testés en *PCR2b* et *PCR1*, montrent toutes des différences significatives comme précédemment constatés dans l'étude comparative 1. En effet, la valeur du Ct_{IS6110} de la *PCR2b* était inférieure à celle de la *PCR1* pour un même échantillon (différence d'un Ct).

I.3. Etude de la sensibilité diagnostique de la *PCR2b*

Les résultats bruts indiquent davantage d'animaux positifs en histologie ($88 \pm 8 \%$) et *PCR2b* ($87 \pm 8 \%$) qu'en bactériologie ($82 \pm 10 \%$) (Tableau II.2.10).

La combinaison des résultats des différentes techniques (par animal) montre des concordances de $90 \pm 7 \%$ (60/67), $90 \pm 7 \%$ (60/67), $85 \pm 9 \%$ (57/67) et $82 \pm 10 \%$ (55/67) respectivement entre la *PCR2b* & l'histologie, la *PCR2b* & la bactériologie, la bactériologie & l'histologie, la *PCR2b*, la bactériologie & l'histologie (Tableau II.2.10).

Tableau II.2.10. Résultats de la *PCR2* bicupule (*PCR2b*), de l'histologie (*Hist.*) et de la bactériologie (*Bact.*) obtenus dans l'étude de la sensibilité diagnostique de la *PCR2b* (n=67).

		<i>Hist.</i> +	<i>Hist.</i> -	Total <i>Hist.</i>
<i>PCR2b</i> +	<i>Bact.</i> +	50 ($75 \pm 11 \%$)	3	53 ($79 \pm 10 \%$)
	<i>Bact.</i> -	5	0	5
	Total <i>Bact.</i>	55 ($82 \pm 10 \%$)	3	58 ($87 \pm 8 \%$)
<i>PCR2b</i> -	<i>Bact.</i> +	2	0	2
	<i>Bact.</i> -	2	5 ($8 \pm 6\%$)	7
	Total <i>Bact.</i>	4	5	9
<i>Bact.</i> +		52 ($78 \pm 10 \%$)	3	55 ($82 \pm 10 \%$)
<i>Bact.</i> -		7	5	12
Total <i>Bact.</i>		59 ($88 \pm 8 \%$)	8	67 (100 %)

Remarque : Aucun résultat *PCR2b* invalide après ré-analyse des échantillons invalides (3 animaux) dilués au 1/10.

Concernant les résultats discordants entre les différents tests, 2 animaux ont été détectés positifs en bactériologie et histologie (1/3 avec BAAR) mais négatifs en *PCR2b*. A l'inverse, 5 animaux ont eu des résultats positifs en *PCR2b* mais négatifs en bactériologie (Tableau II.2.10). De plus, 8 animaux positifs en *PCR2b* ont présenté des résultats bactériologiques et histologiques discordants : 3 animaux *Bact.* + & *Hist.* - (1/3 avec des lésions non tuberculeuses et 2/3 sans lésion) et 5 animaux *Bact.* - & *Hist.* + dont 2/5 avec BAAR. Par conséquent, la bactériologie seule n'avait pas permis la détection de deux animaux infectés à partir d'échantillons trouvés positifs en *PCR2b* et ayant présenté des lésions évocatrices de Tb avec des BAAR.

Par contraste, aucun animal n'a été détecté positif en *PCR2b* lorsque les résultats bactériologique & histologique étaient simultanément négatifs. De même, aucun animal n'a été identifié comme positif en bactériologie alors qu'il était simultanément négatif en *PCR2b* & histologie. La *PCR2b* a donc permis de détecter autant d'animaux infectés que la bactériologie.

Par ailleurs, 5 animaux ont obtenu des résultats négatifs aux trois tests (*PCR2b*, *Bact.* et *Hist.*). On peut également remarquer que l'histologie a permis de détecter 2 animaux alors que les autres tests étaient négatifs (*PCR2b* et bactériologie). Au total 60 animaux ($90 \pm 7\%$) ont eu des résultats positifs à au moins deux des trois tests.

Enfin, aucun résultat de la *PCR2b* n'a été reconnu invalide (après ré-analyse des échantillons invalides dilués au 1/10, si nécessaire).

II. Etudes de la spécificité diagnostique de la PCR

II.1. Etude de la spécificité diagnostique opérationnelle de la PCR

L'analyse des résultats bruts (Tableau II.2.11) permet de vérifier que tous les animaux ont été retrouvés négatifs en bactériologie (100 %), (négativité de la bactériologie directement liée au statut indemne des cheptels).

La PCR a détecté davantage d'animaux négatifs ($97 \pm 5\%$) que l'histologie ($76 \pm 13\%$) (Tableau II.2.11).

La combinaison des résultats des différentes techniques (par animal) indique des concordances de $97 \pm 5\%$ (37/38), $79 \pm 13\%$ (30/38), $76 \pm 13\%$ (29/38) et $76 \pm 13\%$ (29/38) respectivement entre la PCR & la bactériologie, la PCR & l'histologie, la bactériologie & l'histologie et la PCR, la bactériologie & l'histologie (Tableau II.2.11).

Tableau II.2.11. Résultats de la PCR (*PCR1* ou *PCR2b*), de l'histologie (*Hist.*) et de la bactériologie (*Bact.*) obtenus dans l'étude de la spécificité diagnostique opérationnelle de la PCR (n=38).

		<i>Hist.</i> +	<i>Hist.</i> -	Total <i>Hist.</i>
<i>PCR</i> +	<i>Bact.</i> +	0	0	0
	<i>Bact.</i> -	1 ¹	0	1
	Total <i>Bact.</i>	1	0	1
<i>PCR</i> -	<i>Bact.</i> +	0	0	0
	<i>Bact.</i> -	8 ² ($21 \pm 13\%$)	29 ³	37
	Total <i>Bact.</i>	8	29	37 ($97 \pm 5\%$)
<i>Bact.</i> +		0	0	0
<i>Bact.</i> -		9	29	38 (100 %)
Total <i>Bact.</i>		9	29 ($76 \pm 13\%$)	38

¹/ Animal initialement analysé en *PCR1* et a posteriori également trouvé positif en *PCR2b* ;

²/ 5 et 3 animaux analysés respectivement en *PCR1* et *PCR2b* (+ isolement de *M. avium* sur un animal) ;

³/ 14 et 15 animaux analysés en *PCR1* et *PCR2b* respectivement ;

Remarque : 2/38 animaux ont eu des résultats invalides en PCR (*PCR1*) puis ont été retrouvés négatifs après ré-analyse (après dilution) en *PCR1* et *PCR2b*. Ces 2 animaux correspondent à 2 échantillons qui étaient également négatifs en *Hist.* (lésions non tuberculeuses) & *Bact.*

Concernant les résultats discordants entre les différents tests, 8 animaux ont été retrouvés négatifs en bactériologie et *PCR* mais positifs en histologie (2/3 avec BAAR). En outre, 1 seul animal a été détecté positif en *PCR* et histologie. Par ailleurs, aucun animal n'a été trouvé positif en *PCR* alors que négatif en bactériologie et histologie (Tableau II.2.11).

II.2. Etude de la spécificité de la *PCR2b* conditionnelle à l'identification de bactéries n'appartenant pas au MTBC

Les résultats des 68 échantillons (sélectionnés pour l'étude de la spécificité de la *PCR2b* conditionnelle à l'identification de bactéries n'appartenant pas au MTBC) analysés en *PCR2b* sont présentés dans le Tableau II.2.12, en fonction des résultats bactériologiques détaillés obtenus. Ainsi, 100 % des résultats des échantillons de l'étude ont été rendus négatifs en *PCR2b* (Tableau II.2.12). La *PCR2b* n'a donc pas détecté directement à partir de ganglions infectés, de mycobactéries du MAC (*M. avium avium* ou *M. intracellulare*), de mycobactéries atypiques telles que *M. intermedium*, *M. nonchromogenicum*, *M. szulgai* et *M. xenopi*, des bactéries n'appartenant pas au genre *Mycobacterium*, comme *Streptomyces albus*. Au regard de ces 68 résultats négatifs, la spécificité de la *PCR2b* conditionnelle à l'identification de bactéries n'appartenant pas au MTBC semble excellente.

Tableau II.2.12. Résultats des échantillons analysés par *PCR2b* en fonction des différents résultats bactériologiques (janvier 2007-mai 2010) pour l'étude de la spécificité de la *PCR2b* conditionnelle à l'identification de bactéries n'appartenant pas au MTBC (n=68).

		Années					Nombre de Résultats <i>PCR2b</i> Négatifs
		2007	2008	2009	2010*	Total	
47 Mycobactéries	Mycobactéries du complexe <i>M. avium</i> (MAC)	0	1	8	2	11 ²	11
	Mycobactéries atypiques n'appartenant ni à MTBC ni à MAC	0	3	23	12	38 ¹	38
Bactéries n'appartenant pas au genre <i>Mycobacterium</i>		0	0	10	9	19 ³	19
Total		0	4	41	23	68	68

¹/ 1 *M. szulgai* et 1 *M. xenopi* (isolés de blaireaux) ; 1 *M. intermedium* et 13 *M. nonchromogenicum* ;

²/ 1 *M. intracellulare* (isolé d'un rat-kangourou) et 3 *M. avium avium* ; ³/ 1 *Streptomyces albus* ; * : au 25/05/10.

Discussion

I. La sensibilité diagnostique de la PCR

I.1. Etude de la sensibilité de la PCR1

La combinaison des différents résultats obtenus par animal montre que les meilleures concordances étaient constatées entre la PCR1 et l'histologie ($84 \pm 8 \%$). De plus, l'analyse des résultats indique que la PCR1 permet une amélioration (de $33 \pm 14 \%$) de la détection de la Tb, par comparaison à la bactériologie.

De même, le niveau observé de sensibilité de la PCR1 permet de disposer d'une bonne valeur prédictive négative (VPN) de la combinaison PCR1 & histologie car aucun animal n'est positif en *Bact.* et négatif en PCR1 & *Hist.* ; comme d'une bonne VPN de la PCR1 car seulement 1/77 animal positif en *Bact.* & *Hist.* est négatif en PCR1 (également négatif en PCR-Afssa, résultat non présenté).

En outre, 1 animal a été détecté positif en PCR1 mais n'a pas été confirmé positif par la bactériologie et l'histologie. Toutefois, l'échantillon provenant de cet animal a été analysé avec le test PCR IS6110 de l'Afssa-Lerpaz (résultats non présentés) et a été également identifié comme positif. Au regard de ces résultats, la valeur prédictive positive (VPP) de la PCR1 semble satisfaisante.

Comme 60/77 animaux ($78 \pm 9 \%$) ont été retrouvés positifs à au moins deux des trois tests (PCR1, *Hist.* et *Bact.*), ce constat laisse présager que la PCR1 pourrait dans des conditions particulières, participer aisément au processus de prise de décisions réglementaires. En effet, son utilisation conjointe à l'histologie présente une excellente VPN ce qui permettrait une requalification sous huit jours des cheptels suspects suite à la découverte d'une lésion.

Concernant les 9 animaux restants, 4 d'entre eux ont été positifs en histologie et négatifs en PCR1 (également négatifs en PCR-Afssa, résultats non présentés) et bactériologie. Ceci peut s'expliquer soit par un manque de spécificité de l'examen histologique ou soit par un effet échantillon. En effet, quand un échantillon avec une lésion très petite (miliaire) est coupé en deux morceaux (l'un pour l'analyse histologique et l'autre pour les analyses bactériologiques & PCR), il arrive que la lésion n'ait pas été divisée en deux parties similaires et que subséquemment, l'un des morceaux de tissus ne présente pas bactérie détectable. Par conséquent, il est concevable de supposer (pour ces 4 cas) que le morceau d'échantillon

portant la lésion ait été analysé par histologie et que l'autre morceau sans lésion ait été analysé par *PCR1* et bactériologie.

Enfin, les 4 animaux avec des résultats *PCR1* invalides sont restés invalides après une dilution au 1/10. Celui qui était positif en bactériologie et histologie a été également trouvé négatif par PCR-Afssa (résultat non présenté). Il en est de même pour celui qui était seulement positif en histologie (mais sans BAAR). Bien que ces échantillons aux résultats invalides aient été retrouvés négatifs par PCR-Afssa, ces inhibitions de la *PCR1* demeurent un problème à résoudre.

I.2. Etude comparative entre *PCR1* et *PCR2*

Afin de résoudre les problèmes liés aux invalidités incertaines de la *PCR1*, une nouvelle version de la *PCR* utilisant un IPC exogène, la *PCR2* basée sur deux systèmes différents d'amplification l'un en monocupule (*PCR2m*) et l'autre bicupule (*PCR2b*), a été développée, puis comparée à la *PCR1* (monocupule) à partir de deux études successives.

L'étude comparative 1 (entre la *PCR1* et la *PCR2*) a montré que la *PCR2m* engendrait plus de résultats invalides que la *PCR1*. De plus, elle apparaît beaucoup moins sensible que la *PCR1*. De ce fait et comme, de surcroît, elle n'améliore pas la sensibilité de détection du MTBC, elle ne peut pas être utilisée comme test de diagnostic.

Par contre, les résultats combinés de l'étude comparative 1 ont montré que la meilleure concordance était constatée entre la *PCR2b* et la bactériologie ($88 \pm 10\%$). De même, la *PCR2b* permet d'améliorer la sensibilité de détection du MTBC puisqu'elle a permis de détecter deux échantillons supplémentaires, également positifs en bactériologie, par comparaison avec la *PCR1*. De plus, pour un échantillon positif en *PCR1* et en *PCR2b*, le Ct_{IS6110} obtenu avec la *PCR2b* est inférieur d'une unité à celui obtenu avec la *PCR1* dans 15/16 cas. La *PCR2b* semble donc plus sensible que la *PCR1*. De plus, il apparaît moins de résultats invalides en *PCR2b* qu'en *PCR1*. Ces résultats montrent que l'IPC est plus robuste s'il est exogène (par rapport à l'endogène). Enfin, l'IPC exogène permet la mise en évidence des inhibitions partielles grâce au contrôle de la valeur attendue.

Par conséquent, la *PCR2b* pourrait donc remplacer la *PCR1* afin d'améliorer la sensibilité de l'analyse *PCR* et permettre de réduire le pourcentage d'inhibitions voire de les éliminer totalement (dans le cadre de mon étude) après dilution.

Par ailleurs, les résultats de l'étude comparative 2 permettent de confirmer ceux de la première étude. En effet, l'analyse des 23 échantillons supplémentaires a montré que le Ct_{IS6110} obtenu avec la *PCR2b* était inférieur d'une unité pour les 20 échantillons positifs aux deux tests (*PCR* et *Bact.*).

En conclusion, la *PCR2b* nécessitait d'être retenue et utilisée à la place de la *PCR1*. En outre, l'étude comparative entre la *PCR2b* et la PCR-Afssa présentée en Annexe XV, a également montré que ces tests PCR IS6110 étaient tous deux aussi sensibles que la bactériologie.

Toutefois, ces résultats (entre la *PCR2b* et la bactériologie) obtenus à partir d'un nombre réduit d'échantillons devaient être confirmés par une étude plus complète de sensibilité diagnostique de cette *PCR2b*.

I.3. Etude de la sensibilité de la *PCR2b*

La combinaison des différents résultats obtenus par animaux a montré que les meilleures concordances sont retrouvées entre la *PCR2b* (version retenue) et, la bactériologie ou l'histologie (90 ± 7 % dans les deux cas).

De plus, les résultats indiquent que la *PCR2b* détecte autant d'animaux infectés que la bactériologie. De même, la sensibilité de la *PCR2b* est élevée (5 animaux positifs en *PCR2b* mais négatifs en *Bact.*) et permet une bonne VPN de la combinaison *PCR2b* & histologie car aucun animal n'est positif en *Bact.* et négatif en *PCR2b* & *Hist.* ; comme une bonne VPN de la *PCR2b* car seulement 2 animaux positifs *Bact.* & *Hist.* sont négatifs en *PCR2b* (et PCR-Afssa, résultats non présentés).

En outre, comme les résultats *PCR2b* positifs, obtenus dans cette étude, ont toujours été confirmés par l'un et/ou l'autre des tests officiels (*Bact.* ou *Hist.*) – aucun animal négatif en *Bact.* & *Hist.* et positif en *PCR2b* –, alors la VPP de la *PCR2b* est excellente. Par ailleurs, la combinaison des trois tests semble excellente pour améliorer le diagnostic de la Tb car 90 ± 7 % des animaux (60 animaux) ont été détectés positifs à au moins deux des trois tests.

Concernant, les 10 ± 9 % d'animaux restants (soit 10 animaux), deux d'entre eux ont été positifs uniquement en histologie (présence de lésions évocatrices de Tb sans BAAR et négatifs en *PCR2b* & *Bact.* et PCR-Afssa (résultats non présentés)). Ceci peut s'expliquer par un effet échantillon ou un manque de spécificité de l'histologie.

En conclusion, la *PCR2b* semble être une bonne méthode complémentaire de diagnostic de la Tb. Son utilisation en tant que troisième test permettrait de confirmer les résultats histologiques dans le cas de résultats concordants ou d'inciter d'autres processus d'investigations (Cf. § III. relatif aux avantages diagnostiques de la *PCR2b* après évaluation de ses performances (ci-après, page 208)) sans attendre le résultat bactériologique, dans le cas de résultats discordants.

I.4. Evaluation des études de sensibilités diagnostiques des *PCR1* et *PCR2b*

Les deux études de sensibilité diagnostique de la *PCR* ont montré que sa sensibilité était bonne puisque comprise entre celles de l'histologie (la plus sensible) et de la bactériologie. Par ailleurs, les concordances entre les trois techniques ont été significativement meilleures avec la *PCR2b* ($81 \pm 10\%$) plutôt qu'avec la *PCR1* ($66 \pm 11\%$). De même, les pourcentages d'animaux positifs en *PCR* dans chacune des études respectives ont été estimés à $85 \pm 9\%$ pour la *PCR2b* et seulement à $77 \pm 10\%$ pour la *PCR1*. De plus, $73 \pm 11\%$ des animaux (49/67) de l'étude de la sensibilité de la *PCR2b* ont été reconnus positifs par les trois techniques par comparaison avec l'étude de la sensibilité de la *PCR1* où seulement $55 \pm 11\%$ des animaux (42/77) avaient été découverts par les trois techniques.

L'utilisation de la *PCR2* comme troisième test permet donc de découvrir davantage d'animaux infectés.

L'ensemble de ces résultats permet de confirmer que la *PCR2b* est plus sensible que la *PCR1*. De plus, aucun résultat n'ayant été rendu invalide en *PCR2b*, celle-ci engendre moins d'inhibition de l'analyse PCR.

II. La spécificité diagnostique de la *PCR*

II.1. Etude de la spécificité opérationnelle de la *PCR*

Dans cette étude de la spécificité diagnostique opérationnelle de la *PCR*, la combinaison des différents résultats obtenus par animal montre que les meilleures concordances sont retrouvées entre la *PCR* et la bactériologie ($97 \pm 3\%$ (37/38)). En effet, la *PCR* et la bactériologie ont présenté largement plus de résultats concordants que les tests officiels (*Hist.* & *Bact.*, $79 \pm 13\%$ (30/38)).

En outre, comme seulement un animal a été trouvé positif en *PCR* et que de surcroît, il a été confirmé en histologie (aucun animal positif en *PCR* et négatif en *Bact.* et *Hist.*), cela signifie

que la spécificité de la *PCR* ainsi que sa VPP sont excellentes par rapport aux deux tests officiels combinés.

De plus, cet animal positif en *PCR* et histologie mais non confirmé par la bactériologie (en 2006), a été également détecté positif par PCR-Afssa (même valeur de Ct, résultat non présenté). Toutefois, aucune autre recherche n'a été effectuée *a posteriori* dans ce cheptel et, de plus, ce cheptel n'existe plus depuis 2008. Nous pouvons alors suspecter une déficience de détection de la bactériologie. En conséquence, cet animal devrait être ôté de l'effectif de l'étude et la spécificité du test *PCR2b* serait parfaite, de 100 % (37/37).

Enfin, concernant les 8 animaux négatifs en *PCR* et bactériologie mais présentant pourtant des lésions évocatrices de Tb, ces divergences de résultats pourraient s'expliquer soit par un effet échantillon ou soit par un manque de spécificité de l'histologie puisque ces 8 animaux ont été également détectés négatifs par PCR-Afssa (résultats non présentés) et que, de surcroît, *M. avium* a été isolé sur un de ces animaux (Tableau II.2.10).

En conclusion, la *PCR* (*PCR1* ou *PCR2b*) pourrait d'un point de vue diagnostique, être considérée comme très spécifique.

II.2. Etude de la spécificité de la *PCR2b* conditionnelle à l'identification de bactéries n'appartenant pas au MTBC et comparaison avec l'étude de sa spécificité analytique

Les résultats de cette étude montrent que tous les échantillons trouvés négatifs pour le MTBC après identifications bactériologiques, entre janvier 2008 et mai 2010 en Dordogne, ont été également retrouvés négatifs en *PCR2b*.

La spécificité de la *PCR2b* conditionnelle à l'identification de bactéries n'appartenant pas au MTBC (telles que des mycobactéries du MAC (*M. intracellulare*, *M. avium avium*), des mycobactéries atypiques (*M. nonchromogenicum*, *M. szulgai*, *M. intermedium*, *M. xenopi*), et des bactéries n'appartenant pas au genre *Mycobacterium* (*Streptomyces albus*)) semble donc excellente.

De même, l'étude de spécificité analytique du test montre que certaines de ces mycobactéries testées comme *M. intracellulare*, *M. avium avium*, *M. nonchromogenicum*, *M. intermedium* ne sont pas non plus détectées par *PCR2b* à partir de souches isolées. Seule *M. xenopi* a été détectée à partir d'une souche isolée d'un blaireau (PCR « sur souche »).

Concernant les 5 mycobactéries atypiques (*M. flavescens*, *M. gastri*, *M. gordonae*, *M. paraffinicum* et *M. xenopi*) issues d'isolements qui ont été détectées par *PCR2b*, elles

n'ont encore jamais été isolées de tissus bovins en France. De plus, si cela était le cas, leur quantité limite détectable devrait être forte à la différence de *M. bovis*. En effet, pour une même valeur de Ct, la concentration de génome utilisée était beaucoup plus forte (100 fois plus) que celle de *M. bovis* monocopie (par ex., pour un Ct d'environ 35, 10^{-4} ng/ μ l (10^2 fg/ μ l) de *M. bovis* monocopie et 10^{-2} ng/ μ l de mycobactéries atypiques (sauf *M. xenopi*, non quantifiée)). Or, comme la quantité de bacille dans les tissus bovins est largement moins forte qu'après isolement, il est donc improbable que ces mycobactéries soient détectées par *PCR2b*. Cette forte présomption est en partie appuyée par le fait que *M. xenopi* a été détectée par *PCR2b* (et PCR-Afssa) à partir d'une souche isolée d'un ganglion de blaireau mais pas directement à partir du ganglion.

Par conséquent, nous pouvons attester que cette PCR IS6110 présente une excellente spécificité puisqu'elle ne détecte pas les mycobactéries du MAC. Néanmoins, sa spécificité est moins bonne concernant l'absence de détection des mycobactéries atypiques lorsqu'elle est utilisée pour la détection de souche isolée.

Sa spécificité terrain, pour le diagnostic des bovidés semble donc excellente.

III. Les avantages diagnostiques de la *PCR2b* après évaluation de ses performances

Le jugement ne vise pas à comparer la *PCR* à la bactériologie dans le but de la remplacer purement et simplement dans le cadre de la lutte contre la tuberculose bovine, mais de voir quel gain on peut obtenir en y ayant recours tout en combinant judicieusement les méthodes déjà disponibles.

La sensibilité de la *PCR2b* est excellente puisqu'elle est au moins aussi bonne que celle de la bactériologie. De même, sa spécificité est très satisfaisante (pour une utilisation chez les bovins) puisque ce travail a montré l'absence de résultat « faussement positif » dans un contexte réellement « indemne ». Enfin, les résultats de nos études ont montré que la VPP de la *PCR2b* était très satisfaisante vis-à-vis des tests officiels (toutes les PCR+ confirmées par *Hist.* et/ou *Bact.*).

Ainsi, dans le cas d'un résultat positif en *PCR2b*, en accord avec le résultat histologique, l'utilisation de la *PCR2b* comme test de diagnostic complémentaire permettrait d'accélérer la notification d'infection de Tb et par conséquent, un gain de temps d'au moins 2,5 mois par rapport à la bactériologie sur les prises de décision.

De même, un animal non-négatif en IDS et/ou en IDC et sans lésion histologique évocatrice de Tb mais positif au test *PCR2b*, pourrait être déclaré infecté avant même la fin de l'analyse bactériologique.

Par conséquent, l'inclusion de la méthode *PCR2b* pour la gestion des suspicions à l'abattoir ou dans le cadre d'abattage diagnostique, permettrait de raccourcir considérablement les délais de confirmation ce qui constitue un avantage opérationnel crucial.

En outre, dans le cas d'un animal, suspecté à l'abattoir mais négatif en histologie, issu d'un cheptel qualifié indemne de Tb et en l'absence d'animaux complémentaires positifs en IDT dans ce cheptel, la méthode *PCR2b* serait fortement utile afin d'éviter d'attendre le résultat bactériologique pour prendre une décision sur l'état sanitaire du cheptel au regard de la Tb (restitution de sa qualification ou déclaration d'infection). Toutefois, la VPN de la méthode *PCR* n'est pas suffisante pour qu'un résultat négatif en *PCR2b* soit utilisable seul quel que soit le contexte épidémiologique : nécessité impérieuse d'un contexte très favorable*.

De plus, ce résultat négatif en *PCR2b* devrait obligatoirement concorder avec celui de l'histologie puisque *M. bovis* n'a jamais été mise en évidence dans cette étude chez un animal négatif en histologie et *PCR* (*PCR2b* ou *PCR1*). Ainsi, la combinaison de résultats négatifs en *PCR2b* & histologie pourrait, seulement dans un contexte très favorable*, rendre possible la requalification du cheptel sans attendre le résultat bactériologique.

Par conséquent, la *PCR2b* permettrait en complément de l'histologie et de la bactériologie, d'améliorer le diagnostic règlementaire actuel de la Tb (AM du 15 septembre 2003 modifié* ; (Cf. Figures II.1.3 et II.1.4, arbres décisionnels)).

Cependant, la bactériologie reste un outil indispensable en épidémiologie moléculaire (typage des souches isolées) ainsi qu'un outil de confirmation définitive de l'infection par *M. bovis* irréfutable en cas de litige.

* **Contexte très favorable** : soit un cheptel indemne de Tb depuis plusieurs années (aucun animal déclaré infecté (bactériologie positive) depuis 2001), provenant d'une zone indemne de Tb et ne présentant aucun lien épidémiologique (voisinage, introduction) avec un cheptel infecté.

Conclusion

L'objectif du travail exposé dans ce sous-chapitre était d'évaluer sur le terrain la sensibilité et la spécificité opérationnelle de la méthode PCR IS6110 de LSI par comparaison avec la bactériologie et l'histologie.

La version finale de cette *PCR* fondée sur l'utilisation d'un IPC exogène et d'un système d'amplification en bicupule (*PCR2b*) a été démontrée comme la plus sensible et celle qui permet d'éviter des résultats invalides en *PCR* en l'absence d'inhibition de l'analyse.

En outre, la *PCR2b* permet de détecter autant d'animaux infectés que la bactériologie et sa VPP est excellente. De même, elle présente une excellente spécificité diagnostique.

En conclusion, au regard de ces résultats, cette méthode *PCR* apparaît être un outil rapide et fiable de diagnostic de la Tb qui, utilisée en complément des tests officiels, pourrait améliorer considérablement le diagnostic règlementaire (AM du 15 septembre 2003 modifié*). Ainsi, la méthode *PCR* permettrait des prises de décisions plus précoces, dans des cas particuliers définis. Néanmoins, la bactériologie reste essentielle pour les enquêtes épidémiologiques et en cas de litige.

Chapitre 3 :

Discussion Générale

Bilan de l'intégration des deux tests dans le dispositif de lutte contre la Tuberculose bovine

I. Bilan de l'intégration des tests IFN γ (Bovigam[®]) modifié et PCR IS6110 en temps réel (TaqVet[®] MTBC) dans le dispositif de lutte contre la Tb en Dordogne (2007-2010)

Le bilan de l'intégration des tests IFN γ (Bovigam[®]) modifié et PCR IS6110 en temps réel (TaqVet[®] MTBC) dans le dispositif de lutte contre la Tb en Dordogne entre 2007 et 2010 (mai) peut être décrit à partir du tableau II.3.1 présentant l'évolution de la Tb (suspensions, requalifications et foyers déclarés) en Dordogne.

Tableau II.3.1. Données chiffrées de l'évolution de Tb en Dordogne de 2005 à mai 2010*
(document DDCSPP 24 (ex DDSV24)).

	2005	2006	2007	2008	2009	2010*
Nombre de cheptels suspendus (%)	60	87	215 (5,1 %)	169 (7,5 %)	136 (5,5 %)	149 (5,6 %)
Nombre de cheptels infectés	13	29	24	13	13	15
Nombre de cheptels abattus	12	29	24	12	13	14
Nombre de bovins abattus	1322	2506	2225	1253	1580	1457
Nombre de bovins à lésions	56	140	50	42	48	—
Taux d'infection apparent	4,2 %	5,6 %	2,2 %	3,5 %	3,0 %	—
Nombre de cheptels dépistés :						
- en prophylaxie	4	12	18	11	10	10
- par liens épidémiologiques	3	8	1	0	0	4
- en abattoirs	6	8	5	2	3	1
- par réhabilitations	0	1	0	0	0	0
Montant de l'indemnisation (€)	1 727 069	2 517 717	3 714 223	2 108 114	3 100 000 (estimation)	—

I.1. Evaluation de la situation en Dordogne suite à l'utilisation du test IFN γ après une IDS non-négative (2007-2009)

I.1.1. Amélioration de la prophylaxie et de la détection des foyers

Bien que le nombre de foyers ait diminué à partir de 2008 (foyers : 29 en 2006, 24 en 2007 et 13 en 2008), il est resté élevé et stagne à ce jour (foyers : 13 en 2009 et 15 en 2010 (mai)). Comme le pic des foyers était antérieur à la mise en place du protocole basé sur le test IFN γ ,

ce test n'était donc pas à l'origine de l'augmentation du nombre de foyers détectés en Dordogne.

En effet, comme nous l'avons précisé précédemment, une adaptation locale du rythme des prophylaxies dans les communes des cheptels infectés (sans arrêté préfectoral, mais avec une adhésion des éleveurs) avait contribué à la découverte d'un grand nombre de foyers en 2006 (12/29 en prophylaxie). Cet accroissement était donc la résultante d'une meilleure efficacité de la prophylaxie et non d'une progression de l'infection. La preuve objective provient de la comparaison du nombre d'élevages suspects (cheptels suspendus) suite à une IDS non-négative, avant et à partir de 2006 (en 2005 sur 60 élevages suspendus, 4 détectés en prophylaxie et 6 en abattoir alors qu'en 2006 sur 87 élevages suspendus, 12 détectés en prophylaxie et 8 en abattoir, tableaux II.3.1 et II.3.2) (Cf. Figure II.3.2). Ceci montre aussi que le protocole basé sur le test IFN γ n'a donc pas été à l'origine de l'augmentation du taux de déclaration des cheptels à IDS non-négative.

Tableau II.3.2. Cheptels suspendus (nombre) détectés en prophylaxie ou abattoir puis requalifiés ou déclarés infectés de Tb entre 2005 et 2010* (*janvier à mai 2010*), en Dordogne

			2005	2006	2007	2008	2009	2010*	2007-2010*
Nombre de Cheptels suspendus lors de <u>prophylaxie</u> (IDS Non-négatives)	Requalifiés	après tests IFN γ négatifs (1)	NR	NR	122	110	76	104	412
		après IDC négatives (2)	?	?	18	30	48	13	109
		après abattages diagnostiques (pas lésion) (3)	?	?	5	18	23	10	56
		après résultats bactériologiques négatifs (4)	?	?	?	?	?	2	2
		total (1+2+3+4)	?	?	145	158	147	129	579
	Infectés (dépiétés en prophylaxie)	4	12	18	11	10	10	65	
Total	4	12	163	169	157	139	?		
Nombre de Cheptels suspendus à <u>la suite d'une suspicion à l'abattoir</u>	Requalifiés	?	?	0	1	2	0	?	
	Infectés (dépiétés à l'abattoir)	6	8	5	2	3	1	11	
	Total	6	8	5	3	5	1	11	

(Tableau réalisé à partir de données de la DDCSPP 24 et du GDS 24 (données directes et celles de Ripoché M., 2009) NR/ non réalisé ; ?/ donnée non disponible ; les données en italiques sont approximatives car elles ont été calculées sans tenir compte des données non disponibles.

Par ailleurs, les tableaux II.3.1 et II.3.2 montrent que depuis 2006, le dépistage des foyers est principalement réalisé en prophylaxie (4 en 2005, 12 en 2006, 18 en 2007, 11 en 2008, 10 en 2009, tableau II.3.2), comme en témoigne le maintien puis la baisse de détection des foyers dépistés à l'abattoir (6 en 2005, 8 en 2006, 5 en 2007, 2 en 2008, 3 en 2009, tableau II.3.2) ; par comparaison, entre 2002 et 2005 la détection des foyers était quasi-exclusivement en abattoir, tableau I.2.4). On peut observer sur la figure II.3.1, un pic correspondant aux cheptels détectés en prophylaxie en 2007 (18/24, tableau II.3.1).

Ceci est la conséquence du renforcement des mesures de prophylaxie (Arrêté préfectoral (AP) du 19 décembre 2006) appliqué depuis 2007 pour tout le département et sur tous les bovins de plus de 18 mois (campagne 2006-2007 : 95 % des cheptels bovins tuberculés alors que 50 % pour les années précédentes). De plus, la définition en 2008 d'une « zone à risque » où la prophylaxie est obligatoire chaque année (AP 21 novembre 2007) a renforcé le système de surveillance.

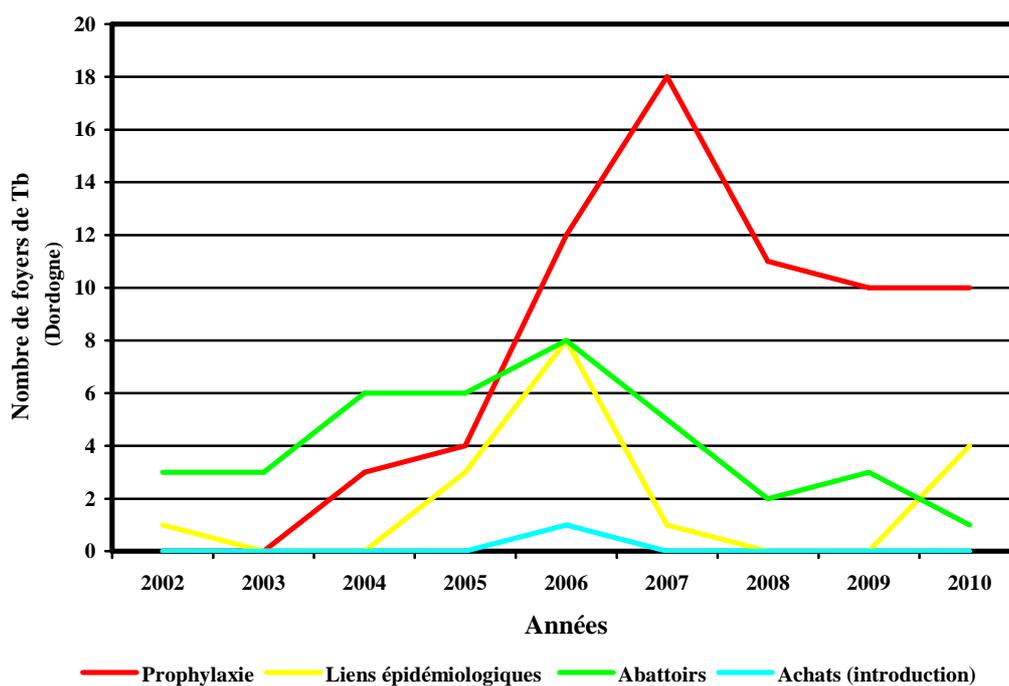


Figure II.3.1. Evolution des modes de détection (prophylaxie, liens épidémiologiques, abattoirs et achats (introduction)) des cheptels infectés de Dordogne entre janvier 2002 et mai 2010 (Document DDCSPP 24).

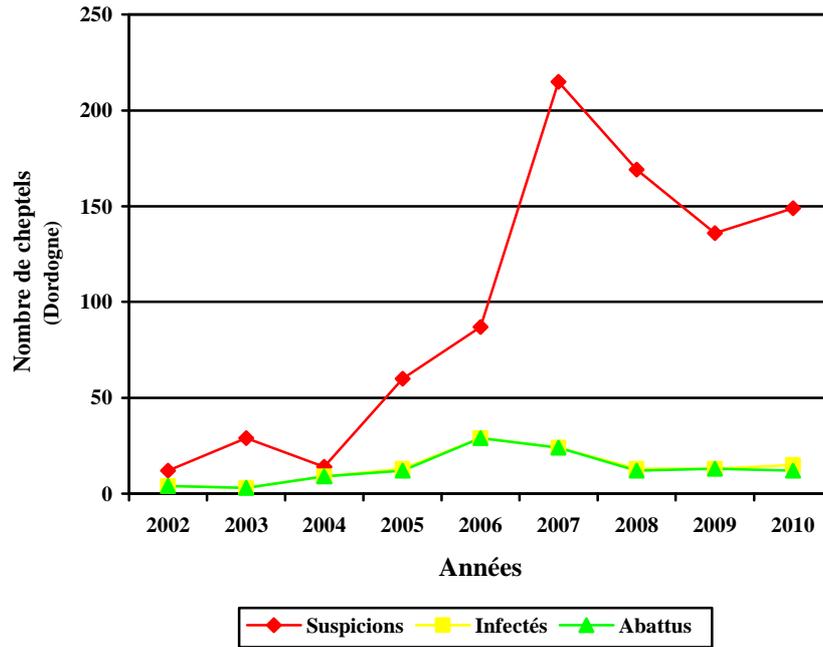


Figure II.3.2. Evolution du nombre de cheptels suspectés, infectés et abattus en Dordogne entre janvier 2002 et mai 2010 (Document DDCSPP 24).

I.1.2. Rôle clé du protocole IFN γ dans le maintien des déclarations des cheptels IDS non-négatifs

La mise en place du test IFN γ s'est avérée indispensable pour éviter une baisse de motivation des acteurs, engagés antérieurement dans un ensemble de résolutions visant à une meilleure détection des élevages infectés, grâce à un raccourcissement très important des délais. Ainsi, le nombre de cheptels déclarés à IDS non-négatives s'est maintenu depuis 2006 ce qui n'aurait peut-être pas été le cas sans le protocole IFN γ permettant une requalification rapide des cheptels négatifs au test.

En effet, entre 2007 et 2010, environ 71 % (412/ 579, tableau II.3.2) des cheptels requalifiés l'ont été grâce au test IFN γ , soit directement après une IDS non-négative, dans un délai de quelques jours suivant l'IDS (délai moyen en 2007 de 11 jours), contre 6 semaines minimum dans la procédure réglementaire basée sur l'IDC. Le protocole IFN γ a donc répondu aux attentes des éleveurs : réduire le temps de suspension des cheptels car les conséquences économiques (et psychologiques) subies par les éleveurs sont proportionnelles à ce délai, et sont d'autant plus importantes si le cheptel est laitier ou bien labellisé. Avec un délai moyen actuel de suspension de moins d'une semaine, les répercussions sont donc minimales pour

l'éleveur et par conséquent, la déclaration d'un bovin non-négatif en IDS n'est plus pénalisante pour un cheptel indemne.

I.1.3. Réduction du nombre d'abattages diagnostiques

En raison du renforcement des mesures de détection à partir de 2006, le nombre de cheptels suspendus a augmenté de façon importante. Subséquemment, entre 2005 et 2006, le nombre d'abattages diagnostiques (bovins) a également fortement augmenté (Tableau II.3.2). Avec la mise en place du protocole IFN γ en 2007 (campagne prophylactique 2006-2007) et le dépistage par IDS généralisé sur l'ensemble du département, le taux de déclaration des IDS non-négatives a continué à augmenter (Tableau II.3.2). Toutefois, de 2007 à 2009 comme 63 % (308 cheptels requalifiés après test IFN γ négatif / [(450 requalifiés + 39 infectés) = 489 cheptels suspendus par IDS], tableau II.3.2) de ces cheptels ont été retrouvés négatifs au test IFN γ et requalifiés directement, seuls les cheptels IFN γ positifs (et les susceptibles avec un résultat divergent) ont été soumis à l'IDC, soit environ 37 % (100 % – 63 %) des IDS au lieu de 100 %.

Le taux de cheptels infectés parmi les non-requalifiés (par le test IFN γ) soumis à l'IDC a donc augmenté en 2007 (données non présentées), ce qui permettait de rentabiliser la suite de la procédure mais entraînait une diminution des abattages diagnostiques (Tableau II.3.2). Ceci explique pourquoi le nombre d'abattages diagnostiques a chuté (84 bovins en 2006 *versus* 40 et 37 en 2007 et 2008, [données GDS 24 extraites de Ripoche M., 2009]) alors que le nombre de cheptels déclarés à IDS non-négatives a augmenté (125 en 2006 *vs* 172 en 2008, données GDS 24 extraites de Ripoche M., 2009).

I.2. Evaluation de l'utilisation du test PCR IS6110 en temps réel en Dordogne (2006-2009)

Depuis la fin d'année 2006 au milieu d'année 2009, la méthode PCR était systématiquement utilisée en Dordogne alors que son résultat n'était pas employé pour confirmer ou infirmer le diagnostic de Tb. Toutefois, il permettait le plus souvent de conforter le diagnostic de tuberculose, et ses conséquences (abattage total du cheptel), qui reposait à l'époque sur une IDC non-négative associée à l'observation de lésions tuberculeuses sur un même animal confirmées par un résultat positif en histologie, ce diagnostic étant fréquemment contesté par l'éleveur. De même, dans le cas de découverte d'abattoir, un résultat positif concordant avec

l'histologie permettait d'apporter une garantie supplémentaire dans la qualité du diagnostic et par conséquent, l'attente du résultat bactériologique était mieux supportée.

Certaines décisions (abattage diagnostique, abattage total) ou l'attente du résultat bactériologique étaient donc mieux acceptées grâce à l'association bénéfique de la PCR à l'histologie, dont cette méthode compense le manque de spécificité, tout en donnant un résultat aussi sensible que la bactériologie mais dans un délai largement plus rapide.

Dans le cas de résultats positifs en PCR mais négatifs en histologie alors, la PCR permettait d'orienter le diagnostic et d'inciter à la réalisation d'IDC sur le cheptel, en attendant la confirmation bactériologique.

II. Evolution 2007-2010 de la réglementation relative à la lutte contre Tb en France

- Intégration des tests IFN γ et PCR dans le dispositif règlementaire de lutte contre la Tb

L'arrêté du 15 septembre 2003 modifié* en vigueur en 2007, autorisait le recours au test de dosage d'IFN γ pour le diagnostic de la Tb (dans les troupeaux suspects ou infectés) mais aucun texte décrivant son cadre d'utilisation précis n'était diffusé. La méthode PCR n'était, quant à elle, pas mentionnée.

Bien que des modalités de mise en œuvre du dosage d'IFN γ aient été précisées par la **note de service du 30 juillet 2007**, pour les cheptels de races d'intérêt locales (en Camargue), infectés, suspects ou susceptibles d'être infectés et ce, dans le cadre d'abattage sélectif ou diagnostique, l'application du test IFN γ en Dordogne n'était encore qu'expérimentale mais avec l'accord des autorités locales et la participation financière de la DGAI.

Dans **un rapport d'appui scientifique et technique de l'Afssa**, transmis par la DGAI le **10 juillet 2008**, relatif à l'évaluation du « protocole IFN γ » appliqué en Dordogne pour la gestion des suspicions lors des prophylaxies, des recommandations de mise en œuvre de ce test avaient été formulées. En effet, il y était notamment précisé d'appliquer le test IFN γ modifié (basé systématiquement sur les PPD et le mélange d'antigènes spécifiques (les protéines recombinantes, ESAT6 & CFP10)), sur des animaux réagissants à l'IDS (non-négatifs) mais aussi, d'effectuer la prise de sang pour le test IFN γ lors de la lecture de l'IDS (soit à 3 jours au lieu de 10) et d'inclure un témoin d'immunocompétence (PWM).

Tous ces conseils avaient été néanmoins pris en compte pour la campagne de prophylaxie 2007-2008 (décrit précédemment dans ce manuscrit). Par ailleurs, cet avis soulignait qu'il était tout à fait justifié de réaliser des études de spécificité et de sensibilité de ce test.

Puis, **le 14 janvier 2009**, l'Afssa a rendu son **avis sur le projet d'arrêté** modifiant l'arrêté du 15 septembre 2003 (Avis Afssa 2008-SA-0263). Les plus importantes modifications présentées étaient des propositions d'adaptation du texte en fonction de la situation épidémiologique actuelle de la maladie et des nouveaux outils disponibles, les tests IFN γ et PCR. Ainsi, ces nouveaux tests ont été ajoutés aux tests classiques de dépistage et de diagnostic de la tuberculose bovine.

Suite à cet avis, **l'arrêté ministériel modifiant l'arrêté du 15 septembre 2003** est finalement paru **le 19 août 2009** et a été suivi **le 12 octobre 2009** d'une **note de service** faisant état des principales dispositions apportées par l'arrêté du 19 août 2009.

L'utilisation du test IFN γ modifié est donc désormais prévue lors des prophylaxies, des contrôles d'introduction et également en cas de dérogation à l'abattage total. Cependant, « le recours au test IFN γ est seulement réservé aux départements de la Dordogne et de la Côte d'Or et, en Camargue (pour certains troupeaux de races particulières) ».

En outre, la méthode PCR a été ajoutée comme méthode de diagnostic autorisée.

Ainsi, un bovin est considéré comme suspect d'être infecté « après constatation d'un résultat positif à une analyse par la méthode PCR réalisée par un laboratoire agréé » ou, « après constatation de réactions tuberculiques non-négatives et/ou de résultats non-négatifs au test de dosage de l'interféron gamma lors d'une opération de prophylaxie ou lors d'un autre contrôle quelle que soit la circonstance qui l'ait motivé » (Tableau II.3.3).

En outre, un bovin chez lequel sont observés « une PCR positive ainsi que des lésions histologiques évocatrices de Tb ou une IDT positive, est considéré comme infecté » (Tableau II.3.3).

Toutefois, les résultats positifs en PCR « ne sont reconnus comme tels qu'après confirmation par le LNR (Afssa-Lerpaz) ».

Tableau II.3.3. Catégories d'animaux redéfinies par les nouveaux textes règlementaires de la lutte contre la Tb chez les bovinés
(AM du 19/08/2009 modifiant l'AM du 15/09/2003 modifié* (article 12) et NS du 12/10/09).

Statut de l'animal	Caractéristiques
« indemne de Tb »	- Appartient à un troupeau officiellement indemne de Tb.
« contaminé de Tb »	- Appartient à un troupeau déclaré infecté de Tb mais n'est pas « infecté de Tb ».
« suspect d'être infecté de Tb »	- Présente des lésions évocatrices de Tb à l'abattoir ou l'autopsie ou - Présente des lésions histologiques évocatrices de Tb dans un laboratoire agréé ou <i>- Présente un résultat positif à une analyse par méthode PCR réalisée par un laboratoire agréé ou</i> <i>- Présente une IDT non-négative et/ou un résultat non-négatif au test IFNγ lors d'une opération de prophylaxie ou d'un autre contrôle.</i>
« infecté de Tb »	- Présente des signes cliniques de Tb et une IDT positive ou - A permis l'isolement et l'identification de <i>M. tuberculosis</i> ou <i>M. bovis</i> dans un laboratoire agréé ou - Présente une IDC positive et des lésions histologiques évocatrices de Tb ou <i>- Présente des lésions histologiques évocatrices de Tb associées à un résultat positif à une analyse par méthode PCR ou</i> <i>- Présente une IDS ou d'une IDC positive associée à une analyse PCR positive.</i>

N.B. : Les nouveaux critères sont décrits en italique

➤ Drogation à l'abattage total : conditions très strictes et utilisation des nouveaux outils

En 2007, l'assainissement d'un troupeau infecté de tuberculose régi par l'arrêté du 15 septembre 2003 modifié prévoyait un **abattage total** systématique de tout foyer confirmé de Tb (quelle que soit l'étendue de l'infection au sein du troupeau considéré). Cette politique d'abattage total restait la mieux adaptée, dans le contexte épidémiologique de très faible incidence, pour préserver le statut officiellement indemne du pays (Avis Afssa 2008-SA-0084). En effet, cette pratique se justifiait afin de favoriser l'éradication la plus rapide possible de l'infection sur le territoire français et éviter sa réémergence à partir de quelques foyers résiduels.

Un groupe de travail (formé des DDSV, laboratoires vétérinaires départementaux et GDS concernés et, de la DGAI, l'ENVA, la FNGDS, la SNGTV et l'Afssa) a été constitué en novembre 2007 pour conduire une réflexion sur l'adaptation des mesures de dépistage et de

gestion des foyers de Tb. L'objectif fixé était de « proposer des mesures de lutte appropriées et harmonisées, permettant d'aboutir à l'éradication de la maladie ».

Ainsi, dans un rapport de **2008** (à la DGAI), ce groupe de travail faisait état **des difficultés rencontrées sur le terrain**, en matière **d'application du dispositif d'abattage total**, à cause de la rémanence de la tuberculose dans les zones non encore assainies malgré les efforts entrepris. Il soulignait un certain découragement des acteurs locaux, relatif notamment au fait que, depuis ces dernières années, de nombreux foyers identifiés en Dordogne comme en Côte-d'Or ne comprenaient qu'un nombre très limité d'animaux tuberculeux (75 % des foyers avec un ou deux animaux infectés) alors que les abattages totaux avaient été suivis d'inspections systématiques à l'abattoir et de nombreuses investigations de laboratoire (tests IFN γ et PCR et tests conventionnels).

Après évaluation des coûts/bénéfices de l'abattage total dans de telles situations, ce groupe a élaboré un **protocole d'abattage partiel** qui a été ensuite **soumis pour avis au LNR (Tb)** de l'Afssa en septembre 2008.

En parallèle, **le 4 septembre 2008**, paraissait un **arrêté ministériel** relatif à la « possibilité de déroger à l'obligation d'assainissement par abattage total du troupeau infecté de Tb (en dehors des situations concernant les races d'intérêt locales), accordée dans les départements de la Dordogne et de la Côte d'Or, dans le cadre de la mise en œuvre d'un protocole expérimental et selon les modalités fixées par instruction du ministre chargé de l'agriculture ».

Cependant, cet arrêté a rapidement été suivi le **1^{er} octobre 2008** d'une **note de service**, précisant que l'abattage partiel à titre expérimental en cas de Tb était réservé à « certains cheptels éligibles des départements 21 et 24 » et que l'arrêté ne pouvait « pas être mis en œuvre immédiatement » étant donné que ses modalités et son application éventuelles n'étaient pas encore précisées.

En **novembre 2008**, l'Afssa a rendu son **avis sur « les conditions de suivi des cheptels abattus partiellement dans le cadre de la tuberculose en vue de leur requalification compte tenu des qualités intrinsèques des tests »** (tests IFN γ et PCR et tests conventionnels) (Avis Afssa 2008-SA-0167). Ainsi, le CES SA (comité d'experts scientifique en santé animale) « réaffirmait l'intérêt du recours à l'abattage total précoce des cheptels reconnus infectés dès lors qu'un risque de diffusion de la maladie ne peut être écarté ». Néanmoins, il « admettait l'opportunité d'envisager la possibilité d'assainir certains cheptels

reconnus infectés de tuberculose bovine en procédant à un abattage partiel des animaux, sachant que la prise en compte des tests IFN γ et PCR, grâce à leurs qualités spécifiques respectives, était de nature à améliorer le suivi des cheptels durant la phase d'assainissement ». Toutefois, il insistait sur la nécessité de prendre certaines « dispositions jugées de nature à limiter le risque de diffusion de la tuberculose bovine (tout en évitant d'éliminer la totalité des animaux) » ainsi que « la nécessité de prévoir un véritable retour d'expérience correspondant à un suivi scientifique précis de la mise en place du protocole, des résultats et notamment une évaluation de l'apport de l'emploi de l'IFN γ dans le protocole d'assainissement afin que des enseignements puissent être tirés et des ajustements effectués, le cas échéant ».

Suite à cet avis, une **lettre à diffusion limitée du 19 février 2009** relative à la « dérogation à l'abattage total à titre expérimental de certains troupeaux de bovins infectés de tuberculose dans les départements 21 et 24 », a permis d'informer les acteurs concernés par cette dérogation, des critères d'éligibilité et du protocole applicable.

Toutefois, ce document a été annulé et remplacé le **06 mai 2010 par une nouvelle lettre à diffusion limitée**, précisant les **modalités d'application de la dérogation à l'abattage total à titre expérimental** (décrits ci-après) : critères d'éligibilité, protocole applicable et modalité du retour d'expérience à communiquer à la DGAl avant le 31 janvier de chaque année pour ce qui concerne l'année n-1.

■ *Critères d'éligibilité :*

Cette dérogation à titre exceptionnel, est réservée aux exploitations de Dordogne et Côte d'Or infectées de Tb mais présentant un risque faible de diffusion de l'infection, évalué par étude de l'historique de l'élevage et d'une enquête épidémiologique objective (maîtrise du risque de diffusion dans la zone (gestion adaptée de l'occupation des pâtures, animal index porteur de lésions ganglionnaires stabilisées, % cumulé de bovins avec IDS + ou test IFN γ + ou PCR + (ou culture +), inférieur à 5 %). Après évaluation de l'éligibilité à la dérogation, la décision de la dérogation est prise par le Préfet après accord et engagement de l'éleveur.

■ *Modalités d'application :*

« Le protocole de dérogation comprend une phase d'assainissement suivie d'une phase de requalification avec un minimum de 4 contrôles des bovins de l'exploitation infectée ».

- *Phase 1 : Assainissement*

L'assainissement est réalisé à partir de deux contrôles consécutifs par IDS et test IFN γ utilisés systématiquement en série (espacés de 2 mois d'intervalle minimum) sur tous les bovins de plus de six semaines du cheptel concerné.

La proportion de tous les animaux avec « une IDS + ou un test IFN γ + » doit être inférieure ou égale à 5 % sinon ce protocole est obligatoirement interrompu au profit d'un abattage total. De plus, un abattage diagnostique est réalisé sur tous les animaux réagissants (positifs et douteux) ainsi que les animaux à risque identifiés par l'enquête épidémiologique initiale.

Par ailleurs, la culture, la PCR et éventuellement l'histologie (si lésion) sont réalisées sur les tous abattages diagnostiques. Cependant, si un animal présente des lésions ganglionnaires non stabilisées à l'abattoir (lésions ouvertes, signe d'une infection évolutive et donc risque accru de diffusion), alors l'assainissement par abattage partiel est stoppé au profit d'un abattage total. Il en est de même si le pourcentage cumulé de bovins avec « une IDS + et/ou un test IFN γ + et/ou des lésions évocatrices de Tb à l'abattoir confirmées par histologie, test PCR ou culture et/ou un test PCR + sans lésion associée et/ou une culture + sans test PCR +, ni lésion associée » dépasse 5 % de l'effectif du cheptel, après un ou plusieurs contrôles d'assainissement.

La phase d'assainissement par abattage partiel doit donc être obtenue en moins de 12 mois. Elle est réalisée à condition d'obtenir des résultats négatifs aux deux contrôles sur l'ensemble du cheptel.

- *Phase 2 : Requalification*

Avant de procéder aux contrôles de requalification par IDT, le nettoyage et la désinfection de l'exploitation sont mis en œuvre.

Ensuite, le 1^{er} contrôle par IDT (et test IFN γ éventuellement) est réalisé 2 mois au moins après le dernier contrôle d'assainissement favorable. Si au moins un animal présente un résultat défavorable en IDT alors « le protocole est repris à zéro (retour à un 1^{er} contrôle d'assainissement) ».

« La requalification est obtenue après 2 contrôles par IDT favorables (négatifs) sur l'ensemble des bovins de plus de 6 semaines, réalisés à 2-4 mois d'intervalle ». Toutefois, elle « doit être obtenue en moins de 2 ans » à compter de la mise en place du protocole. Au-delà de ces périodes, il est considéré que le protocole de dérogation a échoué », (il s'en suit un assainissement par abattage total du cheptel).

Il faut noter qu'afin d'écarter un risque de résurgence (malgré la rigueur avec laquelle les opérations de nettoyage et désinfection doivent être conduites), les experts scientifiques du CES SA recommandaient (dans des avis de 2009 (Afssa 2008-SA-0263 et 2009-SA-0109) portant sur le projet d'AM modifiant l'AM du 15/09/03) « un vide sanitaire après abattage total compris entre 15 jours et deux mois avant de réintroduire les animaux de remplacement » et un délai d'attente « de 30 jours minimum à 2 mois avant de réintroduire ces animaux sur des pâtures considérées contaminées » (maîtrise du risque de voisinage). Par contre, dans le cas d'abattage partiel, les experts « ont admis qu'une souplesse concernant ce vide sanitaire était acceptable, car n'augmentant pas de manière significative le risque de résurgence de la maladie ».

Cette souplesse est applicable dans le cas des élevages allaitants où il est possible de vider un local pour en assurer une désinfection efficace (ce qui suppose la succession des étapes de nettoyage, séchage, désinfection et à nouveau séchage), ce qui n'est pas le cas pour un élevage laitier, qui est soumis au rythme biquotidien de la traite, incompatible avec une réalisation satisfaisante de la désinfection.

➤ Revalorisation des mesures financières

Jusqu'en 2009, le montant de l'indemnité versée par l'Etat concernant les animaux abattus dans le cadre des abattages diagnostiques (ou des abattages partiels), étaient seulement de 229 euros en supplément de la valeur bouchère des animaux abattus.

La revalorisation de ces indemnités par un **arrêté ministériel en date du 17 juin 2009** permet désormais une indemnisation correcte, à la valeur moyenne de la catégorie (900 euros par vache éliminée, 500 euros pour un broutard), en supplément de la valeur bouchère, permettant ainsi de se rapprocher de la valeur réelle des animaux abattus. Par ailleurs, lorsque « l'infection est découverte à l'abattoir, la perte subie par l'animal, résultant de la différence entre sa valeur estimée et sa valeur de boucherie, est indemnisée dans la proportion de 75 % avec un plafond de 229 euros ».

Par ailleurs, l'adaptation de la réglementation nationale au contexte local, c'est à dire la reconnaissance réglementaire des tests IFN γ et PCR (AM 19 août 2009) permet désormais un meilleur soutien financier du programme appliqué, notamment par la participation financière de l'Etat à ces opérations de prophylaxie.

III. La situation épidémiologique en France 2007-2009

La situation de la Tb en France reste favorable avec un taux d'incidence de cheptels infectés de 0,035 % en 2009 (Tableau II.3.4), en légère augmentation par rapport aux années précédentes, sans toutefois remettre en question le maintien du statut officiellement indemne du pays par la Commission européenne. Cette stagnation est le reflet de la recrudescence de foyers dans certains départements comme la Dordogne et la Côte d'Or, qui ont fait l'objet de mesures de surveillance renforcée ayant conduit à la mise en évidence d'un nombre non négligeable de nouveaux foyers (77 en 2009 - Tableau II.3.4), certes en nombre relativement constant depuis plusieurs années, mais qui conduit à un taux en augmentation du fait de la diminution constante du nombre total d'élevages.

Tableau II.3.4. Evolution du nombre de foyers, des taux d'incidence et de prévalence de la Tb en France de 2006 à 2009
(NS 25 février 2009 et données DDCSPP 24 et DGAI).

	Année			
	2006	2007	2008	2009
Nombre de nouveaux foyers de Tb	83	76	83	77
Taux d'incidence	0,032 %	0,031 %	0,037 %	0,035 %
Taux de prévalence	0,040 %	0,042 %	0,048 %	ND

ND : non déterminé.

Pour le seul premier semestre 2010, la Côte d'Or a mis en évidence 45 nouveaux foyers de tuberculose et 5 autres (données DDCSPP 21), considérés pour l'instant comme suspects, vont très vraisemblablement être confirmés. Cette augmentation résulte, là encore, du renforcement des mesures de détection, utilisant justement la combinaison IDS (ou IDC selon les cas) et test IFN γ associée à la PCR pour les abattages diagnostiques.

Pour l'instant, ces mesures renforcées n'ont été utilisées que dans ces départements. Dans quelques autres départements, le simple constat d'une persistance, depuis le début des années 2000, de quelques foyers découverts uniquement par l'abattoir, à l'image de ce qu'ont connu ces deux départements, la Dordogne et la Côte d'Or (que l'on peut considérer comme pilotes, du fait de la mise en place de ces procédures de détection renforcée), laissent à craindre une probabilité élevée de répétition de ce type d'observation dans ces autres départements,

conduisant à y mettre en évidence un certain nombre de foyers, ce qui pourrait, à terme, remettre en question le statut indemne de la France.

Ces résultats montrent qu'il faut rester vigilant, maintenir les efforts dans les départements les plus infectés (Dordogne et Côte d'Or) en utilisant désormais le test IFN γ et la méthode PCR comme le mentionne la nouvelle réglementation, surveiller les élevages à risque et faire le point des départements à risque, reconnus comme tels, du fait, soit d'échanges commerciaux avec ces deux départements, soit de la persistance de l'apparition de quelques foyers découverts chaque année par l'abattoir uniquement. Une entente interdépartementale et interrégionale réunissant la Dordogne et les départements limitrophes a été créée en mai 2010 dans cet esprit.

IV. Test IFN γ modifié : Résultats de nos études et évolutions des modalités d'interprétation

IV.1. Modalités d'interprétation des résultats individuels des PPD et des R

Depuis le milieu de campagne de prophylaxie 2008-2009, le mode de calcul normalisé prenant en compte les variations d'absorbances liées aux conditions de l'analyse (comme le recommande la norme NF-U 47 019) est utilisé en Dordogne ; la formule "normalisée" pour calculer les résultats des PPD est $[(DO_B - DO_A) / (DO_{TP} - DO_{TN})]$ et celle pour calculer les résultats des R est $[(DO_R - DO_N) / (DO_{TP} - DO_{TN})]$.

Par contre, un seul seuil décisionnel est appliqué quelle que soit l'utilisation du test IFN γ , c'est-à-dire le seuil haut de 0,04 qui correspond au seuil de 0,10 recommandé par Bovigam[®] pour une utilisation du mode de calcul préconisé dans le kit («calcul initial »).

Les valeurs de sensibilité des PPD et R correspondant à ce critère ont été estimées à 83 % [72-92] et 80 % [68-89] respectivement.

Les valeurs de spécificité des PPD et R correspondant à ce critère ont été estimées, pour une utilisation du test seul, à 99,4 % [98,2-99,9] pour les deux et, pour une utilisation du test sur des animaux avec une IDS non-négative, à 73,3 % [69,4-77,0] et 93,1 % [90,6-95,0] respectivement.

Cependant, comme suggéré dans nos conclusions du chapitre I, relatives à la détermination des seuils dans un contexte de faible prévalence et selon différentes utilisations du test

IFN γ (en parallèle ou en série avec l'IDS), il serait souhaitable d'utiliser différentes valeurs-seuils pour les PPD et les R selon les conditions d'application du test.

Ainsi, les valeurs-seuils de 0,02 et 0,01 pour les PPD et les R respectivement pourraient être employées, en milieu sans réaction non-spécifique, dans le cas d'une application du test dans la population générale (en parallèle avec l'IDS), c'est-à-dire dans le cas de dépistage où l'on souhaite maximiser la sensibilité du contrôle (Se_r PPD de 93 % [84-98] et Se_r R de 97 % [89-100]) tout en disposant d'une spécificité très bonne (Sp PPD de 98,0 % [96,3-99,0] et Sp R de 95,9 % [93,8-97,5]) ; tels est le cas pour le protocole d'assainissement par abattage partiel, pour certains contrôles à l'introduction et dans les enquêtes épidémiologiques.

Les valeurs-seuils de 0,05 et 0,03 pour les PPD et les R respectivement pourraient être employées, en milieu où des réactions non-spécifiques sont possibles, dans le cas d'une application du test dans une population d'IDS non-négative c'est-à-dire dans le cas de diagnostic où l'on souhaite optimiser la spécificité (Sp_r PPD de 75,5 % [71,7-79,0] et Sp_r R de 90,7 % [87,9-93,0]) après un dépistage très sensible et peu spécifique tout en disposant d'une sensibilité satisfaisante (Se_r PPD de 83 % [72-92] et Se_r R de 87 % [75-94]); tel est le cas du protocole de gestion des suspicions lors de prophylaxie.

IV.2. Modalités d'interprétation du résultat final du test IFN γ

Durant la période 2007 à 2009, les résultats divergents étaient analysés différemment selon le contexte épidémiologique rencontré (favorable ou défavorable). En effet, dans le cas de cheptel n'ayant aucun risque connu (situation favorable), le cheptel était requalifié et les animaux avec un résultat divergent étaient recontrôlés 8 semaines après. A l'inverse, dans le cas de cheptel susceptible (situation défavorable), les animaux avec un résultat divergent étaient traités comme ceux avec un résultat positif.

Comme nous l'avons conclu dans le chapitre I, la méthode d'interprétation des résultats finaux (méthodes PPD \cap R ou PPDUR) était donc sélectionnée selon le contexte épidémiologique. Or comme la valeur du seuil décisionnel appliquée pour les PPD et les R était de 0,04, quelles que soient les conditions d'application du test, alors la valeur de sensibilité du test était estimée à 90 % [82-98] dans un contexte épidémiologique défavorable (en suivant la méthode PPDUR) et à 73 % [60-84] dans un contexte épidémiologique favorable (en suivant la méthode PPD \cap R).

Par contre, les valeurs de spécificité du test étaient différentes selon les conditions d'utilisation du test. Pour des applications en parallèle avec l'IDS et après une IDS non-négative, les valeurs de spécificité du test étaient estimées respectivement à 98,8 % [97,4-99,6] et 70,9 % [66,9-74,7] dans un contexte épidémiologique défavorable (en suivant la méthode PPDUR) et à 100 % [99,2-100] et 95,4 % [93,3-97,0] dans un contexte épidémiologique favorable (en suivant la méthode $PPD \cap R$).

Concernant les nouvelles valeurs-seuils déterminées (0,02 pour les PPD et 0,01 pour les R) pour une utilisation du test en parallèle à l'IDS (cas de contrôle à l'introduction ou de dérogation à l'abattage total), en milieu sans réaction non-spécifique, les valeurs de sensibilité et de spécificité (Sp) du test ont été estimées respectivement à 100 % [95-100] et 93,9 % [91,4-95,8] dans un contexte défavorable et, à 90 % [82-98] et 100 % [99,2-100] dans un contexte favorable (Tableau II.1.17).

Concernant les nouvelles valeurs-seuils déterminées (0,05 pour les PPD et 0,03 pour les R) pour une utilisation du test dans une population avec IDS non-négative (protocole prophylaxie), en milieu où des réactions non-spécifiques sont possibles, les valeurs de sensibilité et de spécificité opérationnelle* du test (Sp_r) ont été estimées respectivement à 93 % [84-98] et 71,8 % [67,9-75,6] dans un contexte défavorable et, à 77 % [64-87] et 94,3 % [92,0-96,1] dans un contexte favorable (Tableau II.1.17).

Néanmoins, les critères d'analyse (seuil) et les valeurs de sensibilité et spécificité obtenus sont caractéristiques du département étudié, la Dordogne. Il n'est donc pas envisageable pour les autres régions utilisatrices d'employer directement ces critères, à l'exception d'un statut infectieux et de conditions d'application du test identiques à la région étudiée (c'est-à-dire avec une faible prévalence de Tb, des réactions non-spécifiques rares et une application du test pour un dépistage dans la population générale en parallèle à l'IDS ou pour une confirmation de résultats non-négatifs en IDS). Les autres régions doivent donc réaliser une étude préalable afin d'adapter leurs seuils à leurs propres conditions.

Cependant, ces résultats de spécificité opérationnelle (Sp_r) du test $IFN\gamma$ seraient en réalité meilleurs. En effet, étant donné que le test $IFN\gamma$ modifié est un test précoce, certains vrais infectés avec un résultat $IFN\gamma$ positif et sans lésion sont au final classés à tort « faux positifs ». Il en est de même pour d'autres vrais infectés avec un résultat $IFN\gamma$ positif qui n'ont pas eu d'abattage diagnostique car ils ont été requalifiés suite à une IDC négative.

Par conséquent, les faux positifs réels seraient assez rares, tout au moins en Dordogne (ce n'est pas le cas en Côte d'Or, dont les problèmes liés aux mycobactéries atypiques sont récurrents et interfèrent avec le dépistage de la Tb).

Dans notre étude de spécificité opérationnelle (Sp_r) du test IFN γ modifié, 25/547 animaux (soit 21/172 cheptels) ont eu un résultat positif au test IFN γ modifié (mode de calcul normalisé et seuil de 0,04). Toutefois, 16 parmi les 24 animaux testés en IDC ont été requalifiés suite à un résultat négatif et donc n'ont pas été abattus en vue d'un diagnostic. De plus, les cheptels respectifs de 8 de ces 16 animaux ont été suspendus puis requalifiés les années suivantes.

Concernant les 9 animaux abattus (7 avec une IDC non-négative), un seul a présenté des lésions et a été trouvé positif seulement en PCR et donc le cheptel a été requalifié (vraisemblablement à tort).

Cependant, le cheptel d'un animal sans lésion, parmi les 25 animaux positifs au test IFN γ , a été déclaré infecté en 2010. De plus, 9 autres animaux de ce cheptel avaient été testés en 2008 : 6 animaux DIV et 3 NEG. Par ailleurs, deux autres cheptels de l'étude de Sp_r (parmi les 151 restants) dont les animaux testés étaient négatifs ou divergents au test IFN γ ont été déclarés infectés en 2010 (en 2008 : un cheptel où 2 animaux DIV et 1 NEG et l'autre cheptel où 1 animal DIV et 2 NEG). Il faudrait donc ôter ces 3 cheptels de l'étude de Sp_r du test IFN γ et par conséquent, les 16 animaux (1 POS, 9 DIV et 6 NEG). Toutefois, les valeurs de spécificité ne changeraient pas.

L'ensemble de ces résultats semble donc montrer que la spécificité opérationnelle (Sp_r) évaluée dans ce manuscrit serait en réalité non significativement différente de celle décrite précédemment dans ce paragraphe (§ IV.2), mentionnée par un astérisque (valeurs Sp_r individuelles et finale, Tableaux II.1.16 et II.1.17).

En outre, comme les seules mycobactéries atypiques, *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* et *M. riyadhense* présentant les gènes qui codent pour les protéines recombinantes utilisées dans le test IFN γ modifié (CFP10 et ESAT6) n'ont pas été isolées de bovins en Dordogne, la spécificité du test appliqué sur les bovins de Dordogne serait donc très satisfaisante et les animaux avec un résultat divergent, seulement positif en R pourraient être vraisemblablement considérés comme positifs.

Les résultats divergents, positifs seulement en PPD sont souvent liés à la présence de mycobactéries atypiques mais aussi de *M. avium*. Pour information, *M. nonchromogenicum* a

été identifiée dans plusieurs élevages de Dordogne (dont un cheptel également infecté par *M. bovis*). Toutefois, les animaux avec un résultat divergent, seulement positif en PPD, ne doivent pas être considérés comme négatifs. Ils doivent être étudiés au cas par cas.

En conclusion, la VPP du test IFN γ modifié semble être largement satisfaisante pour qu'un abattage diagnostique soit décidé, quel que soit le contexte épidémiologique (favorable ou non), directement après un résultat positif ou un résultat divergent seulement positif en R sur un animal. Ceci apporterait un gain de temps considérable dans la procédure de diagnostic (puisque la réalisation d'une IDC requiert un temps d'attente de 42 jours entre l'IDS et l'IDC) et permettrait d'éviter que des vrais-infectés ne soient pas abattus (car IDC négative).

V. Nouveaux schémas décisionnels appliqués en Dordogne suite aux modifications réglementaires de 2009

Les tests IFN γ modifié et PCR ont été officiellement reconnus par la réglementation, comme outils de diagnostic (en prophylaxie) et de dépistage (lors d'enquêtes épidémiologiques et de contrôles à l'introduction) et, de confirmation d'infection respectivement. Ils permettent donc en complément des autres tests officiels conventionnels des prises de décision plus rapides et fiables (Cf. Tableau II.3.3).

Ainsi, l'arbre décisionnel concernant la gestion des suspicions lors de prophylaxie qui avait été élaboré et était employé à titre expérimental, a évolué en 2010 (campagne 2009-2010) (Figure II.3.3). De même, un nouvel arbre décisionnel concernant la gestion des suspicions en abattoir a été établi (Figure II.3.4).

En outre, un schéma décisionnel utilisé en cas de possibilité de déroger à l'assainissement par abattage total (selon la lettre à diffusion limitée du 19 février 2009) est également appliqué. Enfin, le test IFN γ est encore utilisé lors d'enquêtes épidémiologiques et de contrôles à l'introduction.

V.1. Nouvelles gestions des suspicions de Tb

V.1.1. Lors de prophylaxie

La reconnaissance réglementaire du test IFN γ comme outil de diagnostic en prophylaxie
(Figure II.3.3)

Le dépistage en prophylaxie est effectué par IDS. En cas de résultat(s) non-négatif(s), la qualification du cheptel est suspendue uniquement (informatiquement dans la base SIGAL) pour le ou les animaux en cours de détermination de statut, le temps que le résultat du test IFN γ soit disponible (une semaine maximum). En effet, cette procédure particulière permet de ne pas supprimer le statut indemne, ce qui nécessiterait un arrêté préfectoral, et donc de ne pas obliger à redonner la qualification par un autre arrêté ; les délais de traitement administratif sont tels que le premier arrêté serait signé au moment de disponibilité des résultats. Cette mention sur SIGAL suffit à limiter les possibilités de commerce de l'élevage avec les mêmes garanties qu'un arrêté. En cas de résultat défavorable au test IFN γ (positif ou divergent), l'arrêté est pris car les procédures suivantes sont plus longues.

Le test IFN γ modifié est ensuite réalisé sur tous les animaux trouvés non-négatifs dans l'élevage (prise de sang lors de la lecture de l'IDS).

Il permet d'affiner ce dépistage tuberculique (environ 20 % de positifs et divergents) rapidement, contrairement à l'IDC (moins d'une semaine contre six) et ainsi de lever rapidement les suspensions de qualification de 80 % des cheptels (suspendus) ce qui permet de réduire les pertes économiques liées à ces suspensions. De plus, le test IFN γ étant réalisé dans un laboratoire, le vétérinaire praticien se trouve d'une certaine façon « libéré » de la décision finale (objective) quant au devenir du cheptel de son client. Il en résulte une incitation aux déclarations des IDS non-négatives.

Grâce à la revalorisation financière des abattages diagnostiques et dans la mesure où les faux positifs au test IFN γ (modifié) sont assez rares (montré précédemment), le recours à l'IDC après un test IFN γ non-négatif est désormais peu fréquent.

En effet, l'abattage diagnostique étant mieux indemnisé (sommes plus réalistes) et par conséquent, mieux accepté, il est réalisé directement après un test IFN γ positif ou divergent c'est-à-dire positif en R (DIV² : PPD- & R+), ce qui permet d'éviter d'attendre un délai de six semaines entre l'IDS et l'IDC. Ceci explique pourquoi le nombre d'abattage diagnostique a ré-augmenté en 2010 par rapport aux années précédentes (plus de 30 cheptels concernés en mai 2010, données DDCSPP 24).

La qualification sanitaire est suspendue pour tout le troupeau (APMS) avant l'abattage diagnostique.

Dans ce protocole appliqué en Dordogne, la différence entre les deux types de résultats divergents (DIV¹ : PPD+ & R- et DIV² : PPD- & R+) est désormais prise en compte.

Un animal avec un résultat négatif en PPD mais positif en R (DIV²) est considéré comme positif (APMS) et est directement abattu sans qu'une IDC ne soit réalisée quel que soit le contexte (favorable ou pas).

Dans le cas d'un animal avec un résultat positif en PPD mais négatif en R (DIV¹) (cas assez rare (très peu de cas dans nos études)), une expertise du cheptel concerné est réalisée par la DDCSPP 24 (tests complémentaires et contexte (liens épidémiologiques, suivi sanitaire, antécédents)).

Si les conclusions de cette expertise sont favorables (cheptel non susceptible (avec aucun risque connu)), le cheptel est requalifié (S1, Figure II.3.3).

A l'inverse, si les conclusions sont défavorables (cheptel susceptible) (S2, Figure II.3.3), la qualification sanitaire est alors suspendue pour tout le troupeau (APMS) et une IDC est réalisée (6 semaines après l'IDS) sur un lot d'animaux dont celui (ou ceux) avec un résultat divergent au test IFN γ (DIV¹). Le ou les animaux avec un résultat divergent sont également recontrôlés avec le test IFN γ .

Si les résultats des tests sont favorables (IDC négatives et tests IFN γ négatifs et/ou DIV¹), l'APMS est levé et le cheptel est requalifié (S3, Figure II.3.3).

Au contraire, si les résultats sont défavorables ((IDC positives et/ou, tests IFN γ négatifs et/ou DIV¹), l'abattage diagnostique de ces animaux est réalisé (S4, Figure II.3.3) un par un.

La reconnaissance règlementaire du test PCR comme outil de confirmation d'infection
(Cf. Figure II.3.3)

L'abattage diagnostique d'un animal a pour but de déceler la présence de lésions macroscopiques évocatrices de tuberculose par inspection de la carcasse. Si plusieurs animaux suspects d'un même cheptel doivent être abattus à des fins diagnostiques, cette procédure d'abattage s'effectue animal par animal.

Dans le cas d'observation de lésions suspectes sur un animal, des échantillons sont alors prélevés en vue d'une confirmation par examens histologique, bactériologique (culture suivie d'une identification si nécessaire) et PCR.

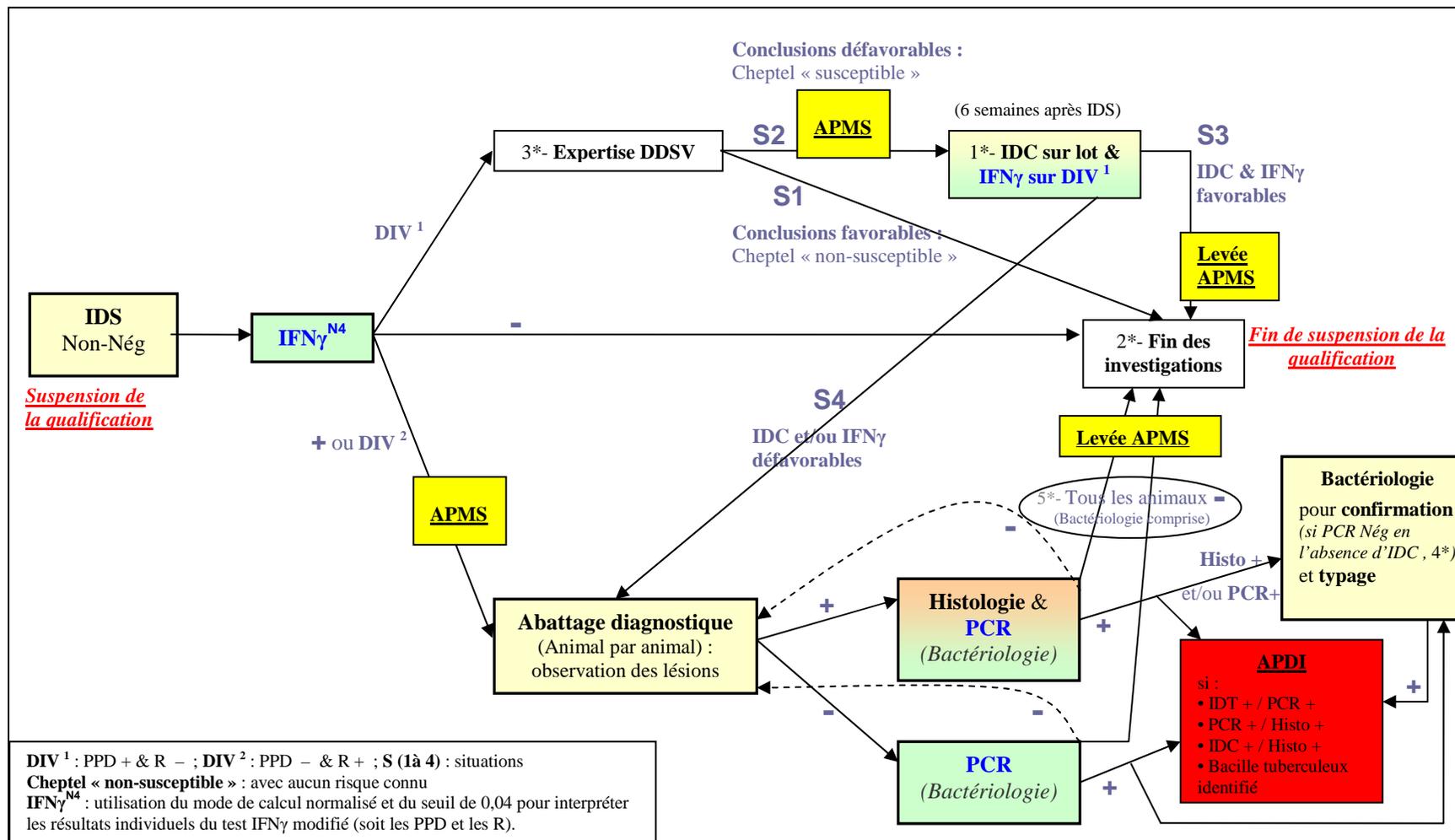


Figure II.3.3. Nouveau schéma décisionnel appliqué en Dordogne en 2010 suite à l'Arrêté du 19/08/09, pour tout type de cheptel (à risque ou pas) avec une IDS non-négative (dépistage Tb en prophylaxie) (d'après DDCSPP 24).

1*- : IDC sur lot = 25% du cheptel avec un minimum de 25 animaux ou la totalité si < 25

2*- : Suivi annuel des cheptels avec bovin(s) DIV à n+1 : réalisation IDS dans le cheptel et IFN_γ sur bovin DIV.

3*- : Expertise DDSV : tests complémentaires + contexte/liens épidémiologique + suivi sanitaire + antécédents.

4*- : Réalisation d'IDC sur lot d'animaux si non faite auparavant.

(Bactériologie) : Culture également réalisée pour tous les échantillons en l'absence ou en présence de lésions macroscopiques suspectes de Tb à l'abattoir.

Si PCR & Histologie négatives ou si PCR négative en l'absence de lésion, il faut attendre le résultat bactériologique (culture, si nécessaire identification) pour confirmer ou infirmer le résultat.

A l'inverse, en l'absence de lésion, un test PCR et une mise en culture sont nécessairement mis en œuvre sur les nœuds lymphatiques suivants : trachéobronchiques, rétropharyngiens et médiastinaux. Le contrôle systématique de ces trois types de ganglions même en l'absence de lésion macroscopique contribue à sécuriser ce dispositif de surveillance (*idem* pour le protocole dérogatoire à l'abattage total). En effet, comme certains vrais infectés précoces, positifs au test IFN γ et/ou non-négatifs à l'IDC, peuvent ne pas présenter de lésion macroscopique suspecte, il s'avère donc utile de réaliser systématiquement une analyse PCR et une mise en culture sur tous les abattages diagnostiques après un résultat positif au test IFN γ ou non-négatif à l'IDC.

Comme cela était déjà prévu dans l'arrêté du 15 septembre 2003 modifié*, si l'animal présente un résultat non-négatif à l'IDC et des lésions histologiques évocatrices de Tb, il est alors reconnu infecté et le cheptel est placé sous APDI. Il en est de même si le bacille tuberculeux est mis en évidence.

Auparavant, dans le cas d'un résultat histologique négatif, il fallait attendre le résultat bactériologique pour prendre une décision sur le statut de l'animal, ce qui entraînait une suspension plus longue du cheptel. Toutefois, si d'autres animaux étaient suspects, l'abattage diagnostique de ces animaux était réalisé afin de tenter de confirmer rapidement l'infection du cheptel (si IDC et histologie +).

L'inclusion du test PCR dans le dispositif réglementaire a donc permis d'ajouter d'autres critères réglementaires pour confirmer ou infirmer plus rapidement l'infection d'un animal.

Si les résultats de l'analyse PCR et de l'histologie sont positifs, cette constatation est alors suffisante pour considérer l'animal infecté et placer le cheptel sous APDI.

De même, (en l'absence de lésion à l'abattoir ou bien en présence de lésions suspectes non confirmées par histologie), la constatation d'un résultat positif en PCR associé à une IDS et/ou une IDC non-négative suffit pour garantir l'infection et placer le cheptel sous APDI.

Il n'est donc plus nécessaire dans ces différents cas d'attendre le résultat de la culture pour confirmer l'infection. Il en résulte un gain de temps considérable (d'au moins 2,5 mois) qui représente un avantage opérationnel déterminant.

Cependant, si les résultats de l'analyse PCR et de l'histologie sont négatifs, cette constatation n'est alors pas suffisante pour considérer l'animal indemne ; il est nécessaire que le résultat bactériologique le soit aussi. Il en est de même en l'absence de lésion suspecte (pas d'histologie réalisée) lorsque le résultat du test PCR est négatif.

Toutefois, comme dans l'étude de sensibilité diagnostique de la PCR, le bacille tuberculeux n'a jamais été isolé chez un animal ayant fourni des résultats négatifs en PCR et histologie, on pourrait alors proposer certaines exceptions, en particulier dans un contexte épidémiologique très favorable de considérer l'animal indemne directement à partir de résultats négatifs en PCR et histologie.

En outre, en l'absence ou présence de lésions suspectes, si tous les résultats obtenus sont également négatifs à l'issue des autres abattages diagnostiques prévus dans le cheptel (absence de lésion et PCR et bactériologie négatives ou, lésions suspectes et histologie et PCR et bactériologie négatives), la qualification du cheptel est alors restituée et l'APMS est levé.

De plus, une confirmation bactériologique est également nécessaire en cas de lésions histologiques évocatrices de Tb associées à un résultat négatif en PCR et en l'absence d'IDC ou si l'IDC est négative (S4, Figure II.3.3). Dans ces deux cas (absence d'IDC ou IDC négative), le résultat du test IFN γ était forcément positif ou divergent pour qu'il y ait eu abattage diagnostique. Une question se pose dans le contexte épidémiologique actuel de la Dordogne où la VPP du test IFN γ est très satisfaisante : un animal positif à la fois au test IFN γ et en histologie ne pourrait-il pas être considéré comme infecté ? Ceci apporterait alors un gain de temps sur les prises de décisions correspondant à cette situation.

Quoi qu'il en soit, comme nous l'avons déjà évoqué, la bactériologie reste l'outil indispensable pour les besoins de caractérisation moléculaire des souches et ainsi permettre d'affiner les enquêtes épidémiologiques.

Cette nouvelle procédure de gestion des suspicions en prophylaxie incluant les tests IFN γ et PCR permet d'établir un diagnostic fiable, rapide et difficilement contestable. De plus, si on tient compte de la revalorisation financière des abattages diagnostiques, le coût d'un tel protocole s'avère au final moins élevé pour les éleveurs.

Toutefois, la condition *sine qua non* de l'efficacité d'un tel protocole est le « filtre IDS », c'est-à-dire qu'il est impératif que la totalité des animaux réagissants en IDS (non-négatifs =

positifs et douteux) dans un cheptel soit déclarée, d'autant plus que l'IDC est de moins en moins pratiquée en Dordogne (Figure II.3.3).

En effet, une sous-déclaration des IDS non-négatives présenterait un risque de requalification à tort d'élevages réellement infectés. Par exemple, un cas de double infection mycobactérienne, par *M. bovis* et une mycobactérie atypique, a été découvert dans un même cheptel cette année en Dordogne (isolement de *M. nonchromogenicum* et *M. bovis* sur des animaux d'un même cheptel dépistés par IDS). Si seulement une partie des animaux non-négatifs en IDS avait été déclarée, alors l'infection par *M. bovis* aurait pu ne pas être diagnostiquée.

V.1.2. En abattoir

Suite à la découverte de lésions suspectes de Tb à l'abattoir, la qualification du cheptel est suspendue (avec APMS) et des prélèvements de tissus lésés sont réalisés afin de confirmer ou d'infirmer la suspicion de Tb par examens histologique, bactériologique (culture et identification si nécessaire) et PCR (Figure II.3.4).

Comme dans le cas d'un abattage diagnostique, si les résultats de l'analyse PCR et de l'histologie sont positifs, cette constatation est alors suffisante pour considérer l'animal infecté et placer le cheptel sous APDI.

Il n'est donc plus nécessaire dans le cas de résultats concordants entre la PCR et l'histologie pour un même animal d'attendre le résultat de la culture pour confirmer ou infirmer l'infection. Il en résulte un important gain de temps qui s'avère crucial d'un point de vue opérationnel (diagnostic établi en quelques jours au lieu d'au moins 2,5 mois).

Cependant, si un animal est négatif en PCR et histologie, cette constatation doit alors être confirmée par la bactériologie pour que l'animal soit reconnu indemne de Tb. Comme nous l'avons évoqué pour les abattages diagnostiques, il serait envisageable dans le cas d'une suspicion à l'abattoir dans un contexte épidémiologique très favorable, de pouvoir conclure l'absence d'infection chez un animal ayant obtenu des résultats négatifs au test PCR et en histologie.

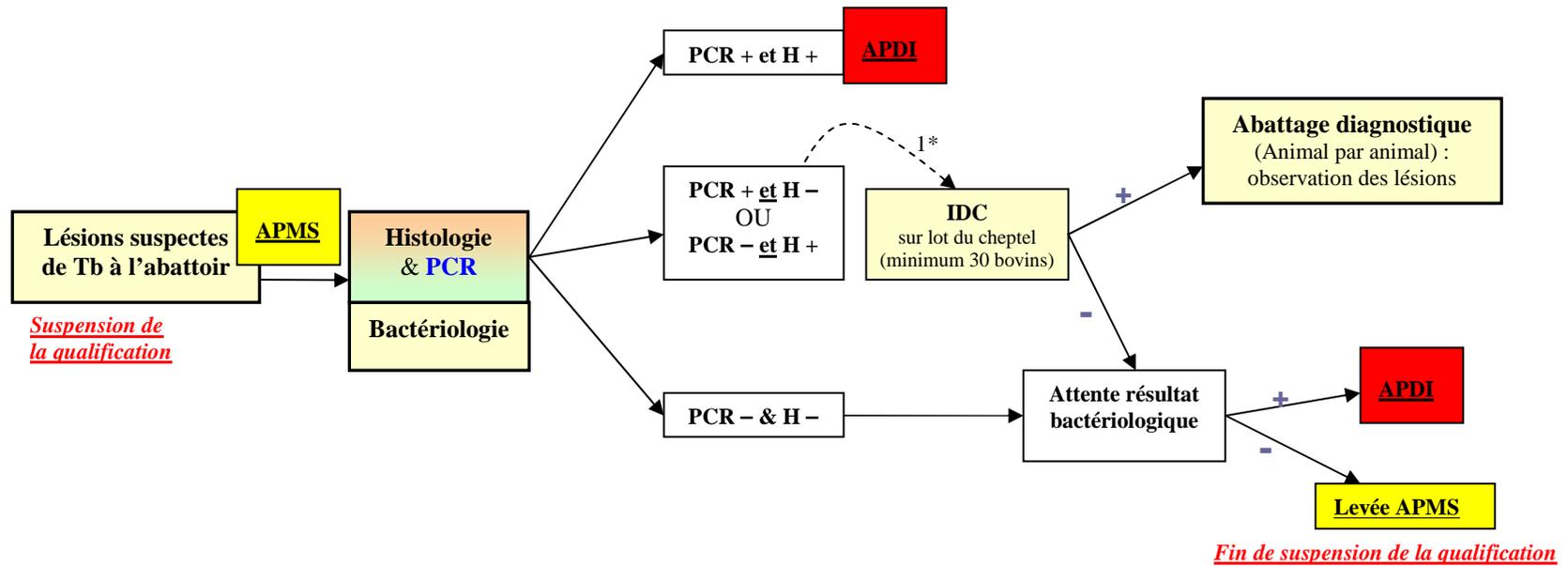


Figure II.3.4. Nouveau schéma décisionnel à partir d'une suspicion de Tb en abattoir, appliqué en Dordogne en 2010 suite à l'Arrêté du 19/08/09.

1* : Réalisation d'IDC sur un lot d'animaux du cheptel sans attendre le résultat bactériologique, en vue d'une confirmation rapide de l'infection sur un autre animal du cheptel.

Dans le cas de résultats discordants entre la PCR et l'histologie, des IDC sont pratiquées sur un lot d'animaux du cheptel (minimum 30).

Si les résultats des IDC sont tous négatifs, il est alors nécessaire d'attendre le résultat bactériologique pour garantir l'absence d'infection et ainsi restituer la qualification sanitaire au cheptel concerné ou bien confirmer l'infection tuberculeuse et donc déclarer le cheptel infecté (APDI).

Par contre, un abattage diagnostique de tous les animaux réagissants à l'IDC est réalisé afin de tenter de confirmer rapidement l'infection (si IDC non-négative et histologie et/ou PCR +).

Toutefois, le pourcentage de résultats discordants entre la PCR et l'histologie, obtenus dans l'étude de la sensibilité diagnostique de la *PCR2b* était relativement faible et en majorité confirmé par la bactériologie (7/67 animaux dont 5 *Bact.*), avec quasiment autant de résultats seulement positifs en PCR (3 animaux) qu'en histologie (4 animaux). De plus, les résultats de notre étude ont montré que la VPP de la *PCR2b* était excellente vis-à-vis des tests officiels (toutes les PCR+ confirmées par *Hist.* et/ou *Bact.*).

Or, étant donné les performances du test $IFN\gamma$ sur des animaux non-négatifs en IDS, il serait intéressant pour optimiser la sensibilité de détection, dans le cas de résultats positifs en PCR et négatifs en histologie, de tester la totalité des animaux en IDS à la place d'un lot en IDC, et ensuite de réaliser une analyse $IFN\gamma$ sur tous les animaux non-négatifs en IDS (idem au protocole de gestion des suspicions en prophylaxie). Enfin, seuls les animaux non-négatifs au test $IFN\gamma$ seraient abattus à des fins diagnostiques.

V.2. Contrôles à l'introduction et enquêtes épidémiologiques

La question des contrôles à l'introduction est délicate. Indispensable en situation de persistance de risque, en situation indemne, elle est non seulement inutile, mais contre-productive, car elle ne produit pratiquement que des résultats faussement positifs, responsables de conséquences hautement dommageables pour les cheptels vendeurs. C'est pourquoi il est réglementairement admis depuis 2005 de dispenser les élevages, sous certaines conditions, de ce contrôle.

Le contrôle doit être maintenu dans les situations à risque, par exemple pour les échanges entre élevages à l'intérieur d'un département où des foyers suffisamment nombreux d'infection persistent. Il est très contestable pour les échanges à partir de départements indemnes.

Lorsque les échanges doivent être maintenus, on sait que le risque maximal d'erreur par excès est associé au stress du transport. Il conviendrait donc de réaliser les contrôles chez le vendeur, ce qui n'est pas usuel en droit français, la charge de la vérification de la qualité de la chose achetée incombant traditionnellement à l'acheteur. Dans la logique de l'évolution vers un droit conforme aux pratiques communautaires, il serait logique de faire procéder à ce contrôle chez le vendeur, ce qui résoudrait les problèmes de réactions non spécifiques et des conséquences éventuelles pour le statut du cheptel du vendeur.

Lors de contrôles à l'introduction à l'intérieur d'un département infecté (comme la Dordogne), il est nécessaire de maximiser la sensibilité du dépistage et de disposer d'une meilleure spécificité. Suite à un commun accord entre l'acheteur et le vendeur, le test IFN γ modifié pourrait donc désormais être employé en parallèle avec l'IDS lors de ces contrôles (test à la charge de l'acheteur). Si les résultats des deux tests sont négatifs, l'animal peut alors être introduit dans le cheptel de destination. Toutefois, si un lot d'animaux d'un même cheptel doit être introduit, il est impératif que tous les animaux obtiennent des résultats négatifs pour autoriser leur introduction. En effet, un résultat non-négatif à l'IDS ou au test IFN γ suffirait pour annuler l'introduction du bovin (et s'il y a lieu des autres bovins même si négatifs).

Lors d'enquêtes épidémiologiques, des contrôles tuberculiques sont réalisés sur les animaux issus de cheptels susceptibles (ou sur tout le cheptel). Le test IFN γ modifié peut donc désormais être employé en parallèle avec l'IDS (pour maximiser le dépistage) ou en série avec l'IDS (sur les animaux non-négatifs en IDS).

V.3. Assainissement par abattage partiel

Dans le cadre d'un assainissement par abattage partiel, il s'avère également fondamental de maximiser la sensibilité du dépistage.

Le recours au test IFN γ modifié, plus sensible que l'IDS, est donc indispensable selon le protocole actuellement préconisé par les textes (emploi en parallèle à l'IDS), de manière à optimiser la sensibilité de détection des animaux infectés avec une limite de 5 % maximum d'animaux positifs (PCR positive ou culture positive ou [IDS non-négative et test IFN γ positif]) au-delà duquel la diffusion de l'infection est considérée comme telle qu'un abattage total doit être décidé.

Cela permet de réduire au niveau minimum le risque de faux négatif, c'est-à-dire de ne pas détecter un animal infecté. Ainsi, dans ce contexte défavorable, les animaux avec un résultat divergent sont considérés comme positifs et donc sont abattus à des fins diagnostiques (mode d'interprétation PPDUR).

La méthode PCR est également nécessaire dans ce protocole car aussi sensible que la culture et de spécificité largement satisfaisante chez les bovins, elle permet de confirmer l'infection rapidement. Elle permet notamment de détecter rapidement des animaux infectés depuis longtemps qui présenteraient une réponse anergique vis-à-vis de l'un des tests immunologiques.

VI. Bilan et Travaux en perspectives

L'évaluation des tests IFN γ et PCR a donc été réalisée en fonction de la disponibilité des prélèvements. En effet, le type d'échantillons collectés pour l'étude dépendait d'une décision respectant la réglementation. Nos échantillonnages n'étaient donc pas totalement maîtrisés mais étaient représentatifs de la situation sur le terrain. Or, l'épidémiologie permet de valoriser des situations d'observation (par modélisation, veille sanitaire, sur le terrain) et y compris des situations où l'observateur ne maîtrise pas suffisamment la composition de ses échantillons ; tel est le cas de l'approche sur le terrain.

De plus, l'erreur de classement des élevages indemnes est faible car il est limité au taux d'incidence qui est faible. Ce risque n'est donc pas de nature à remettre en question nos conclusions.

Nous avons utilisé une démarche scientifique permettant de réduire l'incertitude de décision, tout en en appréciant les limites. En effet, concernant le test IFN γ , pour que le risque d'erreur dans les prises de décision soit le plus faible possible, la portée de nos résultats est limitée au milieu étudié. Afin de réduire ces limites, différents travaux doivent donc être entrepris.

L'évaluation des tests doit être poursuivie en Dordogne. Il est indispensable d'assurer un suivi des élevages indemnes inclus dans nos études de spécificité du test IFN γ modifié afin de vérifier l'absence de changement de statut.

De plus, dans les études rétrospectives de spécificité opérationnelle et de sensibilité relative, la totalité des animaux n'a pas pu être testée le même jour par rapport à l'IDS. Dans ces conditions, nous n'avons pas pris en compte ces variabilités dans l'évaluation des

performances du test IFN γ , bien que la littérature montre l'influence de l'IDS sur les résultats du test. L'effet potentialisateur ou inhibiteur de l'IDS devrait être évalué. Cependant, cette étude est-elle réalisable en conditions d'infection naturelle ? En effet, les facteurs d'ordre logistiques (prélèvements multiples) et privé (au bon vouloir de l'éleveur si absence d'obligation, nécessité de volontaires) sont des obstacles à la mise en place et au bon déroulement de l'étude. Par exemple, il n'est pas toujours possible de retester expérimentalement (sans obligation réglementaire) un animal reconnu négatif en raison du risque qu'il soit retrouvé positif et des conséquences liées à cette découverte, pour le cheptel.

Il serait également utile de rechercher dans quelle proportion les cheptels étudiés sont-ils atteints de paratuberculose ? En effet, la paratuberculose est actuellement une des raisons explicatives les plus importantes de résultats faussement positifs de tests indirects de recherche de la Tb, comme le test IFN γ (Walravens K. *et al.*, 2002 ; Aranaz A. *et al.*, 2006 ; Alvarez J. *et al.*, 2009 ; Aagaard C. *et al.*, 2010).

Pour compléter l'évaluation de la sensibilité du test PCR par comparaison avec la bactériologie, il serait envisageable de comparer les valeurs de Ct en fonction du délai d'apparition et du nombre de colonies. Cette étude permettrait d'estimer le gain de temps lié à l'utilisation du test PCR par rapport à la bactériologie, mais aussi de déterminer, en fonction du type de prélèvements par exemple, combien sont détectés faiblement positifs par PCR mais non confirmés par la bactériologie.

En outre, les échantillonnages de nos études de sensibilité des deux tests sont composés d'animaux pour lesquels des lésions macroscopiques évocatrices de Tb ont été observées à l'abattoir. Il existe donc un biais de sélection car de nombreux animaux infectés peuvent ne pas présenter de lésion visible (Corner L.A., 1994). Il serait donc utile d'étudier ce type d'animaux puisque des données sont désormais disponibles en raison de l'usage systématique du test PCR et de la bactériologie sur des ganglions sans lésion depuis un peu moins d'un an (campagne 2009-2010). Cependant, il est important de souligner que sur un plan pragmatique, nos conclusions restent valables puisque la plupart des foyers, hormis la Dordogne et la région Bourgogne, continue à être découverts à l'abattoir. Ceci pourrait néanmoins changer étant donné les bons résultats obtenus en Dordogne et Côte d'Or.

Concernant l'évaluation du test IFN γ modifié, la validité des résultats est limitée au département de la Dordogne. Afin de vérifier si ces variations de composition des échantillons ne sont pas de nature à contester nos résultats, il est donc nécessaire de prolonger

ces travaux dans d'autres départements qui auront des situations épidémiologiques différentes.

Par ailleurs, dans les départements de France affectés par la tuberculose bovine, comme la Côte d'Or, des foyers apparaissent dans la faune sauvage. Or, les enquêtes réalisées en Dordogne sur près de 400 prélèvements en 2005-2006 et sur plus de 70 prélèvements en 2006-2007 n'avaient mis en évidence aucun foyer. Néanmoins, en janvier 2010, un cerf porteur de lésion a été reconnu infecté de Tb. De même, en mai 2010, deux blaireaux ont été détectés positifs par PCR et histologie. Au regard de la situation épidémiologique des bovins en Dordogne en mai 2010, une enquête sur la faune sauvage (sangliers, cerfs et blaireaux) s'imposait. Elle est programmée pour la saison de chasse prochaine (2010-2011), notamment par usage systématique du test PCR couplé ou non à la bactériologie.

Enfin, pour que le test IFN γ soit utilisé de façon règlementée dans toutes les régions de France, il est nécessaire que les Ag spécifiques ESAT6 et CFP10 soient inclus au test IFN γ Bovigam[®] en raison d'une faible prévalence nationale de Tb et d'une importante proportion de réactions atypiques envisageable dans certaines régions. De plus, il est crucial que les laboratoires réalisant les tests IFN γ modifié soient tous expérimentés et agréés et, qu'ils soient en particuliers localisés dans les régions infectées. En effet, la proximité du laboratoire est en faveur de bonnes conditions d'acheminement des prélèvements au laboratoire, une étape critique à respecter pour que l'analyse soit réalisable.

Il en est de même pour le test PCR qui est une technique délicate nécessitant une formation et de l'expérience. Un réseau de laboratoires agréés pour ce test comme pour la bactériologie permettrait de disposer de résultats comparables avec une méthode validée.

CONCLUSION GENERALE

La Dordogne était un site expérimental intéressant compte tenu de la situation épidémiologique très inquiétante de la tuberculose bovine en 2006 dans ce département.

La stratégie adoptée reposant sur le renforcement des mesures de dépistage par prophylaxie et l'utilisation à titre expérimental de deux outils de diagnostic, un test IFN γ Bovigam[®] modifié et une méthode PCR IS6110 en temps réel, en complément des méthodes conventionnelles, a permis d'obtenir des résultats encourageants et de définir des conditions et critères d'application et d'intégration de ces nouveaux tests dans le plan de lutte contre la maladie.

Ces résultats satisfaisants ont conduit en 2009 à la reconnaissance réglementaire (AM du 19 août 2009, lettre à diffusion limitée du 06 mai 2010) du test PCR IS6110 comme outil de confirmation de l'infection et du test IFN γ modifié (basé sur les PPD et les R) comme outil de diagnostic en prophylaxie et de dépistage en parallèle à l'IDS lors de contrôle à l'introduction, d'enquêtes épidémiologiques ou dans le cas de dérogation à l'assainissement par abattage total. Il en résulte une plus grande rapidité et une simplification des prises de décision.

En effet, les études de l'intérêt diagnostique (faisant suite à une approche analytique) de la méthode PCR IS6110 ont montré qu'elle est au moins aussi sensible que la bactériologie et que sa spécificité opérationnelle est très satisfaisante (pour une utilisation chez les bovins). De même, sa VPP est excellente vis-à-vis des autres tests de confirmation directe, toutes les PCR positives ayant été confirmées par l'histologie et/ou la bactériologie. Par contre, sa VPN n'est pas suffisante pour qu'un résultat négatif en PCR soit utilisable seul et ceci, quel que soit le contexte épidémiologique.

Par conséquent, cette méthode PCR est un outil rapide et fiable de diagnostic de la Tb qui, utilisé en complément des tests officiels, améliore considérablement le diagnostic réglementaire. Ainsi, en cas de positivité en PCR couplée à une IDS positive et/ou une histologie positive, il n'est pas nécessaire d'attendre le résultat bactériologique pour déclarer l'infection. Les délais de confirmation sont alors largement raccourcis, ce qui constitue un avantage opérationnel crucial.

Néanmoins, la bactériologie reste essentielle pour les enquêtes épidémiologiques et en cas de litige.

Les résultats de nos études des performances du test IFN γ modifié ont montré qu'il n'est pas parfait. Néanmoins, sa complémentarité vis-à-vis de l'IDS en fait un atout certain qui permet son utilisation en complément des méthodes conventionnelles. En effet, l'utilisation du test IFN γ modifié comme outil de confirmation des IDS non-négatives a permis d'obtenir les effets escomptés, c'est-à-dire de réduire les résultats faussement « non-négatifs » et de raccourcir les délais de suspension de qualification (actuellement en moins d'une semaine), afin d'éviter une baisse de motivation des différents acteurs du terrain (engagés pour une meilleure détection des élevages infectés depuis la campagne prophylactique 2005-2006) et un relâchement consécutif dans l'application du dispositif renforcé de lutte.

En outre, grâce à la revalorisation financière des abattages diagnostiques, le recours à l'IDC comme test de confirmation des résultats non-négatifs au test IFN γ est désormais rare en Dordogne ce qui permet de réduire encore les délais de suspension.

Néanmoins, la condition fondamentale de l'efficacité de cette nouvelle gestion des suspicions en prophylaxie repose sur la nécessité de déclarer la totalité des animaux réagissants à l'IDS (positifs et douteux) dans un cheptel.

De plus, nos études ont permis de montrer qu'il est indispensable d'employer un mode de calcul normalisé intégrant les variations d'absorbance liées aux conditions de l'analyse, selon les recommandations de la norme NF-U 47 019, afin que les résultats des analyses soient plus reproductibles et puissent être plus comparables en intra- et inter-laboratoires.

Il est également nécessaire d'utiliser des seuils décisionnels et des méthodes d'interprétation du résultat final du test (PPD \cup R ou PPD \cap R) différents selon les zones ou les situations épidémiologiques rencontrées.

En Dordogne, dans le cas d'une application du test dans la population générale, c'est à dire en parallèle à l'IDS lors de contrôle à l'introduction ou d'enquête épidémiologique et en milieu sans réaction atypique, les valeurs préférentielles des seuils de positivité sont de 0,02 et de 0,01 pour les formules normalisées des PPD et des R respectivement. Par contre, dans le cas d'une application du test dans une population d'animaux présentant des IDS non-négatives, lors de prophylaxie ou de contrôle à l'introduction et où des réactions atypiques sont possibles, les valeurs préférentielles des seuils de positivité sont de 0,05 et de 0,03 pour les formules normalisées des PPD et des R respectivement.

Ensuite, la méthode d'interprétation du résultat final à partir des résultats individuels obtenus dépend du contexte rencontré (favorable ou non). Toutefois, les animaux « divergents » qui

sont positifs au test IFN γ pour les R seulement, peuvent être traités comme « positifs » (abattage diagnostique) quel que soit le contexte.

Parmi toutes ces recommandations, les modifications apportées à ce jour en Dordogne concernent l'usage du mode de calcul normalisé et la méthode d'interprétation du résultat final. En vue d'une utilisation appropriée du test IFN γ modifié, il serait souhaitable de tenir compte également des valeurs-seuils définies selon le contexte d'application au lieu d'utiliser une seule et même valeur-seuil (0,04) pour les formules normalisées des PPD et des R, quelles que soient les conditions d'application du test.

Par ailleurs, il n'est pas envisageable pour les autres régions utilisatrices d'employer directement ces critères qui sont caractéristiques du département étudié, à l'exception de régions avec un statut infectieux et des conditions d'application du test identiques à la Dordogne (c'est-à-dire avec une faible prévalence de Tb, des réactions non-spécifiques rares et une application du test pour un dépistage dans la population générale (en parallèle à l'IDS) ou pour une confirmation de résultats non-négatifs en IDS). Les autres régions doivent donc réaliser une étude préalable permettant d'adapter les seuils à leurs propres conditions en vue d'une utilisation appropriée du test.

Enfin, au plan scientifique, l'évaluation des tests IFN γ modifié et PCR est perfectible. En effet, les protocoles sont absolument conformes à une démarche scientifique (échantillonnages non maîtrisés) permettant de réduire l'incertitude tout en en appréciant les limites. Comme nous les avons décrits à la fin du chapitre 3 « Discussion », des travaux ultérieurs sont donc nécessaires. De plus, il serait fortement souhaitable que les laboratoires réalisant les tests IFN γ modifié et/ou PCR soient agréés pour ces analyses.

En outre, si la mise au point de ces tests constitue une avancée certaine dans la lutte contre la tuberculose bovine, elle ne résout pas totalement les difficultés rencontrées sur le terrain. Il est primordial que le dépistage hors laboratoire (pratiques de tuberculination, pratique des expertises aux abattoirs, ...) soit réalisé avec rigueur dans le respect de la réglementation et, que les compétences des vétérinaires en la matière soient maintenues.

De plus, il ne faut pas oublier en effet qu'il s'agit d'un renforcement du volet du dépistage (dont l'effet est de réduire la prévalence), alors que l'éradication dépend aussi de la maîtrise du risque de propagation de l'infection entre les élevages (seule méthode permettant de réduire efficacement l'incidence).

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Ouvrages :

Aagaard C., Govaerts M., Meikle V., Vallecillo A. J., Gutierrez-Pabello J. A., Suarez-Güemes F., McNair J., Cataldi A., Espitia C., Andersen P. et Pollock J. M., 2006. Optimizing antigen cocktails for *Mycobacterium bovis* diagnosis in herds with different disease prevalence: ESAT6/CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 44, pp. 4326-4335.

Aagaard C., Govaerts M., Meikle V., Gutiérrez-Pabello J.A., McNair J., Andersen P., Suárez-Güemes F., Pollock J., Espitia C. et Cataldi A., 2010. Detection of bovine tuberculosis in herds with different disease prevalence and influence of paratuberculosis infection on PPDB and ESAT-6/CFP10 specificity. *Preventive Veterinary Medicine*. Vol. 96 (3-4), pp. 161-169.

Abed Y., Bollet C. et De Micco P., 1995. Identification and strain differentiation of *Mycobacterium* species on the basis of DNA 16S-23S spacer region polymorphism. *Research in Microbiology*. Vol. 146, pp. 405-413.

Aggerbeck H. et Madsen M., 2006. Safety of ESAT-6. *Tuberculosis*. Vol. 86 (5), pp. 363-373.

Allix C., Walravens K., Saegerman C., Godfroid J., Supply P. et Fauville-Dufaux M., 2006. Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 44 (6) pp. 1951-1962.

Alvarez J., de Juan L., Bezos J., Romero B., Saez J.L., Marques S., Dominguez C., Minguez O., Fernandez-Mardomingo B., Mateos A., Dominguez L. et Aranaz A., 2009. Effect of paratuberculosis on the diagnosis of bovine tuberculosis in a cattle herd with a mixed infection using interferon-gamma detection assay. *Veterinary Microbiology*. Vol. 135, pp. 389-393.

Amadori M., Lyashchenko K.P., Gennaro M.L., Pollock J.M. et Zerbini I., 2002. Use of recombinant proteins in antibody tests for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*. Vol. 85, pp. 379-389.

Andersen P., Andersen A.B., Sorensen A.L. et Nagai S., 1995. Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *The Journal of Immunology*. Vol. 154 (7), pp. 3359-3372.

Andersen P., Munk M.E., Pollock J.M. et Doherty T.M., 2000. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *The Lancet*. Vol. 356 (9235), pp. 1099-1104.

Aranaz A., Liébana E., Gómez-Manpaso E., Galán J.C., Cousins D., Ortega A., Blázquez J., Baquero F., Mateos A., Suárez G. et Domínguez L., 1999. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. 49, pp. 1263-1273.

Aranaz A., Cousins D., Mateos A. et Domínguez L., 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp nov.. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol. 53, pp. 1785-1789.

Aranaz A., De Juan L., Montero N., Sánchez C., Galka M., Delso C., Álvarez J., Romero B., Bezos J., Vela A.I., Briones V., Mateos A. et Domínguez L., 2004. Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 42 (6), pp. 2602-2608.

Aranaz A., De Juan L., Bezos J., Álvarez J., Romero B., Lozano F., Paramio J.L., López-Sánchez J., Mateos A. et Domínguez L., 2006. Assessment of diagnostic tools for eradication of bovine tuberculosis in cattle co-infected with *Mycobacterium bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Veterinary Research. Vol. 37 (4), pp. 593-606.

Artois M., Loukiadis E., Garin-Bastuji B., Thorel M.F., Hars J., 2004. Infection des mammifères sauvages par *Mycobacterium bovis* – Risque de transmission aux bovins domestiques. Bulletin Epidémiologique Afssa. N° 13, pp. 1-3.

Badin de Montjoye T., Thorel M.F. et Garin-Bastuji B., 2004. L'évolution de la tuberculose bovine en France: bilan 2002 et perspectives. Bulletin des GTV. 23 janvier/février, pp. 311-314.

Bakshi C.S., Shah D.H., Rishendra V., Singh R.K. et Malik M., 2005. Rapid differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* based on a 12.7-kb fragment by a single tube multiplex-PCR. Veterinary Microbiology. Vol. 109 (3-4), pp. 211-216 (corrections apportées à cet article : Vol. 123 (1-3), 2007, p. 282).

Barlow N.D., 1997. A simulation model for the spread of bovine tuberculosis within New Zealand cattle herds. Preventive Veterinary Medicine. Vol. 32, pp. 57-75. Cité par Humblet M.F., Boschioli M.L. et Saegerman C., 2009.

Bénet J.J., 1991. Les infections à mycobactéries atypiques chez l'animal. Médecine et Maladies Infectieuses. Vol. spécial 21, pp. 26-34.

Bénet J.J., Boschioli M.L., Dufour B. et Garin-Bastuji B., 2006. Lutte contre la tuberculose bovine en France de 1954 à 2004 : analyse de la pertinence épidémiologique de l'évolution de la réglementation. Epidémiologie et Santé animale. Vol. 50, pp. 127-143.

Bénet J.J., 2008. La tuberculose animale. Polycopié Ecole Nationale Vétérinaire. Unité Pédagogique de Maladies contagieuses. Mérial. 74 pages (Site web consulté le 15/03/2010 : http://cours.vet-alfort.fr/fichier/ensv/r_cours_405/Tuberculose%202008.pdf).

Berthet F.X., Rasmussen P.B., Rosenkrands I., Andersen P. et Gicquel B., 1998. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). Microbiology. 1998 November; Vol. 144 (11) pp. 3195-3203.

- Biet F., Boschioli M.L., Thorel M.F. et Guilloteau L.A., 2005.** Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Veterinary Research*. Vol. 36, pp. 411-436.
- Biteau-Coroller F., Hendriks P., Grillet C., Albina E. et Roger F., 2003.** Evaluation des tests sérologiques utilisés dans le cadre de la surveillance de la fièvre catarrhale du mouton en France. *Epidémiologie et Santé Animale*. Vol. 44, pp. 105-114.
- Bogard M., 1994.** Techniques d'amplification en biologie moléculaire : II. Mise en œuvre, perspectives. *Immunoanalyse et Biologie Spécialisée*. Vol. 9, pp. 134-152.
- Boulahbal F., Robert J., Trystram D., De Benoist A.C., Vincent V., Jarlier V., Grosset J. et les chefs de laboratoires de bactériologie correspondants du Centre National de Référence pour la Surveillance des Infections à Mycobactéries et de leur Résistance aux Antituberculeux, 1998.** La Tuberculose Humaine à *Mycobacterium bovis* en France durant l'année 1995. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire (BEH)*. N°48/98, pp. 207-208. (Site web consulté le 05/02/2010 : http://www.invs.sante.fr/beh/1998/9848/beh_48_1998.pdf).
- Boulouis H.J., Haddad N. et Maillard R., 2001.** Technique d'étude moléculaire des isolats : principe et fiabilité. *Epidémiologie et Santé Animale*. Vol. 39, pp. 21-29.
- Bourgoin A. et Agius G., 1995.** Le point sur les méthodes classiques d'identification des mycobactéries. *Revue française des laboratoires*. Février, n° 273, pp. 21-26.
- Brooks-Pollock E. et Keeling M., 2009.** Herd size and bovine tuberculosis persistence in cattle. *Preventive Veterinary Medicine*. Vol. 92, pp. 360-365.
- Brosch R., Gordon V., Marmiesse M., Brodin P., Buchrieser C., Eiglmeier K., Garnier T., Gutierrez C., Hewinson G., Kremer K., Parsons L.M., Pym A.S., Samper S., Van Soolingen D. et Cole T., 2002.** A new evolutionary scenario for *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of National. Academy of Sciences of USA*. Vol. 99 (6), pp. 3684-3689.
- Buddle B.M., Aldwell F.E., Pfeffer A., De Lisle G.W. et Corner L.A., 1994.** Experimental *Mycobacterium bovis* infection of cattle: effect of dose of *M. bovis* and pregnancy on immune responses and distribution of lesions. *New Zealand Veterinary Journal*. Vol. 42 (5), pp. 167-172.
- Buddle B.M., De Lisle G.W., Pfeffer A. et Aldwell F.E., 1995.** Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. *Vaccine*. Vol. 13 (12), pp. 1123-1130.
- Buddle B.M., Parlane N.A., Keen D.L., Aldwell F.E., Pollock J.M., Lightbody K. et Andersen P., 1999.** Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated and *M. bovis*-infected cattle by using recombinant mycobacterial antigens. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. Vol. 6 (1), pp. 1-5.
- Buddle B.M., Ryan T.J., Pollock J.M., Andersen P. et Lisle G.W., 2001.** Use of ESAT-6 in the interferon- γ test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. *Veterinary Microbiology*. Vol. 80, pp. 37-46.

Buddle B.M., McCarthy A.R., De Lisle G.W., Ryan T.J., Pollock J.M., Vordermeier H.M., Hewinson R.G. et Andersen P., 2003. Use of mycobacterial peptides and recombinant proteins for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-positive cattle. *The Veterinary Record*. Vol. 153 (20), pp. 615-620.

Buddle B.M., Wedlock D.N., Denis M. et Skinner M.A., 2005. Identification of immune response correlates for protection against bovine tuberculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol. 108, pp. 45-51.

Buddle B.M., Livingstone P.G. et De Lisle G.W., 2009. Advances in ante-mortem diagnosis of tuberculosis in cattle. *New Zealand Veterinary Journal*. Vol. 57 (4), pp. 173-180.

Burmester G.R., Pezzutto A. et Wirth J., 2000. Analyses biologiques : réactions antigènes-anticorps. *Atlas de poche d'Immunologie*. Medecine-Sciences, Flammarion, Paris. pp.72-73.

Cagiola M., Feliziani F., Severi G., Pasquali P. et Rutili D., 2004. Analysis of possible factors affecting the specificity of the gamma-interferon test in tuberculosis-free cattle herds. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. Vol. 11, pp. 952-956.

Cardoso M.A., Cardoso R.F., Hirata R.D.C., Hirata M.H., Leite C.Q.F., Santos A.C.B., Siqueira V.L.D., Okano W., Rocha N.S. et Lonardonni M.V.C., 2007. Direct detection of *Mycobacterium bovis* in bovine lymph nodes by PCR. *Zoonoses and Public Health*. Vol. 56, pp. 465-470.

Carpenter E., Fray L., et Gormley E., 1997. Cellular responses and *Mycobacterium bovis* BCG growth inhibition by bovine lymphocytes. *Immunology and Cell Biology*. Vol. 75, pp. 554-560.

Carr M.D., Bloemink M.J., Dentten E., Whelan A.O., Gordon S.V., Kelly G., Frenkiel T.A., Hewinson R.G. et Williamson R.A., 2003. Solution structure of the *Mycobacterium tuberculosis* complex protein MPB70. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 278 (44), pp. 43736-43743.

Cassidy J.P., Bryson D.G., Pollock J.M., Evans R.T., Foster F. et Neill S.D., 1999. Lesions in cattle exposed to *Mycobacterium bovis*-inoculated calves. *Journal of Comparative Pathology*. Vol. 121, pp. 321-337.

Castets M., Rist N. et Boisvert. H., 1969. La variété africaine du bacille tuberculeux humain. *Médecine d'Afrique Noire*. Vol. 16, pp. 321-322.

Cattoir V., 2004. Identification moléculaire des mycobactéries et détection de la résistance aux antibiotiques. *Annales de Biologie Clinique*. Vol. 62 (4) pp. 405-413.

Chenal R., 1994. Contribution au diagnostic de la tuberculose bovine. Thèse Médecine Vétérinaire. ENV Lyon; n°103, 118 pages.

China B., Ghafir Y. et Daube G, 2002. Estimation quantitative et qualitative par amplification génétique des bactéries présentes dans les denrées alimentaires. *Analyses Médicales et Vétérinaires*. Vol. 147, pp. 99-109.

- Coad M., Hewinson R.G., Clifford D., Vordermeier H.M. et Whelan A.O., 2007.** Influence of skin testing and blood storage on interferon- γ production in cattle affected naturally with *Mycobacterium bovis*. The Veterinary Record. Vol. 160 (19), pp.660-662.
- Coad M., Downs S.H., Durr P.A., Clifton-Hadley R.S., Hewinson R.G., Vordermeier H.M. et Whelan A.O., 2008.** Blood-based assays to detect *Mycobacterium bovis*-infected cattle missed by tuberculin skin testing. The Veterinary Record. Vol. 162, pp. 382-384.
- Coad M., Clifford D., Rhodes S.G., Hewinson R.G., Vordermeier H.M. et Whelan A.O., 2010.** Repeat tuberculin skin testing leads to desensitisation in naturally infected tuberculous cattle which is associated with elevated Interleukin-10 and decreased IL-1 beta responses. Veterinary Microbiology. Vol. 41 (2), pp. 14-26.
- Cockle P.J., Gordon S.V., Hewinson R.G. et Vordermeier H.M., 2006.** Field evaluation of a novel differential diagnostic reagent for detection of *Mycobacterium bovis* in cattle. Clinical and Vaccine Immunology. Vol. 13 (10), pp. 1119-1124.
- Coetzer J.A.W. et Tustin R.C., 2004.** Infections diseases of livestock. Chapter Mycobacteria-Introduction, Section 5 Bacterial diseases, Volume 3, pp. 1965-1972, 2nd edition, Oxford editorial.
- Collins D.M. et Stephens D.M., 1991.** Identification of an insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. FMS Microbiology Letters. Vol. 83, pp. 11-16.
- Corner L.A. et Trajstman A.C., 1988.** An evaluation of 1-hexadecylpyridinium chloride as decontaminant in the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine lesions. Veterinary Microbiology. Vol.18 (2), pp. 127-134.
- Corner L.A., 1994.** *Post mortem* diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Veterinary Microbiology. Vol. 40 (1-2), pp. 53-63.
- Corner L.A.L., 2006.** The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: How to assess the risk. Veterinary Microbiology. Vol. 112 (2-4), pp. 303-312.
- Coros A., DeConno E. et Derbyshire K.M., 2008.** IS6110, a *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific insertion sequence, is also present in the genome of *Mycobacterium smegmatis*, suggestive of lateral gene transfer among mycobacterial species. Journal of Bacteriology. Vol. 190 (9), pp. 3408-3410.
- Cosivi O., Grange J.M., Daborn C.J., Raviglione M.C., Fujikura T., Cousins D., Robinson R.A., Huchzermeyer H.F.A.K., De Kantor I. et Meslin F.X., 1998.** Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Emerging infectious diseases. Vol. 4 (1), pp. 59-70 (<http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no1/cosivi.htm>).
- Costello E., Doherty M.L., Monaghan M.L., Quigley F.C. et O'Reilly P.F., 1998.** A study of cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis* infection. The Veterinary Journal. Vol. 155, pp. 245-250.

Cousins D., Wilton S. et Francis B., 1991. Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Microbiology*. Vol. 27, pp.187-195. Cité par Fisanotti J.C. *et al.*, 1997.

Cousins D.V., Bastida R., Cataldi A., Quse V., Redrobe S., Dow S., Duignan P., Murray A., Dupont C., Ahmed N., Collins D.M., Butler W.R., Dawson D., Rodríguez D., Loureiro J., Romano M.I., Alito A., Zumarraga M. et Bernardelli A., 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 53, pp. 1305-1314.

Cousin D.V., Huchzermeyer H.F.K.A., Griffin J.F.T., Bruckner G.K., Van Rensburg I.B.J. et Kriek N.P.J., 2004. Chapter Mycobacteria, Tuberculosis, Section 5 Bacterial diseases, Volume 3, pp. 1973-1993, *In* Infections diseases of livestock. Coetzer J.A.W. et Tustin R.C., 2nd edition, Oxford editorial. 2004.

Crubézy E., Ludes B., Poveda J.D., Clayton J., Crouau-Roy B. et Montagnon D., 1998. Identification of *Mycobacterium* DNA in an Egyptian Pott's disease of 5400 years old. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Séries III - Sciences de la Vie*. Vol. 321 (11), pp. 941-951.

David H., Levy-Frebault V. et Thorel M.F., 1989. Méthodes de laboratoire pour la bactériologie clinique. Collection Commission des laboratoires de références et d'expertises de l'Institut Pasteur, Paris. 87 pages.

De Araujo C.P., Fugimura Leite C.Q., De Prince K.A., Dos Santos Goncalves J.L. et Rosa Osorio A.L.A., 2005. *Mycobacterium bovis* identification by a molecular method from *post-mortem* inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Vol. 100 (7), pp. 749-752.

De Kantor I.N., Ambroggi M., Poggi S., Morcillo N., Da Silva Telles M.A., Osório Ribeiro M., Garzón Torres M.C., Llerena Polo C., Ribón W., García V., Kuffo D., Asencios L., Vásquez Campos L.M., Rivas C. et De Waard J.H., 2008. Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. *Tuberculosis*. Vol. 88 (4), pp. 358-365.

Delacour H., Servonnet A. et Roche C., 2009. Critères d'évaluation de la validité d'un test biologique. *Revue Francophone des Laboratoires*. Vol. 412, pp. 41-48.

Delafosse A., Goutard F. et Thébaud E., 2002. Epidémiologie de la Tuberculose et de la Brucellose des bovins en zone périurbaine d'Abéché Tchad. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*. Vol. 55 (1), pp. 5-13.

De la Rua-Domenech R., Goodchild A.T., Vordermeier H.M., Hewinson R.G., Christiansen K.H. et Clifton-Hadley R.S., 2006a. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnosis techniques. *Research in Veterinary Science*. Vol. 81, pp. 190-210.

- De la Rua-Domenech R., Goodchild A.T., Vordermeier H.M. et Clifton-Hadley R.S., 2006b.** Ante mortem diagnosis of Bovine Tuberculosis: the significance of unconfirmed test reactors. *Government Veterinary Journal*. Vol. 16 (1), pp. 65-71. (Site web consulté le 17/02/2010 : <http://www.defra.gov.uk/gvs/publications/gvj/pdf/gvj-vol1601.pdf>).
- De la Rua-Domenech R., 2006c.** Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis*. Vol. 86, pp. 77-109.
- Denny G.O. et Wilesmith J.W., 1999.** Bovine tuberculosis in Northern Ireland: a case-control study of herd risk factors. *The Veterinary Record*. Vol. 144 (12), pp. 305-310.
- Doherty M.L., Monaghan M.L., Bassett H.F. et Quinn P.J., 1995.** Effect of a recent injection of purified protein derivative on diagnostic tests for tuberculosis in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Research in Veterinary Science*. Vol. 58 (3), pp. 217-221.
- Duffielda B.J. et Younga D.A., 1985.** Survival of *Mycobacterium bovis* in defined environmental conditions. *Veterinary Microbiology*. Vol. 10 (2), pp. 193-197.
- Durand B., Gouyet L., Ostyn A., Thorel M.F. et Haddad N., 2004.** Intérêt épidémiologique du typage moléculaire de *Mycobacterium bovis*. *Bulletin des GTV*. 23 janvier/février, pp. 311-314.
- Dziadek J., Sajduda A., Dale J.W. et McFadden J.J., 1998.** IS990, a new species-specific insertion-sequence-related element of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology*. Vol. 144, pp. 3407-3412.
- Dziadek J., Wolinska I., Sajduda A., Dela A. et McFadden J.J., 2000.** IS1607, a single-copy insertion sequence-related element of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. Vol. 4 (11), pp. 1078-1081.
- Dziadek J., Sajduda A. et Borun M., 2001.** Specificity of insertion sequence-based PCR assays for *Mycobacterium tuberculosis* complex. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. Vol. 5 (6), pp. 569-574.
- EFSA & ECDC, 2010.** The Community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *The European Food Safety Authority Journal* 2010. Vol.1496, 288 pages.
- Erlich H.A., Gelfand D. et Sninsky J.J., 1991.** Recent advances in the Polymerase Chain Reaction. *Science*. Vol. 252 (5012), pp. 1643-1650.
- Evans J.T., Smith E.G., Banerjee A., Smith R.M., Dale J., Innes J.A., Hunt D., Tweddell A., Wood A., Anderson C., Hewinson R.G., Smith N.H., Hawkey P.M. et Sonnenberg P., 2007.** Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. *The Lancet*. Vol. 369 (9569), pp. 1270-1276.
- Fabre P., Garin-Bastuji B. et Boschioli M.L., 2006.** Le système français de surveillance de la tuberculose bovine. *Bulletin épidémiologique Afssa*. N°21, juin 2006, pp. 6-7.

- Faye S., Boschioli M.L., Moyen J.L., Bénét J.J., Garin-Bastuji B. et Gares H., 2008.** Etudes de la spécificité et de la sensibilité relatives aux tests tuberculiques de la technique de dosage d'interféron gamma pour le diagnostic de la tuberculose bovine en Dordogne. Rencontres Recherches Ruminants. Vol. 15, pp. 81-84. Cf. Annexe XVI-1.
- Faye S., Moyen J.L., Gares H., Bénét J.J., Garin-Bastuji B. et Boschioli M.L., sous presse.** Determination of decisional cut-off values for the optimal diagnosis of bovine tuberculosis with a modified IFN γ assay (Bovigam[®]) in a low prevalence area in France. Veterinary Microbiology, édition spéciale de la 5^{ème} Conférence Internationale *M. bovis*, Wellington (NZ) août 2009. Cf. Annexe XVI-2.
- Fisanotti J.C., Romano M.I., Alito A., Bigi F. et Cataldi A., 1997.** An *mpb-64* flanking sequence for *Mycobacterium bovis*. Research in Microbiology. Vol. 148, pp. 427-435.
- Flesh I.E., Kaufmann S.H., 1990.** Activation of tuberculostatic macrophage functions by gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor. Infection and Immunity. Vol. 58 (8), pp. 2675-2677.
- Flynn J.L., Chan J., Triebold K., Dalton Ta, Stewart T.A et Bloom B.R. 1993.** An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. The Journal of Experimental Medicine. Vol. 178 (6), pp. 2249-2254.
- Food Safety Authority of Ireland, 2008.** Zoonotic tuberculosis and food safety. Microbiological risk assessment. Dublin, Ireland, 2 2008.
- Fráguas S.A., Cunha-Abreu M.S., Marassi C.D., Oelemann W.M.R., Fonseca L.S. et Lilenbaum W., 2006.** Comment on: Use of ELISA as a confirmatory test for bovine tuberculosis at slaughter. Letter to the Editor. Preventive Veterinary Medicine. Vol. 77 (3-4), pp. 304-305.
- Francis J., 1958.** Tuberculosis in Animals and Man. 357 pages London: Cassell & Co. Cité par Menzies F.D. et Neill S.D. en 2000, Neill S.D., Bryson D.G. et Pollock J.M. en 2001, Pollock J.M. et Neill D. en 2002.
- Francis J., 1971.** Susceptibility to tuberculosis and the route of infection. Australian Veterinary Journal. Vol. 47, pp. 414-. Cité par Menzies F.D. et Neill S.D. en 2000, Neill S.D., Bryson D.G. et Pollock J.M. en 2001.
- Francis J., 1972.** Route of infection in tuberculosis. Australian Veterinary Journal Vol. 48, pp. 578-. Cité par Menzies F.D. et Neill S.D. en 2000.
- Fritsche A., Engel R., Buhl D., Zellweger J.P., 2004.** *Mycobacterium bovis* tuberculosis: from animal to man and back. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. Vol. 8 (7), pp. 903-904.
- Ganière J.P., Bonjour P., Coustel G., Dufour B., Picavet D.P., Rogy C., Toma B. et Guerin B., 2009.** Cours de législation et réglementation sanitaires vétérinaires générales. Polycopié des Unités de maladies contagieuses des Ecoles vétérinaires françaises. 123 p.

- Gannon B.W., Hayes C.M. et Roe J.M., 2007.** Survival rate of airborne *Mycobacterium bovis*. Research in Veterinary Science. Vol. 82 (2), pp. 169-172.
- Garnier T., Eiglmeier K., Camus J.C., Medina N., Mansoor H., Pryor M., Duthoy S., Grondin S., Lacroix C., Monsempe C., Simon S., Harris B., Atkin R., Doggett J., Mayes R., Keating L., Wheeler P.R., Parkhill J., Barrell B.G., Cole S.T., Gordon S.V. et Hewinson R.G., 2003.** The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. Vol. 100 (13), pp. 7877-7882.
- GDS24, 2005.** Point Tuberculose Bovine au 01/07/05 : Modalités de contrôle. *Infos* du Groupement de Défense Sanitaire du Bétail de la Dordogne (G.D.S.B 24). 3 pages.
- Goff B.S.L., 1996.** Effect of dexamethasone treatment of tuberculous cattle on results of the gamma-interferon test for *Mycobacterium bovis*. Veterinary Immunology and Immunopathology. Vol. 53 (1-2), pp. 39-47.
- González Llamazares O.R., Gutiérrez Martín C.B., Aranaz Martín A., Liébana Criado E., Domínguez Rodríguez L. et Rodríguez Ferri E.F., 1999a.** Comparison of different methods for diagnosis of bovine tuberculosis from tuberculin- or interferon- γ -reacting cattle in Spain. Journal of Applied Microbiology. Vol. 87, pp. 465-471.
- González Llamazares O.R., Gutiérrez Martín C.B., Alvarez Nistal D., De la Puente Redondo V.A., Domínguez Rodríguez L., Rodríguez Ferri E.F., 1999b.** Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon- γ assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. Veterinary Microbiology. Vol. 70 (1-2), pp. 55-66.
- Goodchild A.V. et Clifton-Hadley R.S., 2001.** Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. Tuberculosis. Vol. 81 (1-2), pp. 23-41.
- Gormley E., Doyle M.B., McGill K., Costello E., Good M. et Collins J.D., 2004.** The effect of the tuberculin test and the consequences of a delay in blood culture on the sensitivity of a gamma-interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Veterinary Immunology and Immunopathology. Vol. 102, pp. 413-420.
- Gormley E., Doyle M. B., Fitzsimons T., McGill K. et Collins J. D., 2005.** Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam[®]) assay. Veterinary Microbiology. Vol. 112, pp. 171-179.
- Grange J.M. et Yates M.D., 1994.** Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. Veterinary Microbiology. Vol. 40 (1-2), pp. 137-151.
- Griffin J.M., Martin S.W., Thorburn M.A., Eves J.A. et Hammond R.F., 1996.** A case-control study on the association of selected risk factors with the occurrence of bovine tuberculosis in the Republic of Ireland. Preventive Veterinary Medicine. Vol. 27 (3-4), pp. 217-229.
- Griffin J.F.T. et Mackintosh C.G., 2000.** Tuberculosis in Deer: Perceptions, Problems and Progress. The Veterinary Journal. Vol. 160 (3), pp. 202-219.

Gutiérrez C.M.M. et Martín J.F.G., 1993. Comparison of Ziehl-Neelsen staining and immunohistochemistry for the detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and caprine tuberculous lesions. *Journal of Comparative Pathology*. Vol. 109 (4), pp. 361-370.

Gutiérrez M., Tellechea J. et García Marín J.F., 1998. Evaluation of cellular and serological diagnostic tests for the detection of *Mycobacterium bovis*-infected goats. *Veterinary Microbiology*. Vol. 62, pp. 281-290.

Haddad N., Ostyn A., Karoui C., Masselot M., Thorel M.F., Hugues S.L., Inwald J., Hewinson R.G. et Durand B., 2001. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in France from 1979 to 2000. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 39 (10), pp. 329-330.

Haddad N., Masselot M. et Durand B., 2004a. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. *Research in Veterinary Science*. Vol. 76, pp. 1-18.

Haddad N., Ostyn A., Karoui C., Thorel M.F. et Durand B., 2004b. Le typage moléculaire des isolats de *Mycobacterium bovis*. *Bulletin des GTV*. 23 janvier/février, pp. 329-330.

Han X.Y., Pham A.S., Tarrand J.J., Sood P.K. et Luthra R., 2002. Rapid and accurate identification of mycobacteria by sequencing hypervariable regions of the 16S ribosomal RNA gene. *American Journal of Clinical Pathology*. Vol. 118, pp. 796-801. Cité par Cattoir V., 2004.

Hanna J., Neill S.D. et O'Brien J.J., 1992. ELISA tests for antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*. Vol. 31 (2-3), pp. 243-249.

Harboe M., Wiker H.G., Duncan J.R., Garcia M.M., Dukes T.W., Brooks B.W., Turcotte C. et Nagai S., 1990. Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 28 (5), pp. 913-921.

Harboe M., Oettinger T., Wiker H.G., Rosenkrands I. et Andersen P., 1996. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infection and Immunity*. Vol. 64 (1), pp. 16-22.

Harris N.B., Payeur J., Bravo D., Osorio R., Stuber T., Farrel D., Paulson D., Treviso S., Mikolon A., Rodriguez-lauinz A., Cernek-hoskin S., Rast R., Ginsberg M. et Kinde H., 2007. Recovery of *Mycobacterium bovis* from soft fresh cheese originating in Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 73 (3), pp. 1025-1028.

Hars J., 2002. Surveillance de la tuberculose sur les ongulés sauvages de la forêt de Brotonne (Seine-Maritime et Eure). Rapport scientifique 2002 ONCFS. (Site web consulté le 04/02/2010, http://www.oncfs.gouv.fr/events/point_faune/suivi-sanitaire/2003/Hars2003.pdf).

Hars J., Boschioli M.L., Belli P., Vardon J., Coquatrix E., Garin-Bastuji B. et Thorel M.F., 2004. Découverte du premier foyer de tuberculose sur les ongulés sauvages en France. *Revue ONCFS Faune sauvage*. Vol. 261, pp. 29-34.

- Hars J., Boschioli M.L., Duvauchelle A. et Garin-Bastuji B., 2006.** La tuberculose à *Mycobacterium bovis* chez le cerf et le sanglier en France ; Emergence et risque pour l'élevage bovin. Bulletin Académique Vétérinaire France. Vol. 159 (5), pp. 393-401.
- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J. et Williams P.M., 1996.** Real time quantitative PCR. Genome Research. Vol. 6, pp. 986-994.
- Hellyer T.J., Desjardin L.E., Assaf M.K., Bates J.H., Cave M.D. et Eisenach K.D., 1996.** Specificity of IS6110-based amplification assays for *Mycobacterium tuberculosis* Complex. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 34 (11), pp. 2843-2846.
- Hénault S., Karoui C. et Boschioli M.L., 2006.** A PCR-Based method for tuberculosis detection in wildlife. Developments in biologicals (Basel). Vol. 126, pp. 123-132.
- Hermans P.W.M., Van Soolingen D., Dale J.W., Schuitema A.R.J., McAdam R.A., Catty D. et Van Embden J.D.A., 1990.** Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 28 (9), pp. 2051-2058.
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G. et Watson R., 1993.** Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Bio/Technology. Vol. 11, pp. 1026-1030.
- Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S. and Griffith R., 1992.** Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Bio/Technology. Vol. 10, pp. 413-417.
- Houlihan M., 2010.** Isolation of *Mycobacterium kansasii* from calf reactors in a TB-restricted dairy herd. The Veterinary Record. Vol. 166 (9), pp. 272-273.
- Huard R.C., De Oliveira Lazzarini L.C., Butler W.R., Van Soolingen D. et Ho J.L., 2003a.** PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 41 (4), pp. 1637-1650.
- Huard R.C., Chitale S., Leung M., Oliveira Lazzarini L.C., Zhu H., Shashkina E., Laal S., Conde M.B., Kritski A.L., Belisle J.T., Kreiswirth B.N., Lapa e Silva J.R. et Ho J.L., 2003b.** The *Mycobacterium tuberculosis* complex-restricted gene *cfp32* encodes an expressed protein that is detectable in tuberculosis patients and is positively correlated with pulmonary interleukin-10. Infection and Immunity. Vol. 71 (12), pp. 6871-6883.
- Huard R.C., Fabre M., De Haas P., De Oliveira Lazzarini L.C., Van Soolingen D., Cousins D. et Ho J.L., 2006.** Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Journal of Bacteriology. Vol. 188 (12), pp. 4271-4287.
- Hugues M.S., Ball N.W., McCarroll J., Erskine M., Taylor M.J., Pollock J.M., Skuce R.A. et Neill S.D., 2005.** Molecular analyses of mycobacteria other than the *M tuberculosis* complex isolated from Northern Ireland cattle. Veterinary Microbiology. Vol. 108, pp.101-112.

- Huitema H., et Jaartsveld. F.H.J., 1967.** *Mycobacterium microti* infection in a cat and some pigs. *Antonie Leeuwenhoek*. Vol. 33, pp. 209-212.
- Humblet M.F., Boschioli M.L. et Saegerman C., 2009.** Classification of worldwilde bovine tuberculosis risk of factors in cattle: a stratified approach. *Veterinary Research*. Vol. 40, pp. 50-74.
- Humblet M.F., Gilbert M., Govaerts M., Fauville-Dufaux M., Walravens K. et Saegerman C., 2010.** New assessment of bovine tuberculosis risk factors in Belgium based on nationwide molecular epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 48 (8), pp. 2802-2808.
- Jha V.C., Morita Y., Dhakal M., Besnet B., Sato T., Nagai A., Kato M., Kozawa K., Yamamoto S. et Kimura H., 2007.** Isolation of *Mycobacterium* spp. from milking buffaloes and cattle in Nepal. *Journal of Veterinary Medical Science*. Vol. 69 (8), pp. 819-825.
- Jordao Junior C.M., Lopes F.C.M., David S., Farache Filho A. et Leite C.Q.F., 2009.** Detection of nontuberculous mycobacteria from water buffalo raw milk in Brazil. *Food Microbiology*. Vol. 26, pp. 658-661.
- Jungersen G., Huda A., Hansen J.J. et Lind P., 2002.** Interpretation of the gamma interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. Vol. 9 (2), 453-460.
- Karlson A.G. et Lessel E.F., 1970.** *Mycobacterium bovis* nom. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. 20 (3), pp. 273-282.
- Kasai H., Ezaki T. et Harayama S., 2000.** Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 38 (1), pp. 301-308.
- Kent L., McHugh T.D., Billington O., Dale J.W. et Gillespie S.H., 1995.** Demonstration of homology between IS6110 of *Mycobacterium tuberculosis* and DNAs of other *Mycobacterium* spp. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 33 (9), pp. 2290-2293.
- Konuk M., Korcan E., Dülgerbaki S. et Altindiş M., 2007.** Isolation and identification of mycobacteria from raw milk samples in Afyonkarahisar district of Turkey. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 115, pp. 343-347.
- Kurabachew M., Enger Ø., Sandaa R.A., Skuce R. et Bjorvatn B., 2004.** A multiplex polymerase chain reaction assay for genus-, group- and species-specific detection of mycobacteria. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. Vol. 49, pp. 99-104.
- Kusomoki S., Murata Y., Minamide W., Uchida K., Miura H. et Ezaki T., 1992.** Rapid and direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and mycobacteria in sputum by advanced method PCR. *Journal of Japanese Association of Infection Diseases*. Vol. 66, pp. 1682-1691. Cité par Fisanotti J.C. *et al.*, 1997.

- Langerova M. et Tacquet A., 1968.** Comparaison de différentes méthodes d'homogénéisation et de purification des produits pathologiques en fonction de milieux de culture solides ou liquides. Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé. Vol. 39, pp. 663-680.
- Larzul D., 1989.** La PCR : principes et applications. Immunoanalyse et Biologie Spécialisée. Vol. 16, pp. 19-28.
- Lauzi S., Pasotto D., Amadori M., Archetti I. L., Poli G. and Bonizzi L., 2000.** Evaluation of the specificity of the γ -interferon test in italian bovine tuberculosis-free herds. The Veterinary Journal. Vol. 160, pp. 17-24.
- Legrand E., Sola C. et Rastogi N., 2000.** Le complexe *Mycobacterium avium-intracellulare* : marqueurs phénotypiques et génotypiques et les bases moléculaires de la transmission inter-espèces. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique. Vol. 93 (3), pp. 182-192.
- Leite C.Q.F., Anno I.S., Leite S.R.A., Roxo E., Morlock G.P. et Cooksey R.C., 2003.** Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Vol. 98 (3), pp. 319-323.
- Liébana E., Aranaz A., Mateos A., Vilafrancia M., Gomez-Manpaso E., Tercero J.C., Alemany J., Suárez G., Domingo M. et Domínguez L., 1995.** Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in bovine tissue samples by PCR. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 33 (1), pp. 33-36.
- Liébana E., Aranaz A., Francis B. et Cousins D., 1996.** Assessment of genetic markers for species differentiation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 34 (4), pp. 933-938.
- Liesegang T.J. et Cameron J.D., 1980.** *Mycobacterium bovis* infection of the conjunctiva. Archives of Ophthalmology. Vol. 98 (10), pp. 1764-1766.
- Lightbody K.A., Skuce R.A., Neill S.D. et Pollock J.M., 1998.** Mycobacterial antigen-specific antibody responses in bovine tuberculosis: an ELISA with potential to confirm disease status. The Veterinary Record. Vol. 142 (12), pp. 295-300.
- Lilenbaum W., Ribeiro E.R., Souza G.N., Moreira E.C., Fonseca L.S., Ferreira M.A.S. and Schettini J., 1999.** Evaluation of an ELISA-PPD for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. Research in Veterinary Science. Vol. 66, pp. 191-195.
- Lilenbaum W. et Fonseca L.S., 2006.** The use of Elisa as a complementary tool for bovine tuberculosis control in Brazil. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. Vol. 43 (2), pp. 256-261.
- Lugton I.W., Wilson P.R., Morris R.S., Griffin J.F. et De Lisle G.W., 1997.** Natural infection of red deer with bovine tuberculosis. The New Zealand Veterinary Journal. Vol. 45 (1), pp. 19-26.

- Lyashchenko K.P., Pollock J.M., Colangeli R. et Gennaro M.L., 1998.** Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Infection and Immunity*. Vol. 66 (11), pp. 5344-5349.
- Marassi C.D., Medeiros L. et Lilenbaum W., 2010.** The use of a gamma-interferon assay to confirm a diagnosis of bovine tuberculosis in Brazil. *Acta Tropica*. Vol. 113, 199-201.
- McAdam R.A., Hermans P.W.M., Van Soolingen D., Zainuddin Z.F., Catty D., Van Embden J.D.A et Dale J.W, 1990.** Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. *Molecular Microbiology*. Vol. 4 (9), pp. 1607-1613.
- McCorry T.P., McCormick C.M., Hughes M.S., Pollock J.M., et Neill S.D., 2004.** *Mycobacterium nonchromogenicum* in nasal mucus from cattle in a herd infected with bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*. Vol. 99, pp. 281-285.
- McEvoy C.R.E., Falmer A.F., Gey Van Pittius N.C., Victor T.C., Van Helden P.D. et Warren R.M., 2007.** The role of IS6110 in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. Vol. 87, 393-404.
- McHugh T.D., Newport L.E. et Gillespie S.H., 1997.** IS6110 homologs are present in multiple copies in mycobacteria other than tuberculosis-causing mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 35 (7), pp. 1769-1771.
- McIlroy, S.G., Neill, S.D. et McCracken, R.M., 1986.** Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. *Veterinary Record*. Vol. 118 (26), pp. 718-721.
- Meade K.G., Gormley E., Doyle M.B., Fitzsimons T., O'Farrelly C., Costello E., Keane J., Zhao Y, MacHugh D.E., 2007.** Innate gene repression associated with *Mycobacterium bovis* infection in cattle: toward a gene signature of disease. *BMC Genomics*. Vol. 8, pp. 400.
- Menzies F.D. et Neill S.D., 2000.** Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *The Veterinary Journal*. Vol. 160, pp. 92-106.
- Michel A.L., Müller B. et Van Helden P.D., 2010.** *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: A problem, or not? *Veterinary Microbiology*. Vol. 140, pp. 371-381.
- Mignard S., Pichat C. et Carret G., 2006.** *Mycobacterium bovis* infection, Lyon, France. *Emerging infectious diseases*. Vol. 12 (9), pp. 1431-1433.
- Moda G., Daborn C.J., Grange J.M. et Cosivi O., 1996.** The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. *Tubercle and Lung Disease*. Vol. 77, pp. 103-108.
- Monaghan M.L., Doherty M.L., Collins J.D., Kazda J.F. et Quinn P.J., 1994.** The tuberculin test. *Veterinary Microbiology*. Vol. 40 (1-2), pp. 111-124.
- Morris R.S., Pfeiffer D.U. et Jackson R., 1994.** The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Veterinary Microbiology*. Vol. 40 (1-2), pp. 153-177.

- Morrison T.B., Weis J.J. et Wittwer C.T., 1998.** Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*. Vol. 24 (6), pp. 954-962.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. et Erlich H., 1986.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction *Cold Spring Harb. Symp. Quantitative Biology*. Vol. 51, pp. 263-273. Cité par Mullis K. en 1990.
- Mullis K., 1990.** The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*. Vol. 262 (4), pp.56-65.
- Neill S.D., Hanna J., O'Brien J.J. et McCracken R.M., 1988.** Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. *Veterinary Research*. Vol. 123 (13), pp. 340-343.
- Neill S.D., Hanna J., O'Brien J.J. et McCracken R.M., 1989.** Transmission of tuberculosis from experimentally infected cattle to in-contact calves. *Veterinary Research*. Vol. 124 (11), pp. 269-271.
- Neill S.D., O'Brien J.J. et Hanna J., 1991.** A mathematical model for *Mycobacterium bovis* excretion from tuberculous cattle. *Veterinary Microbiology*. Vol. 28 (1), pp. 103-109.
- Neill S.D., Cassidy J., Hanna J., Mackie D.P., Pollock J.M., Clements A., Walton E. et Bryson D.G., 1994a.** Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *The Veterinary Record*. Vol 135 (6), 134-135.
- Neill S.D., Pollock J.M., Bryson D.B. et Hanna J., 1994b.** Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*. Vol. 40 (1-2), pp. 41-52.
- Neill S.D., Bryson D.G. et Pollock J.M., 2001.** Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis*. Vol. 81(1/2), pp. 79-86.
- Ng K.H., Aldwell F.E., Wedlock D.N., Watson J.D. et Buddle B.M., 1997.** Antigen-induced interferon- γ and interleukin-2 responses of cattle inoculated with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol. 57 (1-2), pp. 59-68.
- Niemann S., Harmsen D., Rüsç-Gerdes S. et Richter E., 2000.** Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 38 (9), pp. 3231-3234.
- OIE, 2008a.** Bovine Tuberculosis. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008*. 6th Edition, Chapter 2.4.7. (Site web consulté le 17/07/2008 : http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.07_BOVINE_TB.pdf).
- OIE, 2008b.** Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres : Principes de la validation des épreuves de diagnostic des maladies infectieuses. Chapitre 1.1.4. (Site web consulté le 26/04/2010 : http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/pdf_fr/Volume%201_pdf/Chap%201.1.4._Validation_2008.pdf).
- OIE, 2010a.** Code sanitaire pour les animaux terrestres : notification de maladies et d'informations épidémiologiques, Chapitre 1.1. (Site web consulté le 26/10/2010 : http://www.oie.int/fr/normes/mcode/fr_chapitre_1.1.1.pdf).

OIE, 2010b. Code sanitaire pour les animaux terrestres : Epreuves de diagnostic prescrites ou de substitution pour les maladies de la liste de l'OIE, Chapitre 1.3. (Site web consulté le 26/10/2010 : http://www.oie.int/fr/normes/mcode/fr_chapitre_1.1.3.pdf).

OIE, 2010c. Code sanitaire pour les animaux terrestres : la Tuberculose bovine, Chapitre 11.6. (Site web consulté le 26/10/2010 : http://www.oie.int/fr/normes/mcode/fr_chapitre_1.11.6.pdf).

OIE, 2010d. Code sanitaire pour les animaux terrestres : Collecte et traitement de la semence de bovins, de petits ruminants et de verrats, Chapitre 4.6. (Site web consulté le 26/10/2010 : http://www.oie.int/fr/normes/mcode/fr_chapitre_1.4.6.pdf).

Olsen I., Boysen P., Kulberg S., Hope J.C., Jungersen G. et Storset A.K., 2005. Bovine NK cells can produce gamma interferon in response to the secreted mycobacterial proteins ESAT-6 and MMP14 but not in response to MPB70. *Infection and Immunity*. Vol. 73 (9), pp. 5628-5635.

O'Reilly L.M. et Dabornb C.J., 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: A review. *Tubercle and Lung Disease*. Vol. 76 (1), pp. 1-46.

Palmer M.V., Waters W.R. et Whipple D.L., 2002. Aerosol delivery of virulent *Mycobacterium bovis* to cattle. *Tuberculosis*. Vol. 82 (6), pp. 275-282.

Palmer M.V., Waters W.R. et Whipple D.L., 2004. Shared feed as a means of deer-to-deer transmission of *Mycobacterium bovis*. *Journal of Wildlife Diseases*. Vol. 40 (1), pp. 87-91.

Palmer M.V., Waters W.R., Thacker T.C., Greenwald R., Esfandiari J. et Lyashchenko K.P., 2006a. Effects of different tuberculin skin-testing regimens on gamma interferon and antibody responses in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Clinical and Vaccine Immunology*. Vol. 13, pp. 387-394.

Palmer M.V. et Waters W.R., 2006b. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know. *Veterinary Microbiology*. Vol. 115, pp. 181-190.

Panteix G., 2007a. Mycobactéries Tuberculeuses. Précis de Bactériologie Clinique sous la direction de Freney J., Renaud F., Leclercq R. et Riegel P.. Editions, ESKA. Vol. 72, pp. 1253-1266.

Panteix G., 2007b. Mycobactéries non Tuberculeuses. Précis de Bactériologie Clinique sous la direction de Freney J., Renaud F., Leclercq R. et Riegel P.. Editions, ESKA. Vol. 73, pp. 1267-1277.

Parra A., García N., García A., Lacombe A., Moreno F., Freire F., Moran J. et Hermoso de Mendoza J., 2008. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*. Vol. 127, pp. 315-324.

Perneger T. et Perrier A., 2004. Analyse d'un test diagnostique : courbe ROC, ou « receiver operating characteristic ». *Revue Maladies Respiratoires*. Vol. 21, pp. 398-401.

- Phillips C.J., Foster C.R., Morris P.A. et Teverson R., 2002.** Genetic and management factors that influence the susceptibility of cattle to *Mycobacterium bovis* infection. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*. Vol. 3 (1), pp. 3-13.
- Phillips C.J.C., Foster C.R.W., Morris P.A. et Teverson R., 2003.** The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Research in Veterinary Science*. Vol. 74, pp. 1-15.
- Plackett P., Ripper J., Corner L.A., Small K., De Witte K., Melville L., Hides S. et Wood P.R., 1989.** An ELISA for the detection of anergic tuberculous cattle. *Australian Veterinary Journal*. Vol. 66 (1), pp. 15-19.
- Poitras E. et Houde A., 2002.** La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology*. Vol. 2 (2), pp. 2-11.
- Pollock J.M. et Andersen P., 1997.** The potential of the ESAT-6 antigen secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*. Vol. 175 (5), pp. 1251-1254.
- Pollock J.M., Girvin R.M., Lightbody K.A., Clements R.A., Neill S.D., Buddle B.M. et Andersen P., 2000.** Assessment of defined antigens for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-reactor cattle. *The Veterinary Record*. Vol. 146 (23), pp. 659-665.
- Pollock J.M., McNair J., Welsh M.D., Girvin R.M., Kennedy H.E., Mackie D.P. et Neill S.D., 2001.** Immune responses in bovine tuberculosis. *Tuberculosis*. Vol. 81 (1-2), pp. 103-107.
- Pollock J.M. et Neill D., 2002.** *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *The Veterinary Journal*. 163, pp. 115-127.
- Pollock J.M., McNair J., Bassett H., Cassidy J. P., Costello E., Aggerbeck H., Rosenkrands I. et Andersen P., 2003.** Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identify tuberculosis-infected cattle. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 41 (5), pp. 1856-1860.
- Pollock J.M., Welsh M.D. et McNair J., 2005.** Immune responses in bovine tuberculosis: Towards new strategies for the diagnosis and control of disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol. 108, pp. 37-43.
- Pollock J.M., Rodgers J.D., Welsh M.D. et McNair J., 2006.** Pathogenesis of bovine tuberculosis: The role of experimental models of infection. *Veterinary Microbiology*. Vol. 112 (2-4), pp. 141-150.
- Prodinger W.M., Brandstätter A., Naumann L., Pacciarini M., Kubica T., Boschioli M.L., Aranaz A., Nagy G., Cvetnic Z., Ocepek M., Skrypnyk A., Erler W., Niemann S., Pavlik I. et Moser I., 2005.** Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 43 (10), pp. 4984-4992.

- Radostits O.M., Blood D.C. et Gay C.C., 1994.** Diseases caused by bacteria IV, *Mycobacterium spp.*. Veterinary Medicine, a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. Baillière Tindall. Eighth edition. Chapter 19, pp. 830-850.
- Rangen S.A., Surujballi O.P., Lutze-Wallace C. et Wanes Lees V., 2009.** Is the gamma interferon assay in cattle influenced by multiple tuberculin injections? The Canadian Veterinary Journal. Vol. 50, pp. 270-274.
- Rhodes S.G., Buddle B.M., Hewinson R.G. et Vordermeier H.M., 2000a.** Bovine tuberculosis: immune responses in the peripheral blood and at the site of active disease. Immunology. Vol. 99 (2), pp. 195-202.
- Rhodes S.G., Gavier-Widen D., Buddle B.M., Whelan A.O., Singh M., Hewinson R.G. et Vordermeier H.M., 2000b.** Antigen specificity in experimental bovine tuberculosis. Infection and Immunity. Vol. 68 (5), pp. 2573-2578.
- Ripoche M., 2009.** Etude et évaluation de l'efficacité du protocole interféron en Dordogne dans le cadre de la lutte contre la tuberculose bovine. Rapport de stage de Master 2^{ème} année Santé Publique Paris XI et Sciences et Santé Paris XII. 64 p.
- Ritacco V., Lopez B., Barrera L., Torrea G., Nader A., de Kantor I.N. et Fliess E., 1988.** Evaluation of four antigens for the detection of anti-*Mycobacterium bovis* antibodies by enzyme immunoassay. Revista Argentina de Microbiologia. Vol. 20 (2), pp. 97-101.
- Ritacco V., López B., De Kantor I.N., Barrera L., Errico F. et Nader A., 1991.** Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. Research in Veterinary Science. Vol. 50 (3), pp. 365-367.
- Rodriguez J.G., Mejia G.A., Del Portillo P., Patarroyo M.E. et Murillo L.A., 1995.** Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. Microbiology. Vol. 141, pp. 2131-2138.
- Rodríguez S., Romero B., Bezos J., De Juan L., Alvarez J., Castellanos E., Moya N., Lozano F., González S., Sáez-Llorente J.L., Mateos A., Domínguez L. et Aranaz A., 2010.** High spoligotype diversity within a *Mycobacterium bovis* population: clues to understanding the demography of the pathogen in Europe. Veterinary Microbiology. Vol. 141 (1-2), pp. 89-95.
- Roth A., Fischer M., Hamid M.E., Michalke S., Ludwig W. et Mauch H., 1998.** Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 36 (1), pp. 139-147. Cité par Cattoir V., 2004.
- Rothel J.S., Jones S.L., Corner L.A., Cox J.C. et Wood P.R., 1990.** A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- γ and its use for the detection of tuberculosis in cattle. Australian Veterinary Journal. Vol. 67 (4), pp. 134-137.
- Rothel J.S., Jones S.L., Corner L.A., Cox J.C. et Wood P.R., 1992.** The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. Australian Veterinary Journal. Vol. 69 (1), pp. 1-4.

- Roumy B., 1966.** Une enzootie de tuberculose bovine transmise par insémination artificielle. *Recueil de Médecine Vétérinaire*. Vol. 142, pp. 729-741.
- Runyon E. H., 1959.** Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Medical Clinics of North America*. Vol. 43, pp. 273-290.
- Ryan T.J., Buddle B.M. et De Lisle G.W., 2000.** An evaluation of gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *Research in Veterinary Science*. Vol. 69, pp. 57-61.
- Sauret J., Jolis R., Ausina V., Castro E. et Cornudella R., 1992.** Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*: report of 10 cases. *Tubercle and Lung Disease*. Vol. 73, pp. 388-391.
- Salmon M., 2002.** La PCR en temps réel. *Biofutur*. Vol. 219 (139), pp. 2-8.
- Savey M., 2004.** La tuberculose bovine en Grande Bretagne : une situation qui ne cesse de se dégrader. *Bulletin des GTV*. 23 janvier/février, pp. 321-322.
- Scantlebury M., Hutchings M.R., Allcroft D.J. et Harris S., 2004.** Risk of disease from wildlife reservoirs: badgers, cattle, and bovine tuberculosis. *Journal of Dairy Science*. Vol. 87, pp. 330-339.
- Schiller I., Waters W.R., Vordermeier H.M., Nonnecke B.J., Welsh M., Keck N., Whelan A., Sigafosse T., Stamm C., Palmer M.V., Thacker T.C., Hardegger R., Marg-Haufe B., Raeber A. et Oesch B., 2009.** Optimization of a whole-blood gamma interferon assay for detection of *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*. Vol. 16 (8), pp. 1196-1202.
- Schiller I., Vordermeier H.M., Waters W.R., Whelan A., Coad M., Gormley E., Buddle B.M., Palmer M.V., Thacker T.C., McNair J., Welsh M., Hewinson R.G. et Oesch B., 2010.** Bovine tuberculosis: Effect of tuberculin skin test on *in vitro* interferon gamma responses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol. 136 (1-2), pp. 1-11.
- Sechi L.A., Duprè I., Sanguinetti M., Fadda G. et Zanetti S., 1999.** Simple and rapid identification of different species of mycobacteria by PCR. *Molecular and Cellular Probes*. Vol. 13, pp. 141-146.
- Serraino A., Marchetti G., Sanguinetti V., Rossi M.C., Zanoni R.G., Catozzi L., Bandera A., Dini W., Mignone W., Franzetti F. et Gori A., 1999.** Monitoring of transmission of tuberculosis between wild boars and cattle: genotypical analysis of strains by molecular epidemiology techniques. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 37 (9), pp. 2766-2771.
- Shinnick T.M. et Good R.C., 1994.** Mycobacterial taxonomy. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Vol. 13 (11), pp. 884-901.
- Shitaye J.E., Getahun B., Alemayehu T., Skoric M., Trembl F., Fictum P., Vrbas V. et Pavlik I., 2006.** A prevalence study of bovine tuberculosis by using abattoir meat inspection and tuberculin skin testing data, histopathological and IS6110 PCR examination of tissues with tuberculous lesions in cattle in Ethiopia. *Veterinari Medicina*. Vol. 51 (11), pp. 512-522.

Skuce R.A., Brittain D., Hugues M.S., Beck L.A. et Neill S.D., 1994. Genomic fingerprinting of *Mycobacterium bovis* from cattle by restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 32 (10), pp. 2387-2392.

Smith N.H., Crawshaw T., Parry J. et Birtles R.J., 2009. *Mycobacterium microti*: More diverse than previously thought. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 47 (8), pp. 2551-2559.

Smithwick R.W., Stratigos C.B. et David H.L., 1975. Use of cetylpyridinium chloride and sodium chloride for the decontamination of sputum specimens that are transported to the laboratory for the isolation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 1 (5), pp. 411-413.

Sorensen A.L., Nagai S., Houen G., Andersen P. et Andersen A.B., 1995. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*. Vol. 63, pp. 1710-1717.

Stabel J.R., 1996. Production of gamma-interferon by peripheral blood mononuclear cells: an important diagnostic tool for detection of subclinical paratuberculosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. Vol. 8 (3), pp. 345-350.

Sunder S., Lanotte P., Godreuil S., Martin C., Boschioli M.L. et Besnier J.M., 2009. Human-to-human transmission of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in immunocompetent patients. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 47 (4), pp. 1249-1251.

Tasara T., Hoelzle L.E. et Stephan R., 2005. Development and evaluation of a *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) specific multiplex PCR assay. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 104, pp. 279-287.

Taylor G.M., Worth D. R., Palmer S., Jahans K. et Hewinson R.G., 2007. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Veterinary Research*. Vol. 3 (12), pp. 1-11.

Telenti A., Marchesi F., Balz M., Bally F., Böttger E.C. et Bodmer T., 1993. Rapid identification of Mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 31 (2), pp. 175-178.

Thierry D., Brisson-Noël A., Vincent-Levy-Frébault V., Nguyen S., Guesdon J.L et Gicquel B., 1990a. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 28, pp. 2668-2673.

Thierry D., Cave M.D., Eisenach K.D., Crawford J.T., Bates J.H., Gicquel B. et Guesdon J.L, 1990b. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Research*. Vol. 18 (1), 1 page.

Thoen C., LoBue P. et De Kantor I., 2006. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Veterinary Microbiology*. Vol. 112, pp. 339-345.

Thom M., Morgan J.H., Hope J.C., Villarreal-Ramos B., Martin M. et Howard C.J., 2004. The effect of repeated tuberculin skin testing of cattle on immune responses and disease following experimental infection with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol. 102, pp. 399-412.

Thom M.L., Hope J.C., McAulay M., Villarreal-Ramos B., Coffey T.J., Stephens S., Vordermeier H.M. et Howard C.J., 2006. The effect of tuberculin testing on the development of cell-mediated immune responses during *Mycobacterium bovis* infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol. 114 (1-2), pp. 25-36.

Thorel M.F. et Boisvert H., 1976. L'acide sulfurique à 4% sur les diverses espèces de mycobactéries. *Annales de Biologie Clinique*. Vol. 34, pp. 431-435.

Thorel M.F., 1982. Techniques d'isolement des mycobactéries. Mises au point et synthèses. *Bulletin des Laboratoires Vétérinaires*. Septembre, n°7, pp. 17-24.

Thorel M.F., 2003. Chapitre 75, La Tuberculose, pp. 927-949. *In Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail*. Lefèvre P.C., Blancou J., Chermette R., Uilenberg G. (eds.), Lavoisier, Paris, France, 2032 pages.

Toma B. et Dufour B., 2004. La nouvelle réglementation de la tuberculose animale en France, en 2004. *Bulletin des GTV*. 23 janvier/février, pp. 315-319.

Toma B., Dufour B., Sanaa M., Bénet J.J., Shaw A., Moutou F et Louza A., 2001. Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures. *AEEMA*. 2^{ème} édition. 696 pages.

Van Ingen J., Al-Hajoj S.A.M., Boeree M, Al-Rabiah F., Enaimi M., De Zwaan R., Tortoli E., Dekhuijzen R. et Van Soolingen D., 2009a. *Mycobacterium riyadhense* sp. nov., a non-tuberculous species identified as *Mycobacterium tuberculosis* complex by a commercial line-probe assay. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 59, pp. 1049-1053.

Van Ingen J., De Zwaan R., Dekhuijzen R., Boeree M. et Van Soolingen D., 2009b. Region of difference 1 in nontuberculous *Mycobacterium* species adds a phylogenetic and taxonomical character. *The Journal of Bacteriology*. Vol. 191, pp. 5865-5867.

Van Rhijn I., Godfroid J., Michel A. et Rutten V., 2008. Bovine tuberculosis as a model for human tuberculosis: advantages over small animal models. *Microbes and Infection*. Vol. 10 (7), pp. 711-715.

Van Soolingen D., Hermans P.W.M., De Haas P.E.W., Soll D.R. et Van Embden J.D.A., 1991. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 29 (11), pp. 2578-2586.

- Van Soolingen D., Hermans P.W.M., de Haas P.E.W. et Embden J.D.A., 1992.** Insertion element IS1081–Associated restriction fragment length polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. *Journal of Clinical Microbiology*, 1772-1777.
- Van Soolingen D., De Haas P.E.W., Haagsma J., Eger T., Hermans P.W.M., Ritacco V., Alito A. et Van Embden J.D.A., 1994.** Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 32 (10), pp. 2425-2433.
- Van Soolingen D., Hoogenboezem T., De Haas P.E.W., Hermans P.W.M., Koedam M.A., Teppema K.S., Brennan P.J., Besra G.S., Portaels F., Top J., Schouls L.M. et Embden J.D.A., 1997.** A novel pathogenic taxon of *Mycobacterium tuberculosis* complex *canetti*: characterization of an exceptional isolate from Africa. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. 47 (4), pp. 1236-1245.
- Van Soolingen D., Van der Zanden A.G.M., De Haas P.E.W., Noordhoek G.T., Kiers A., Foudraïne N.A., Portaels F., Kolk H.J.A., Kremer K. et Van Embden J.D.A., 1998.** Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 36 (7), pp. 1840-1845.
- Van Pinxteren L.A.H., Ravn P., Agger E.M., Pollock J. et Andersen P., 2000.** Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP-10. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. Vol. 7 (2), pp. 155-160.
- Varello K., Pezzolato M., Mascarino D., Ingravalle F., Caramelli M. et Bozzetta E., 2008.** Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. Vol. 20 (2), pp. 164-169.
- Villemin J.A., 1865.** Etudes expérimentales cliniques sur la tuberculose. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. Vol. 61, pp. 10-12.
- Vincent Levy-Frébault V. et Portaels F. 1992.** Proposed minimal standards for genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. 42 (2), pp. 315-323.
- Vincent V., 1995.** Taxonomie des Mycobactéries. *Revue Française des Laboratoires*. Février, n° 273, pp. 27-31.
- Vitale F., Capra G., Maxia L., Reale S., Vesco G. et Caracappa S., 1998.** Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle by PCR using milk, lymph node aspirates, and swabs nasal. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 36 (4), pp. 1050-1055.
- Vordermeier H.M. et Ewer K., 2006a.** Specificity trial of the Bovigam® IFN-gamma test in GB cattle. *Veterinary Laboratories Agency. Defra.* (Site web consulté le 15/03/2010 : http://www.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/diseases/atoz/tb/documents/gifn_specificityreport.pdf).

- Vordermeier H.M., Whelan A., Ewer K., Goodchild A.T., Clifton-Hadley R.S., Williams J. et Hewinson R.G., 2006b.** The Bovigam[®] assay as ancillary test to the tuberculin skin test. *Government Veterinary Journal*. Vol. 16 (1), pp. 72-80. (Site web consulté le 17/02/2010 : <http://www.defra.gov.uk/gvs/publications/gvj/pdf/gvj-vol1601.pdf>).
- Vordermeier H.M., Brown J., Cockle P.J., Franken W.P.J., Arend S.M., Ottenhoff T.M., Jahans K. et Hewinson R.G., 2007.** Assessment of cross-reactivity between *Mycobacterium bovis* and *M. kansasii* ESAT-6 and CFP-10 at the T-cell epitope level. *Clinical and Vaccine Immunology*. Vol. 14 (9), pp. 1203-1209.
- Walravens K., Wellemans V., Weynants V., Boelaerta F., deBergeyck V., Letesson J.J., Huygen K. et Godfroid J., 2001.** Analysis of the antigen-specific IFN γ producing T-cell subsets in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol. 6544, pp. 1-13.
- Walravens K., Marché S., Rosseels V., Wellemans V., Boelaert F., Huygen K. et Godfroid J., 2002.** INF- γ diagnostic tests in the context of bovine mycobacterial infections in Belgium. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol. 6645, pp. 1-6.
- Walravens K., Allix C., Supply P., Rigouts L., Godfroid J., Govaerts M., Portaels F., Dufey J., Vanholme L., Fauville-Dufaux M. et Saegerman C., 2006.** Dix années d'épidémiologie moléculaire de la tuberculose bovine en Belgique. *Epidémiologie et Santé Animale*. Vol. 49, pp. 103-111.
- Wang S.H., Mangino J.E., Stevenson K., Yakrus M.A., Cooksey R., Butler W.R., Healy M., Wise M.G., Schlesinger L.S. et Pancholi P., 2008.** Characterization of "*Mycobacterium paraffinicum*" associated with a pseudo-outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 46 (5), pp. 1850-1853.
- Wards B.J., Collins D.M. et De Lisle G.W., 1995.** Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*. Vol. 43 (2-3), pp. 227-240.
- Waters W.R., Palmer M.V., Pesch B.A., Olsen S.C., Wannemuehler M.J. et Whipple D.L., 2000.** Lymphocyte subset proliferative responses of *Mycobacterium bovis*-infected cattle to purified protein derivative. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol. 77, pp. 257-273.
- Waters W.R., Nonnecke B.J., Palmer M.V., Robbe-Austermann S., Bannantine J.P., Stabel J.R., Whipple D.L., Payeur J.B., Estes D.M., Pitzer J.E. et Minion F.C., 2004.** Use of Recombinant ESAT-6:CFP-10 Fusion Protein for Differentiation of Infections of Cattle by *Mycobacterium bovis* and by *M. avium* subsp. *avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. Vol. 11 (4), pp. 729-735.
- Waters W.R., Palmer M.V., Thacker T.C., Payeur J.B., Harris N.B., Minion F.C., Greenwald R., Esfandiari J., Andersen P., McNair J., Pollock J.M. et Lyashchenko K.P., 2006.** Immune responses to defined antigens of *Mycobacterium bovis* in cattle experimentally infected with *Mycobacterium kansasii*. *Clinical and Vaccine Immunology*. Vol. 13 (6), pp. 611-619.

- Waters W.R., Nonnecke B.J., Olsen S.C. et Palmer M.V., 2007.** Effects of pre-culture holding time and temperature on interferon- γ responses in whole blood cultures from *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Veterinary Microbiology*. Vol. 119, pp. 277-282.
- Watrelet-Virieux D., Drevon-Gaillet E., Toussaint Y. et Belli P., 2006.** Comparison of three diagnostic detection methods for tuberculosis in French cattle. *Journal of Veterinary Medicine*. Vol. 53, pp. 321-325.
- Wilkins M.J., Meyerson J., Bartlett P.C., Spieldenner S.L., Berry D.E., Mosher L.B. Kaneene J.B., Robinson-Dunn B., Stobierski M.G. et Boulton M.L., 2008.** Human *Mycobacterium bovis* infection and bovine tuberculosis outbreak, Michigan, 1994-2007. *Emerging infectious diseases*. Vol. 14 (4), pp. 657-660.
- Weldingh K. et Andersen P., 2008.** ESAT-6/CFP10 skin test predicts disease in *M. tuberculosis*-infected guinea pigs. *PLoS ONE*. Vol. 3 (4), pp. 1-6.
- Wedlock D.N., Skinner M.A., De Lisle G.W., Buddle B.M., 2002.** Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. *Microbes and Infection*. Vol. 4 (4), pp. 471-480.
- Wells A.Q. et Oxon D.M., 1937.** Tuberculosis in wild voles. *Lancet*. 232, pp. 1221-1226 ; in Van Soelingen D., Van der Zanden A.G.M., de Haas P.E.W., Noordhoek G.T., Kiers A., Foudraine N.A., Portaels F., Kolk H.J.A., Kremer K. et Van Embden J.D.A., 1998. Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 36 (7), pp. 1840-1845.
- Whelan A.O., Coad M., Peck Z.A.A., Clifford D., Hewinson R.G. et Vordermeier H.M., 2004.** Influence of skin testing and overnight sample storage on blood-based diagnosis of bovine tuberculosis. *The Veterinary Record*. Vol. 155 (7), pp. 204-206.
- Whipple D.L., Bolin C.A., Davis A.J., Jarnagin J.L., Johnson D.C., Nabors R.S., Payeur J.B., Saari D.A., Wilson A.J. et Wolf M.M., 1995.** Comparison of the sensitivity of the caudal fold skin test and a commercial gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis. *American Journal of Veterinary Research*. Vol. 56 (4), pp. 415-419.
- Whipple D.L., Palmer M.V., Slaughter R.E. et Jones S.L., 2001.** Comparison of purified protein derivatives and effect of skin testing on results of a commercial gamma interferon assay for diagnosis of tuberculosis in cattle. *Journal of Veterinary Diagnosis and Investigation*. Vol. 13, pp. 117-122.
- Wood P.R., Rothel J.S., McWaters P.G. et Jones S.L., 1990a.** Production and characterization of monoclonal antibodies specific for bovine gamma-interferon. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol. 25 (1), pp. 37-46.
- Wood P.R., Corner L.A. et Plackett P., 1990b.** Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon. *Research in Veterinary Science*. Vol. 49 (1), pp. 46-49.

Wood P.R., Corner L.A., Rothel J.S., Baldock C., Jones S.L., Cousins D.B., McCormick B.S., Francis B.R., Creeper J. et Tweddle N.E., 1991. Field comparison of interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Australian Veterinary Journal*. Vol. 68, pp. 286-290.

Wood P.R., Corner L.A., Rothel J.S., Ripper J.L., Fifis T., McCormick B.S., 1992. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*. Vol. 31 (1), pp. 71-79.

Wood P.R. et Rothel J.S., 1994. In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*. Vol. 40 (1-2), pp. 125-135.

Wood P.R. et Jones S.L., 2001. BOVIGAM™: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis*. Vol. 81 (1/2), pp. 147-155.

Young J.S., Gormley E. et Wellington E.M.H., 2005. Molecular detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium bovis* BCG (Pasteur) in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 71 (4), pp. 1946-1952.

Zainuddin Z.F. et Dale J.W., 1989. Polymorphic repetitive DNA sequences in *Mycobacterium tuberculosis* detected with a gene probe from a *Mycobacterium fortuitum* plasmid. *Journal of General Microbiology*. Vol. 135, pp. 2347-2355. Cité par McAdam R.A. *et al.*, 1990.

Zanella G., 2007. La tuberculose bovine dans une population de cerfs et de sangliers sauvages : Epidémiologie et modélisation. Thèse de 3^{ème} cycle. Université Paris XI. 199 p.

Zanella G., Duvauchelle A. Hars J., Boschioli M.L., Durand B., 2008. Patterns of lesions of bovine tuberculosis in wild red deer and wild boar. *The Veterinary Record*. Vol. 163, pp. 43-47.

Zumárraga M., Bigi F., Alito A., Romano M.I. et Cataldi A., 1999. A 12.7-kb fragment of the *M. tuberculosis* genome is not present in *M. bovis*. *Microbiology*. Vol. 145, pp.893-897.

Zumárraga M.J., Meikle V., Bernardelli A., Abdala A., Tarabla H., Romano M.I. et Cataldi A., 2005. Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. Vol. 17, pp. 232-238.

Sites Web :

[1] **Diagnostic au laboratoire d'une mycobactérie** (ppt. du Pr. Kassah-Laouar A.). Site consulté le 28/01/2010. <http://aurespneumo.free.fr/evenements/journees/pdf/3/06.pdf>

[2] **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN)**. Pr. Euzéby J.P. Site consulté le 28/01/2010. <http://www.bacterio.cict.fr/index.html>

- [2a] **List of genera included in families.**
<http://www.bacterio.cict.fr/classifgenerafamilies.html#Mycobacteriaceae>
- [2b] **List of families included in suborders.**
<http://www.bacterio.cict.fr/classiffamiliessuborders.html>
- [2c] ***Actinobacteria, Actinobacteridae.***
<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/aa/actinobacteria.html>
- [2d] **Classification of genera, list M – R.**
<http://www.bacterio.cict.fr/classificationmr.html>
- [2e] ***Mycobacterium caprae* (Note 5).**
<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/mm/mycobactcaprae.html>
- [2f] **Genre *Mycobacterium*.**
<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>
- [2g] **Morphologie et structure des bactéries (procaryotes).**
<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/bacteriogene/structure.html#mycobacterie>

[3] **Mycobactéries (genre *Mycobacterium*)**. Site consulté le 29/01/2010.
<http://membres.multimania.fr/microbio/systematique/Mycobacteries.htm>

[4] ***Mycobacterium*, Medical dictionary**. Site consulté le 02/02/2010.
<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/Mycobacterium>

[5] **Tuberculose bovine**. Document élaboré par l'OIE. Site consulté le 03/02/2010.
http://www.oie.int/fr/ressources/BOVINETB_FR_DC.pdf

[6] ***Mycobacterium bovis*** from Wikipedia encyclopedia. Site consulté le 01/02/2010.
http://en.wikipedia.org/wiki/Mycobacterium_bovis

[7] **Tuberculose bovine**. Document élaboré par le GDS 18. Site consulté le 05/02/2010.
<http://www.gds18.org/Tuberculose/Tuberculose.BV.1.html#8>

[8] **Tuberculose**. Document d'information des Ministères français concernés, MSA et INRS, élaboré en collaboration avec le Pr. J.J. Bénet (2005). Site consulté le 05/02/2010.
http://www.msa.fr/files/msafr/msafr_1158767388939_TUBERCULOSE.pdf

[9] **Tuberculose**. Techniques de diagnostic en mycobactériologie. Site consulté le 26/01/2010.

- [9a] **Historique des cultures :**
http://www.mycobacterie.fr/historique/histo_culture/historique_culture.html
- [9b] **Milieux solides :**
http://www.mycobacterie.fr/tech/prelevement/2_milieu_solide.html

[10] **Institut Louis Malardé (ILM)**. Site consulté le 27/01/2010.

- [10a] **La PCR :**

<http://www.ilm.pf/PCR>

- [10b] **La PCR en temps réel :**

<http://www.ilm.pf/PCRtempsreel>

[11] **ELISA** (de l'encyclopédie Wikipedia). Site consulté le 24/02/2010.

http://fr.wikipedia.org/wiki/Enzyme-linked_immunosorbent_assay

[12] **Diagnosis of Bovine Tuberculosis: BOVIGAM[®]** (notice). Site consulté le 25/02/2010.

<http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Output/Cytokine6.php>

[13] **Diagnosis of Bovine Tuberculosis: BOVIGAM[®]** (notice). Site consulté le 22/02/2010.

http://www.prionics.com/fileadmin/user_upload/downloads_and_prints/TB_leaflet_03.pdf

Textes réglementaires :

Arrêtés ministériels et préfectoraux :

Arrêté Ministériel du 16 mars 1990 fixant les mesures techniques et administratives relatives à la prophylaxie collective de la tuberculose bovine. Journal Officiel de la République Française (JORF) n°89 du 14 avril 1990 (NOR : AGRG9000530A).

Arrêté Ministériel du 4 mai 1999 modifiant l'arrêté du 16 mars 1990 fixant les mesures techniques et administratives relatives à la prophylaxie collective de la tuberculose bovine et le complétant en matière de tuberculose caprine. JORF n°125 du 2 juin 1999 (NOR : AGRG9900953A).

Arrêté Ministériel du 19 octobre 1999 fixant les conditions d'agrément des laboratoires chargés d'effectuer les épreuves de diagnostic des tuberculoses animales. JORF n°295 du 21 décembre 1999 (NOR : AGRG9902168A).

Arrêté Ministériel du 15 septembre 2003 fixant les mesures techniques et administratives relatives à la prophylaxie collective et à la police sanitaire de la tuberculose des bovinés et des caprins. JORF n°226 du 30 septembre 2003 (NOR : AGRG0301884A).

Arrêté Ministériel du 24 janvier 2005 relatif à la surveillance sanitaire des élevages bovins. JORF n°26 du 29 janvier 2005 (NOR : AGRG0500231A).

Arrêté Ministériel du 11 janvier 2006 modifiant les arrêtés du 20 mars 1990 et du 15 septembre 2003 fixant les mesures techniques et administratives relatives à la prophylaxie collective de la brucellose et de la tuberculose bovines. JORF n°35 du 18 février 2006 (NOR : AGRG0500231A).

Arrêté Ministériel du 04 septembre 2008 relatif à l'abattage partiel à titre expérimental de certains troupeaux de bovins infectés de tuberculose dans les départements de la Côte-d'Or et de la Dordogne. JORF n°13 du 17 septembre 2008 (NOR : AGRG0821618A).

Arrêté Ministériel du 17 juin 2009 fixant les mesures financières relatives à la lutte contre la brucellose et à la lutte contre la tuberculose bovine et caprine. JORF n°71 du 27 juin 2009 (NOR : AGRG0913907A).

Arrêté Ministériel du 19 août 2009 modifiant l'arrêté ministériel du 15 septembre 2003 fixant les mesures techniques et administratives relatives à la prophylaxie collective et à la police sanitaire de la tuberculose des bovinés et des caprins. JORF n°42 du 28 août 2009 (NOR : AGRG0919622A).

Arrêté Préfectoral n° 062258 du 19/12/2006 renforçant les mesures de dépistage de la tuberculose bovine dans le département de la Dordogne.

Arrêté Préfectoral n° 07-101 du 21/11/2007 renforçant les mesures de dépistage de la tuberculose bovine dans le département de la Dordogne.

Circulaire de la DGAL :

Circulaire n°8 489 du 12 juillet 1978 relative à la prophylaxie de la tuberculose bovine. Mesures techniques et administratives.

Décret :

Décret n° 2006-177 du 17 février 2006 relatif à la lutte contre les maladies animales et modifiant le code rural. JORF n°42 du 18 février 2006 (NOR: AGRG0600017D).

Directive Européenne :

Directive du Conseil de la Communauté Economique Européenne du 26 juin 1964, 64/432/CEE, relative à des problèmes de police sanitaire en matière d'échanges intracommunautaires d'animaux des espèces bovine et porcine. Journal officiel n° 121 du 29/07/1964 pp. 1977-2012.

Notes de Service (NS) de la DGAL :

Note de Service DGAL/SDSPA/N2000-8008 du 20 janvier 2000 Tuberculose bovine – Diverses dispositions d'ordre technique en application de l'arrêté ministériel du 4 mai 1999.

Note de Service DGAL/SDSPA/N2000-8149 du 22 novembre 2000 (a) relative au diagnostic de tuberculose bovine et caprine dans les laboratoires agréés – Organisation technique et administrative.

Note de Service DGAL/SDSPA/N2000-8150 du 22 novembre 2000 (b) relative à l'organisation du réseau national de prélèvement d'échantillons biologiques à l'abattoir dans le cadre de l'épidémiosurveillance de la tuberculose bovine et caprine.

Note de Service DGAL/ SDSPA/N2002-8006 du 14 janvier 2002 relative à l'abattage total pour tuberculose et brucellose bovine.

Note de Service DGAL/ SDSPA/N2005-8075 du 07 mars 2005 relative à la visite annuelle obligatoire des élevages bovins.

Note de Service DGAL/SDSPA/N2006-8064 du 6 mars 2006 relative à l'actualisation des listes de maladies règlementées.

Note de Service DGAL/SDSPA/N2007-8115 du 14 mai 2007 relative à l'importance de l'inspection *post-mortem* en abattoir dans le dépistage de la tuberculose des ruminants.

Note de Service DGAL/SDSPA/N2007-8181 du 30 juillet 2007 relative aux modalités de mise en œuvre du test de dosage de l'interféron gamma pour le dépistage de la tuberculose bovine dans les cheptels de race d'intérêt local.

Note de Service DGAL/SDSPA/N2008-8257 du 1^{er} octobre 2008 relative à l'abattage partiel à titre expérimental de certains troupeaux de bovins infectés de tuberculose dans les départements 21 et 24.

Note de Service DGAL/SDSPA/N2009-8079 du 25 février 2009 relative au bilan du rapport annuel ruminant 2007.

Note de Service DGAL/SDSPA/N2009-8169 du 16 juin 2009 relative au Statut des États membres et régions d'États membres de l'Union Européenne et conditions sanitaires applicables aux échanges intracommunautaires de bovins, d'ovins, de caprins et de porcins.

Note de Service DGAL/SDSPA/N2009-8278 du 12 octobre 2009 relative à l'entrée en vigueur de l'arrêté du 19 août 2009 modifiant l'arrêté ministériel du 15 septembre 2003 fixant les mesures techniques et administratives relatives à la prophylaxie collective et à la police sanitaire de la tuberculose des bovinés et des caprins.

Lettres à diffusion limitée :

Lettre à diffusion limitée n°00443 du 19 février 2009 relative à la « dérogation à l'abattage total à titre expérimental de certains troupeaux de bovins infectés de tuberculose dans les départements 21 et 24 – Critères d'éligibilité et protocole applicable ».

Lettre à diffusion limitée n°00798 du 06 mai 2010 annulant et remplaçant la lettre à diffusion limitée du 19 février 2009, relative à la « dérogation à l'abattage total à titre expérimental de certains troupeaux de bovins infectés de tuberculose dans les départements 21 et 24 – Critères d'éligibilité et protocole applicable ».

Note d'Information (NI) de la DGAL :

Note d'Information DGAL/SDSPA/O2008-8006 du 17 mars 2008 relative au bilan du rapport annuel ruminant 2006.

Rapport/Avis de l'Afssa :

Garin-Bastuji B., Boschioli M.L., 2008. Rapport d'Appui Scientifique et Technique en vue de l'évaluation d'un protocole interféron gamma mis en œuvre en Dordogne (Avis sur saisine Afssa 2007-SA-0351), diffusée le 10 juin 2008.

Avis Afssa 2008-SA-0084 du 11 juin 2008, concernant l'évaluation du risque de tuberculose bovine dans un élevage en Dordogne,

Avis Afssa 2008-SA-0167 du 7 novembre 2008, concernant l'élaboration d'un protocole pour le suivi d'un troupeau abattu partiellement en vue de sa requalification et ce, en l'état actuel des connaissances concernant les tests de diagnostic.

Avis Afssa 2008-SA-0263 du 14 janvier 2009, concernant un projet d'arrêté modifiant l'arrêté du 15 septembre 2003 fixant les mesures techniques et administratives relatives à la prophylaxie collective et à la police sanitaire de la tuberculose des bovinés et des caprins.

Avis Afssa 2009-SA-0109 du 1^{er} octobre 2009, en vue de l'évaluation du risque relatif à la tuberculose bovine dans les départements de la Côte d'Or et de la Dordogne (éléments complémentaires aux précédents avis).

Normes Françaises AFNOR homologuées:

AFNOR, 2003. NF U 47-104, version en vigueur de septembre 2003 : Méthodes d'analyse en santé animale. Isolement et identification des mycobactéries autres que *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* chez l'animal. AFNOR, pp. 1-14.

AFNOR, 2007. NF U 47-019, version en vigueur de septembre 2007 : Guide des bonnes pratiques pour la mise en œuvre des techniques ELISA, ICS : 11.220 ; 65.020.30. Méthodes d'analyses en santé animale. AFNOR, pp. 1-12.

AFNOR, 2010. NF T 90-471, version en vigueur d'avril 2010 : Détection et quantification des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (RT-PCR). AFNOR, pp. 1-42.

Programme d'accréditation édité par le COFRAC :

COFRAC, 2003. Programme N°116/02 (version en vigueur de septembre 2003) : Essais et analyses en bactériologie animale. COFRAC, Section Laboratoires. pp. 1-38.

ANNEXES

ANNEXE I : Les principaux agents chimiques utilisés pour la décontamination des échantillons avant leur mise en culture

Les principaux agents chimiques utilisés pour la décontamination des échantillons avant leur mise en culture (Langerova M. et Tacquet A., 1968 ; Boschioli M.L., 2008a ; Site Web [9a]) sont les suivants :

- La **soude à 4 %** (selon la méthode de Pétroff de 1915) (*technique la plus toxique pour le bacille tuberculeux*) pour les tissus (OIE, 2008) et le lait (Thorel M.F., 1982), les expectorations (Smithwick R.W., Stratigos C.B. et David H.L., 1975 ; David H., Levy-Frebault V. et Thorel M.F., 1989) ;

- L'**acide sulfurique à 4 %** (selon Grumbach en 1965) pour les tissus (Thorel M.F. et Boisvert H., 1976 ; David H., Levy-Frebault V. et Thorel M.F., 1989) ;

- L'**acide oxalique à 5 %** (selon la méthode de Corper et Uyei de 1931) pour les tissus (OIE, 2008), les fèces (Thorel M.F., 1982), les prélèvements environnementaux et les expectorations (David H., Levy-Frebault V. et Thorel M.F., 1989) ;

- Le **phosphate trisodique à 10 %** (selon la méthode de Corper et Stoner de 1946) pour les expectorations ;

- Le **lauryl-sulfate de sodium alcalin à 20 %** (selon la méthode de Tacquet et Tison de 1961) pour les eaux et les expectorations (David H., Levy-Frebault V. et Thorel M.F., 1989), (souvent utilisé en médecine humaine) ;

- Le **N-acétylcystéine associé à la soude à 2 %** (NALC-NaOH), (selon méthode de Kubica de 1964), (*technique la moins néfaste pour le bacille tuberculeux*) pour les expectorations (souvent utilisé en médecine humaine) ;

- Le **chlorure cétylpyridinium ou CCP à 0,75 %** pour les tissus (Corner L.A. et Trajstman A.C., 1988 ; Corner L.A., 1994), fèces, prélèvements environnementaux, les expectorations (Smithwick R.W., Stratigos C.B. et David H.L., 1975).

ANNEXE II : Les milieux pour la culture des bacilles tuberculeux

Le milieu solide le plus employé actuellement pour la culture des bacilles tuberculeux est le milieu à l'œuf de Löwenstein-Jensen[®] (Vincent Levy-Frébault V. et Portaels F., 1992) qui a été mis au point par Löwenstein en 1931 et modifié par Jensen en 1932. Ce milieu contient des sels minéraux, de l'asparagine, du glycérol (à 0,75 % seulement car une concentration supérieure inhibe la croissance de *M. bovis*), du vert Malachite (Tetramethyl-di-p-aminotriphenylcarbinol) et de l'œuf qui corrige les effets nocifs des techniques (Site Web [9b]).

Le glycérol et les œufs fournissent des acides gras et protéines exigés pour le métabolisme des mycobactéries. L'asparagine et les féculs de pommes de terre apportent également du carbone mais elles sont surtout les sources d'azote et de vitamines. Le phosphate monopotassique et le sulfate de magnésium favorisent la croissance d'organismes et agissent comme des tampons. Le citrate de magnésium et le vert Malachite (antiseptique et indicateur de pH) sont des agents sélectifs empêchant la croissance de la plupart des contaminants et permettant une croissance plus rapide des mycobactéries.

Ses avantages sont multiples : grande sensibilité, aspect caractéristique des colonies, prix de revient relativement faible.

A la différence du milieu de Löwenstein-Jensen[®], le milieu de Coletsos[®], mis au point par Coletsos en 1961, contient du pyruvate de sodium, une concentration plus faible en glycérol (recommandée pour l'isolement de *M. bovis*) et un mélange d'oligoéléments. Ce milieu permet donc une croissance plus abondante et plus rapide des mycobactéries déficientes ou microaérophiles (*M. bovis*, *M. africanum*, *M. xenopi*) (Boschiroli M.L., 2008a, Site Web [9b]).

Par ailleurs, la solidification de ce milieu, comme celui de Löwenstein-Jensen[®], est due à la coagulation, lors de leur stérilisation, de l'albumine présente dans les œufs.

Il existe également d'autres milieux de culture solides plus spécifiques, utilisés après une primo-culture sur milieu de Löwenstein-Jensen[®] ou Coletsos[®], comme le milieu de Löwenstein-Jensen[®] complété en ThioCarbonylHydrazine (LJ+TCH) par exemple. Ce milieu permet de différencier *M. bovis* des autres espèces de mycobactéries puisque la présence de TCH entraîne l'inhibition de la croissance de *M. bovis*.

De plus, des milieux de culture liquides, comme le milieu de Middlebrook[®], permettent d'obtenir des subcultures de Mycobactéries à partir de l'isolement de colonies après une primo-culture. Le milieu liquide 7H9 créé par Dubos et Middlebrook en 1947 contient de l'albumine et de l'acide oléique ce qui favorise la croissance des bacilles tuberculeux et les protège de nombreux agents toxiques.

ANNEXE III : Méthode de recherche des bacilles tuberculeux par culture sur milieu solide (selon la norme NF U 47-104, version en vigueur de 2003)

➤ *Préparation de l'échantillon pour l'analyse : décontamination et broyage*

Quelques grammes (entre 2 et 5 g) de chaque échantillon sont prélevés après avoir éliminé le caséum. Ils sont coupés en petits morceaux à l'aide d'un scalpel et déposés dans un sachet adapté au broyeur péristaltique. Puis, une solution d'acide sulfurique (H₂SO₄) à 4 % est ajoutée en quantité suffisante pour recouvrir le prélèvement. Deux à trois gouttes d'un indicateur pH coloré, le Bleu de Bromothymol (BBT), y sont également déposés. Ensuite, le mélange est broyé 3 minutes à l'aide d'un broyeur péristaltique programmé à la vitesse maximale. Afin que le temps de contact total avec l'acide soit de 10 minutes, nous laissons agir 7 minutes supplémentaires. Enfin, pour neutraliser la suspension, de la soude (NaOH) à 6 % est ajoutée en homogénéisant, jusqu'au virage du jaune au vert stable. Puis, nous laissons déposer les grosses particules. L'étape de neutralisation est répétée si nécessaire, jusqu'à l'obtention d'un vert stable.

➤ *Isolement*

L'ensemencement du surnageant obtenu est réalisé sur des milieux de culture solides et leurs incubations s'effectuent à trois températures différentes. Ainsi, trois milieux de Löwenstein-Jensen® (LJ) sont incubés à 37°C ± 2°C à raison d'une oëse, une goutte et trois gouttes de surnageant. Puis, un milieu de Coletsos® est incubé à 37°C ± 2°C à raison de 3 gouttes de surnageant. Enfin, un milieu LJ est incubé à 30°C ± 2°C et un autre à 42°C ± 2°C à raison de 3 gouttes de surnageant chacun. L'incubation des tubes de culture est effectuée en position inclinée, sans visser les bouchons à fond.

➤ *Lecture et Interprétation*

Lors de la première lecture, à 8 jours les tubes contaminés* sont éliminés et, les tubes conservés sont revissés et remis à incuber en position horizontale. Ensuite, les pentes sont examinées, pour une croissance macroscopique, à intervalles réguliers de 15 jours jusqu'à la fin de l'incubation, à 3 mois.

Les colonies apparaissent en général entre la 1^{ère} et la 2^{ème} semaine d'incubation pour les mycobactéries à croissance rapide et entre la 3^{ème} et la 4^{ème} semaine pour les mycobactéries à croissance lente.

Le profil de croissance caractéristique et l'aspect macroscopique des colonies peuvent fournir un diagnostic de présomption de *M. bovis* (sur LJ, colonies colorées « cire de bougie », dysgoniques et lisses, visibles à 28 jours ou plus) ou *M. tuberculosis* (sur LJ, colonies de couleur beige, eugoniques et rugueuses, visibles entre 14 et 28 jours), (Bourgoin A. et Agius G., 1995). Cependant, ce résultat partiel positif doit être obligatoirement confirmé par des épreuves d'identification de l'agent pathogène.

A l'inverse, en l'absence de colonie ou en présence de colonies non suspectes sur ce milieu de primo-culture, – colonies à croissance rapide (en moins de 7 jours, contamination ou mycobactéries atypiques) ou dont l'aspect macroscopique ne permet pas de supposer une mycobactérie tuberculeuse – le résultat bactériologique de l'échantillon analysé est considéré comme négatif.

***Remarque** concernant la proportion de tubes contaminés à la première lecture : S'il ne reste qu'un seul tube non contaminé à 37°C, à la lecture à 8 jours, le reliquat de broyat est réanalysé en suivant le protocole alternatif de décontamination suivant.

Le reliquat du broyat est repris et le surnageant est éliminé. Puis, un volume de NaOH à 4 %, égale à celui du culot, est ajouté en présence de deux à trois gouttes de BBT. Après homogénéisation, le mélange est incubé à 37°C ± 2°C pendant 1 heure. Ensuite, pour neutraliser la suspension, du H₂SO₄ à 10 % est ajouté en homogénéisant, jusqu'au virage du bleu au vert stable. Enfin, après avoir laissé déposer les grosses particules, l'ensemencement du surnageant peut être réalisé.

ANNEXE IV : Méthodes d'identification de l'agent pathogène à partir de colonies sur milieu de primo-culture (selon Afssa-Lerpaz)

L'identification de l'agent pathogène à partir de colonies isolées s'effectue par un ensemble de tests : la coloration de ZN pour l'aspect microscopique des BAAR à partir de la primo-culture et, des épreuves biochimiques et/ou des analyses de PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou réaction de polymérisation en chaîne) à partir de subcultures (Boschioli M.L., 2008a).

La coloration de ZN est donc effectuée à partir de la primo-culture afin de vérifier l'appartenance au genre *Mycobacterium* de l'agent pathogène recherché (présence de BAAR sur le frottis). De plus, l'aspect microscopique des BAAR après coloration permet d'orienter l'identification de la mycobactérie (bacilles fins en cordes : *M. tuberculosis* ; bacilles courts sans corde : *M. bovis*) (Bourgoin A. et Agius G., 1995).

Puis, pour réaliser les analyses biochimiques, différentes subcultures de l'agent pathogène recherché sont nécessaires.

Cependant, afin de disposer d'une quantité suffisante d'agent pathogène pour la réalisation de ces subcultures et des analyses de PCR, la souche peut être, dans un premier temps, repiquée en milieu liquide (Bourgoin A. et Agius G., 1995). Par exemple, elle peut être remise en culture sur du milieu de Middlebrook 7H9 avec ou sans mycobactine (selon l'enrichissement en mycobactéries de la primo-culture) pendant 18 jours.

Ensuite, selon le protocole suivi par le Lerpaz de l'Afssa-Alfort, différentes subcultures sont réalisées à partir de la suspension bactérienne obtenue (souche enrichie sur le milieu 7H9) afin d'étudier les caractères cultureux et enzymatiques.

D'une part, plusieurs tubes et une gélose,ensemencés à raison d'une oese de cette suspension bactérienne pure, sont incubés à des températures différentes : 1 Löwenstein-Jensen[®] (LJ) à 30°C, 1 LJ à 37°C, 3 Col à 37°C et 1 une gélose Columbia à 37°C. La gélose Columbia permet de vérifier l'absence de contamination et les tubes LJ et Coletsos[®] (Col) sont réalisés notamment pour les tests enzymatiques (en particulier les tubes Col où la croissance de *M. bovis* est meilleure).

D'autre part, plusieurs tubes,ensemencés à raison de 2 gouttes de suspension bactérienne diluée au 1/10, sont incubés à des températures différentes : 1 LJ à 30°C, 1 LJ à 42°C, 1 LJ à 37°C et 1 LJ+TCH (LJ complété en TCH) à 37°C. Ces tubes sont réalisés pour déterminer les températures de croissance (croissance de *M. bovis* à 30°C et 37°C (température optimale)) et la pigmentation (absence de pigment pour *M. bovis*).

Outre l'aspect macroscopique caractéristique des colonies (taille, forme, couleur, pigmentation) et leur vitesse de croissance sur les tubes LJ et Col, le résultat de la culture sur milieu LJ+TCH permet d'orienter la recherche et de déterminer les tests biochimiques à effectuer.

En effet, l'absence de colonie tend à confirmer *M. bovis*. Dans ce cas, trois tests enzymatiques sont réalisés en vue d'une confirmation. L'agent pathogène est identifié comme *M. bovis* pour les résultats suivants obtenus : résultat positif à 20°C et négatif à 68°C pour la recherche de catalase, résultat négatif pour la recherche de nitrate réductase et résultat souvent positif mais quelques fois négatif pour la recherche d'uréase. Dans le cas de résultats différents obtenus (infirmerie), des tests enzymatiques supplémentaires sont réalisés : recherche de béta-glucosidase et d'arylsulfatase et, test d'hydrolyse du Tween 80.

Cependant, ces tests enzymatiques sont peu à peu remplacés par un ensemble de tests plus rapides, c'est à dire des analyses PCR spécifiques des agents pathogènes recherchés.

Nous présenterons ici quelques cibles génétiques (notamment celles employées par l'Afssa-Lerpaz) pour l'identification par PCR de l'agent pathogène, après isolement de colonies sur milieux LJ ou Col (test de confirmation utilisé par Gonzáles Llamazares O.R. et *al.*, 1999a).

➤ Identification du genre *Mycobacterium*

Pour vérifier l'appartenance au genre *Mycobacterium*, la cible génétique largement employée en PCR, et en particulier à l'Afssa-Lerpaz, est le gène *rrs* (**ADNr 16S**) codant pour l'ARNr 16S qui est identique chez toutes les espèces mycobactériennes (Han X.Y. et *al.*, 2002 ; Huard R.C. et *al.*, 2003a et 2006 ; Cattoir V., 2004).

En *a parte*, une séquence codante pour l'ARNr 16S spécifique de *M. bovis* a également été utilisée comme cible pour la méthode PCR permettant la détection moléculaire de *M. bovis* dans la terre par Young J.S., Gormley E. et Wellington E.M.H., en 2005.

De manière analogue, les gènes *rpoB* et *gyrB* (codant respectivement pour une sous-unité β de l'ARN polymérase et pour une sous-unité GyrB de l'ADN gyrase) qui sont des marqueurs spécifiques de toutes les mycobactéries, peuvent chacun être utilisés comme cible pour la détection des mycobactéries par PCR (Huard R.C. et *al.*, 2003a ; Cattoir V., 2004).

De même, le fragment intergénique, séparant les gènes codant pour l'ARNr 16S et ARNr 23S, qui est appelé séquence intergénique 16S-23S ou encore séquence **ITS ADNr 16S-23S**, est une autre cible PCR couramment utilisée (Abed Y., Bollet C. et De Micco P., 1995 ; Roth A. et *al.*, 1998 ; Cattoir V., 2004).

En *a parte*, en 2008, Parra A. et ses collègues ont utilisé une région de l'ITS ADNr 16S-23S spécifique du MTBC, comme cible pour développer un test PCR de diagnostic de la Tb, à appliquer pour une surveillance d'abattoir.

Enfin, le gène *hsp65* codant pour une protéine de choc thermique de 65 kDa, est présent dans toutes les mycobactéries (Telenti A. et *al.*, 1993 ; Sechi L.A. et *al.*, 1999). En 1993, Telenti A. et ses associés ont développé une méthode rapide d'identification des mycobactéries, basée sur ce gène *hsp65*.

➤ Identification de l'espèce mycobactérienne

A l'Afssa-Lerpaz, des protocoles différents sont mis en place selon l'espèce mycobactérienne.

Dans le cas des bovins, des cibles génétiques du MTBC telles que l'**IS6110**, l'**IS1081**, **Rv0577** et/ou **mpb-70** (Huard R.C. et *al.*, 2003a et 2006) sont testées en priorité, sauf si *M. avium* est suspecté. Les cibles pour détecter *M. avium spp.* sont l'**IS1245** et l'**IS1311** et pour détecter *M. avium paratuberculosis* l'**IS900** (Sechi L.A. et *al.*, 1999 ; Legrand E., Sola C. et Rastogi N., 2000 ; Hugues M.S. et *al.*, 2005)

Dès que l'agent pathogène est identifié comme une espèce appartenant au MTBC, d'autres cibles telles que l'**IS1561** ou MiD3, Rv1510 ou **RD4** (pour région de différence 4), Rv1970 ou **RD7**, Rv3877/8 ou **RD1**, Rv3120 ou **RD12**, Rv1257c ou **RD13**, sont utilisées pour déterminer le nom de l'espèce (Brosch R. et *al.*, 2002 ; Huard R.C. et *al.*, 2003a et 2006). Les différentes cibles génétiques à utiliser pour identifier le nom de l'espèce mycobactérienne, sont décrites dans le tableau A (d'après Huard R.C. et *al.*, 2003a et 2006).

Tableau A. Récapitulatif des différents résultats (positif ou négatif) obtenus pour le typage des espèces du MTBC (Huard R.C. et al., 2003a et 2006).

Espèces du MTBC	Locus des cibles génétiques du test PCR						Cibles à utiliser nécessairement pour l'identification de l'espèce
	IS1561	RD4	RD7	RD1	RD12	RD13	
<i>M. bovis</i>	+	-	-	+	-	-	RD4 et RD1
<i>M. bovis</i> BCG	+	-	-	-	-	-	RD1
<i>M. caprae</i>	+	+	-	+	-	-	RD4 et RD13 ou RD7, RD1 et RD12 ou RD4, RD7 et RD12
<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	+	+	+	RD7 et RD12
<i>M. microti</i> et <i>M. pinnipedii</i>	-	+	-	+	+	+	IS1561
<i>M. canetti</i>	+	+	+	+	-	+	RD7 et RD12
<i>M. africanum</i>	+	+	+	+	+	+	RD7 et RD12

Par ailleurs, l'analyse du polymorphisme nucléotidique des séquences *gyrB* des membres du MTBC permet également de différencier et ainsi d'identifier différentes espèces du MTBC. Cinq régions du gène *gyrB* sont discriminantes. En 2000, Kasai H. et al. et, Niemann S. et al. ont décrits les séquences ADN de ces régions pour les espèces du MTBC suivantes : *M. microti*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. tuberculosis* et *M. africanum* sous types I et II (tableau B).

Tableau B. Présentation des espèces du MTBC (sauf *M. canetti* et *M. pinnipedii*) différenciées par l'analyse des différentes régions de *gyrB* (Kasai H. et al., 2000 ; Niemann S. et al., 2000).

Régions de <i>gyrB</i> (position du nucléotide)	Espèce(s) différenciée(s) des autres espèces du MTBC
1 (675)	<i>M. microti</i>
2 (756)	<i>M. bovis</i> et <i>M. caprae</i>
3 (1410)	<i>M. bovis</i>
4 (1450)	<i>M. tuberculosis</i> et <i>M. africanum</i> (sous type II)
5 (1410)	<i>M. caprae</i>

➤ Exemple d'identification de mycobactéries atypiques

Pour la recherche de *M. nonchromogenicum* dans du mucus nasal de bovins provenant de cheptels infectés de Tb, McCorry T.P. et al. ont employé dans leur étude de 2004, une PCR ciblée ARNr 16S suivie d'une analyse de séquence.

ANNEXE V : Les techniques moléculaires pour le typage des isolats de *M. bovis* : Principe du spoligotypage et de la technique VNTR

➤ Le spoligotypage

Le spoligotypage (*sp* pour "*spacers*" et *oligo* pour *oligonucléotides*) est une méthode qui détecte la présence ou l'absence de séquences particulières situées dans des régions DR (Direct Repeat ou séquences répétées directes) spécifiques au MTBC. Il existe plusieurs régions DR par génome.

Chacune d'entre elles correspond à l'alternance régulière de séquences identiques appelées DR et de séquences différentes les unes des autres appelées "espaceurs" (spacers). Un "espaceur" donné peut être présent chez un isolat et être absent chez un autre (Haddad N. et *al.*, 2004ab).

Le spoligotypage exploite donc le polymorphisme de l'ADN des "espaceurs" situés entre les séquences DR. Il permet d'identifier au total 43 "espaceurs" situés entre les séquences DR pour un isolat (Haddad N. et *al.*, 2004ab ; Site web[2e]).

De plus, pour une espèce donnée, l'absence de certains "espaceurs" peut être constante. Ainsi, les souches de *M. bovis* se caractérisent par l'absence des "espaceurs" 3, 9, 16 et 39-43 (ce qui correspond aussi au spoligotype BCG-like). *M. bovis* a donc un polymorphisme potentiel de 2³⁵ spoligotypes différents (Haddad N. et *al.*, 2004ab ; Site web[2e]).

➤ Le typage des VNTRs

La technique VNTR est dirigée contre les séquences répétitives dispersées dans le génome des mycobactéries. Elle consiste donc à amplifier par PCR des locus génomiques (minisatellites) qui contiennent des séquences répétées en tandem en nombre variable selon les souches (Walravens K. et *al.*, 2006).

ANNEXE VI : Présentation de la technique ELISA indirecte

La technique ELISA indirecte permet la détection d'un Ac recherché (AcR), présent dans l'échantillon à analyser par le biais d'un Ag et d'un Ac spécifiques. Elle comporte donc un support solide (souvent une plaque de microtitration) recouvert avec un Ag spécifique, reconnu par l'AcR (Burmester G.R., Pezzutto A. et Wirth J., 2000).

L'échantillon de sang est donc déposé dans un puits d'une plaque de microtitration et, si les AcR sont présents, ils vont se fixer spécifiquement aux Ag tapissant la plaque.

Puis, des Ac secondaires (Ac anti-AcR marqués), c'est-à-dire des Ac couplés à une enzyme et capable de se fixer aux AcR liés aux Ag, sont alors ajoutés dans le puits. Les Ac conjugués non fixés sont éliminés par rinçage.

Enfin, un substrat chromogène non coloré est alors ajouté. Il est transformé par l'enzyme en un produit coloré et par conséquent, détectable. En effet, la mesure du signal est alors réalisée par colorimétrie et exprimée en densité optique (DO). La quantité d'AcR est proportionnelle à la valeur de DO obtenue ce qui permet le dosage d'AcR.

A l'inverse, la technique ELISA en « sandwich » permet la détection d'un Ag particulier contenu dans l'échantillon de sang, par le biais de deux Ac spécifiques (Burmester G.R., Pezzutto A. et Wirth J., 2000). Toutefois, cette technique est utilisée pour l'immunodiagnostic de la Tb.

ANNEXE VII : Mode Opérateur du test IFN γ Bovigam[®]

➤ Etape 1 : Stimulation lymphocytaire *in vitro*

Chaque échantillon sanguin hépariné de bovin (soit un volume de 1 500 μ l) est stimulé avec i/ 100 μ l de tampon PBS (Phosphate Buffer Saline), servant de témoin négatif (N) de la stimulation cellulaire (*puits A1 par exemple*), ii/ 100 μ l de tuberculines bovines (de Csl), PPDB (*puits A2*) et iii/ 100 μ l de tuberculines aviaires (de Csl), PPDA (*puits A3*) (Cf. un exemple de plan de plaque, figure A). Ainsi, l'analyse d'un échantillon requiert 3 puits d'une plaque de culture.

Huit échantillons maximum peuvent donc être répartis sur une plaque de 24 puits, selon le plan de distribution représenté par la figure A.

	1	2	3	4	5	6
A	PBS&Ech1	PPDB&Ech1	PPDA&Ech1	PBS&Ech5	PPDB&Ech5	PPDA&Ech5
B	PBS&Ech2	PPDB&Ech2	PPDA&Ech2	PBS&Ech6	PPDB&Ech6	PPDA&Ech6
C	PBS&Ech3	PPDB&Ech3	PPDA&Ech3	PBS&Ech7	PPDB&Ech7	PPDA&Ech7
D	PBS&Ech4	PPDB&Ech4	PPDA&Ech4	PBS&Ech8	PPDB&Ech8	PPDA&Ech8

Figure A. Exemple de plan de distribution, en plaque de 24 puits, à suivre pour le dépôt de huit échantillons (Ech 1 à 8) pour l'étape de stimulation cellulaire.

Ensuite, les mélanges réactionnels sont homogénéisés par agitation de la plaque pendant 1 min.

Puis, la plaque contenant les échantillons est mise en incubation à 37°C en atmosphère humide, pendant 16 à 24 h. A la fin de l'incubation, la plaque est centrifugée à 500 g pendant environ 10 min à température ambiante et les plasmas surnageant (soit environ 500 μ l) sont recueillis et déposés sur une autre plaque (plaque de transfert) en vue du dosage d'IFN γ .

➤ Etape 2 : Dosage d'IFN γ par méthode ELISA en « sandwich » (Cf. figure B)

Le dosage d'IFN γ par la méthode ELISA en « sandwich » est réalisé pour chaque échantillon de plasma obtenu. Cette étape nécessite l'utilisation d'une plaque ELISA « pré-coatée Ac anti-IFN γ bovin », c'est-à-dire une plaque où des Ac monoclonaux de capture spécifiques de l'IFN γ bovin ont été préalablement fixés au fond des puits par interaction électrostatique.

Ainsi, chaque plasma (50 μ l) est dilué au demi dans un tampon de dilution et réparti sur une plaque ELISA « pré-coatée Ac anti-IFN γ bovin » de 96 puits (stade 1). Des témoins (50 μ l) positif (TP) et négatif (TN) de la méthode ELISA sont également dilués au demi dans ce tampon et distribués sur la plaque. Ces plasmas et témoins sont déposés respectivement en double (*duplicats*) et en triple (*triplicats*) sur la plaque.

La plaque est ensuite placée 1 min sous agitation* avant d'être incubée 60 min \pm 5 min à température ambiante. A la fin de l'incubation, le contenu liquide de la plaque est éliminé et, la plaque est lavée six fois puis séchée (rincage).

A ce stade 2, si des IFN γ étaient présents initialement dans le plasma, ils se retrouvent fixés sur les Ac (anti-IFN γ bovin) « coatés » à la plaque.

Ensuite, un conjugué, composé d'Ac traceurs anti-IFN γ bovin couplés à l'enzyme peroxydase de raifort (HRP), est distribué à raison de 100 μ l par puits. Ces Ac anti-IFN γ bovin marqués HRP sont capables de se lier spécifiquement aux IFN γ capturés. La plaque est placée 1 min

sous agitation* avant d'être incubée 60 min \pm 5 min à température ambiante. A la fin de l'incubation, le surplus de conjugué (Ac traceurs non fixés) est éliminé par rinçage.

A ce stade 3, si des IFN γ ont été capturés par les Ac « coatés » au support (stade 2), ils se retrouvent également fixés aux Ac anti-IFN γ bovin marqués HRP (IFN γ en « sandwich » entre deux Ac anti-IFN γ).

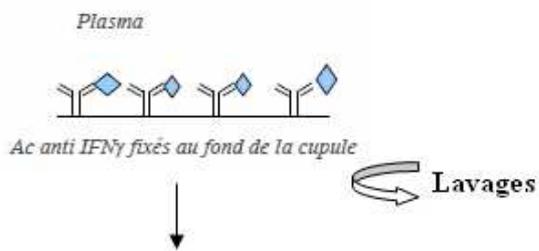
Enfin, un substrat chromogène est ajouté à raison de 100 μ l dans chaque puits et, la plaque est mise sous agitation puis, incubée 30 min à l'abri de la lumière. Ce substrat est converti par l'enzyme HRP en une forme détectable (plage de couleur jaune). Le taux de conversion de ce substrat en produit coloré est donc proportionnel à la quantité d'IFN γ liés aux Ac anti-IFN γ marqués HRP. A la fin de l'incubation, l'ajout d'une solution d'arrêt (50 μ l) contenant de l'acide sulfurique, permet de stopper l'action de la HRP.

La concentration de produit formé est alors rapidement estimée par mesure de l'absorbance à 450 nanomètres (dans un délai de 5 min après l'ajout de la solution d'arrêt) à l'aide d'un spectrophotomètre (filtre de référence à 620-650 nm). Cette absorbance ou densité optique (DO) mesurée est proportionnelle à la quantité d'IFN γ présent dans le plasma.

L'interprétation des résultats de l'analyse s'effectue à partir des valeurs d'absorbance obtenues.

Remarque :

*/ l'agitation de la plaque permet une meilleure discrimination entre les échantillons positifs et négatifs : les valeurs de DO des échantillons positifs sont plus élevées alors que l'absorbance du bruit de fond n'augmente pas. De plus, l'agitation permet d'homogénéiser et par conséquent, de réduire les variations d'absorbance entre les puits identiques (coefficient de variation réduit et valeurs de DO plus stables).

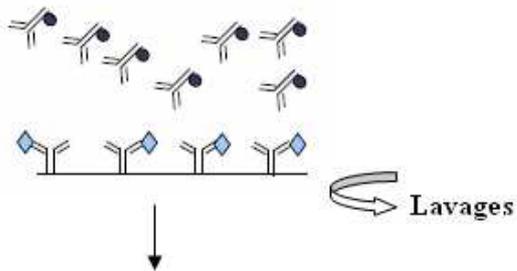
Ajout du plasma (présence d'IFN γ)

 Ac anti-IFN γ fixés au support

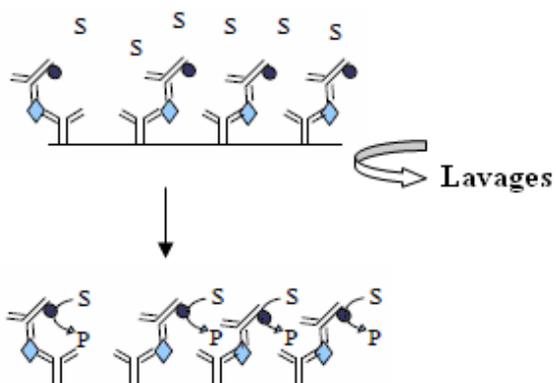
 IFN γ présents dans le plasma

 Ac anti-IFN γ marqués HRP (conjugué)

Transformation du substrat (S) en produit (P) par la HRP

Ajout des Ac anti-IFN γ conjugués

Ajout du Substrat chromogène



Ajout de la Solution d'arrêt

Lecture de l'absorbance

Figure B. Le principe de la méthode ELISA en « sandwich » pour le dosage des IFN γ dans le plasma.

ANNEXE VIII : La technique PCR en temps réel

1. Définition de la Technique PCR

La réaction de polymérisation en chaîne ou PCR est une technique de biologie moléculaire mise au point en 1985, par Mullis K.. Elle permet l'amplification *in vitro*, exponentielle et sélective de séquences d'ADN cible (Mullis K. et *al.*, 1986 et 1990). Cette méthode est dérivée de la technique dite d'extension d'amorces, au cours de laquelle de courtes séquences d'ADN (amorces) et des oligonucléotides libres sont utilisés par une enzyme (ADN polymérase) pour répliquer fidèlement l'ADN cible. L'originalité de la PCR est d'effectuer cette extension d'amorces simultanément sur les deux brins d'ADN (Blanchard B., 2002 ; Site web [10a]).

Il existe deux types de technique PCR : la PCR classique et la PCR en temps réel.

Dans le cas de la PCR classique, la détection et l'analyse des produits d'amplification ne sont réalisées qu'en fin de réaction par électrophorèse, alors que dans le cas de la PCR en temps réel, l'accumulation des produits d'amplification est mesurée par fluorescence tout au long de la réaction (Salmon M., 2002 ; Site web [10b]).

L'amplification d'acides nucléiques peut être réalisée par PCR à partir d'ADN ou d'ARN extrait. Néanmoins, en ce qui concerne l'ARN, une étape préalable impliquant une reverse transcriptase est nécessaire afin d'obtenir de l'ADN complémentaire à ce dernier qui sera ensuite amplifié.

Notre étude portant sur les bactéries MTBC présentes dans les tissus animaux, seule la technique PCR à partir d'ADN extrait sera développée.

2. Les acteurs de la PCR en temps réel

Les acteurs de la PCR sont contenus dans le milieu réactionnel qui est composé d'ADN double brin (ou bicaténaire) contenant le fragment d'intérêt à amplifier et d'un ensemble de réactifs appelé « mix réactionnel ».

Comme pour la PCR classique, le « mix réactionnel » est constitué de couple d'amorces (ou primers : sens 5'- 3', *forward* et anti-sens, *reverse*), d'une enzyme, la Taq polymérase, de dNTPs (Désoxyribo-Nucléotides-Tri-Phosphate) et de tampon aqueux (MgCl₂, KCl, Tris-HCl,...).

Les amorces sont de petits brins d'ADN de 15-30 bases appelés oligonucléotides. Elles sont capables de s'hybrider spécifiquement sur le brin d'ADN, grâce à la complémentarité des bases. Elles sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier. Pour cela, il faut prendre en compte la longueur de l'amorce, sa température de fusion* notée T_m (*melting temperature*), sa composition nucléotidique et sa structure secondaire (Bogard M., 1994)

La Taq polymérase est une ADN polymérase thermostable extraite d'une bactérie thermophile, *Thermus aquaticus*. Cette enzyme permet la polymérisation de l'ADN dans le sens 5'- 3' et la dégradation des séquences nucléotidiques (activité exonucléasique). De plus, même si sa température optimale d'action (T_m) est de 72°C, elle est capable de résister à des passages successifs à 95°C (son utilisation a contribué à l'automatisation des analyses) (Bogard M., 1994).

Des dNTPs sont présents en excès : dGTP (Désoxyribo-Guanine-Tri-Phosphate), dATP (Désoxyribo-Adénine-Tri-Phosphate), dTTP (Désoxyribo-Thymine-Tri-Phosphate) – ou

souvent à la place des dUTP (Désoxyribo-Uracile-Tri-Phosphate) – et dCTP (Désoxyribo-Cytosine-Tri-Phosphate). Ce sont les composants de base nécessaires à la Taq polymérase pour effectuer la synthèse des brins d'ADN complémentaires.

Cependant, la PCR en temps réel requiert aussi l'utilisation d'un réactif supplémentaire (à ajouter dans le « mix réactionnel ») permettant le marquage moléculaire (Higuchi R. *et al.*, 1992 et 1993).

3. Principe de la PCR en temps réel

La technique PCR en temps réel, basée sur les fondements de la technique PCR classique, consiste en des répétitions (40-50) de trois étapes thermiques (cycle) réalisées successivement dans un même tube (ou puits si plaque de 96 puits) disposé dans un thermocycleur afin d'obtenir une accumulation exponentielle du fragment d'ADN cible (Blanchard B., 2002).

Néanmoins, d'autres étapes sont réalisées préalablement à ces répétitions de cycle d'amplification d'ADN : l'étape de *dénaturation initiale* (obligatoire) et l'étape de *décontamination intégrée* (recommandée).

3.1. Etapes préliminaires à l'amplification

Une étape de *dénaturation initiale*, préalable à ces répétitions de cycle, est obligatoirement réalisée. Elle comporte une étape de chauffage (généralement de 10 à 15 minutes à 95°C) permettant de dissocier l'ADN double brin.

En effet, les deux brins complémentaires de l'ADN sont maintenus appariés par des liaisons non covalentes établies entre les bases. Ce procédé de chauffage à haute température permet donc de rompre ces liaisons hydrogène (trois liaisons entre les bases G≡C et deux entre les bases A=T) et donc de séparer les deux brins d'ADN (Blanchard B., 2002).

De plus, cette étape permet d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique, de dénaturer d'autres enzymes qui pourraient être dans le milieu réactionnel (Transcriptase Inverse, Uracil-N-Glycosylase) (Bogard M., 1994) ;

Par ailleurs, il est recommandé de réaliser une autre étape avant la dénaturation initiale, afin d'éliminer toute source de contamination, par des amplicons issus d'une amplification précédente, qui viendraient fausser les résultats. Cette étape de *décontamination intégrée*, nécessite d'ajouter une enzyme, l'Uracile N-Glycosylase (UNG) et de remplacer les dTTP par des dUTP dans le « mix réactionnel ». L'étape s'effectue selon les conditions d'action optimale de l'UNG (généralement 2 min à 50°C).

3.2. L'amplification d'ADN par répétitions de cycle

Un cycle correspond à l'enchaînement des trois étapes suivantes, réalisées à des températures différentes : la *dénaturation* des acides nucléiques, l'*hybridation* des amorces sur les séquences cibles et l'*extension* des amorces par la Taq polymérase.

- *Etape de dénaturation*

Cette étape permet de déshybrider les ADN bicaténaires par procédé de chauffage à haute température (généralement 1 minute à 95°C) mais aussi de « décrocher » les polymérases qui seraient encore liées à une matrice et d'homogénéiser le milieu réactionnel.

- *Etape d'hybridation*

En se plaçant dans des conditions de renaturation de l'ADN par diminution progressive de la température, les amorces oligonucléotidiques viennent s'hybrider sur leurs séquences complémentaires. Cette étape d'hybridation est pratiquement instantanée (quelques secondes). La température d'hybridation est principalement fonction du T_m de l'amorce (théoriquement quelques degrés en dessous du T_m pour une bonne reconnaissance) (Blanchard B., 2002). En règle générale, la température d'hybridation est se situe entre 50°C et 65°C.

- *Etape d'élongation ou extension*

Cette phase d'élongation nécessite une température proche de 72°C, température optimale d'action de la Taq polymérase. Les oligonucléotides hybridés servent d'amorce à l'enzyme. En effet, à partir de ces amorces, les dNTP présents en large excès dans le milieu réactionnel sont ajoutés successivement (dans le sens 5'-3'), par l'ADN polymérase, au brin en extension. Chaque base mise en place est complémentaire de la base correspondante de la matrice. On assiste donc à la synthèse d'une séquence exactement complémentaire du brin matrice (Blanchard B., 2002 ; Site web [10b]).

Cette extension étant réalisée de façon simultanée sur les deux brins d'ADN, à la fin d'un cycle de PCR le nombre de brins d'ADN a doublé. Ainsi, en partant d'un double brin d'ADN initial, nous obtenons deux doubles brins après un cycle, quatre après deux cycles et 2^n après n cycles ce qui correspond à un rendement (R) idéal de 100 % pour chaque cycle.

En pratique, la formule mathématique est donc la suivante : $N = N_0 \times (2 \times R)^n$ avec N : le nombre de molécules à la fin de l'expérience, N_0 : nombre de molécules d'ADN présentes au départ et n : nombre de cycles PCR réalisés, R : le rendement de la réaction (Blanchard B., 2002).

3.3. Détection des séquences amplifiées pour les deux types de PCR

Dans le cas de la technique PCR classique, les séquences amplifiées sous forme de molécules d'ADN double brin (ou amplicons) sont séparées en fin de réaction PCR, par électrophorèse sur gel d'agarose, en fonction de leurs poids moléculaires respectifs. Ces amplicons sont alors visualisables par révélation sous rayonnement ultraviolet après imprégnation du gel avec un agent intercalant de l'ADN, le Bromure d'Ethidium (BÉt) (Salmon M., 2002).

Dans le cas de la technique PCR en temps réel, la détection et la quantification par marquage fluorescent des séquences amplifiées s'effectue simultanément au processus d'amplification. En effet, la quantité d'amplicons produits durant la réaction est directement proportionnelle à l'intensité de fluorescence mesurée directement dans le tube PCR et ce à l'aide d'un fluorimètre couplé à un thermocycleur (Poitras E et Houde A., 2002 ; Salmon M., 2002).

3.4. Les systèmes de détection de la PCR en temps réel

Différents systèmes de détection (types de marquage moléculaire) sont utilisés pour la PCR en temps réel. D'une part, il existe des molécules non-spécifiques, comme les agents intercalants : le BÉt (Higuchi R. et *al.*, 1992) et le SYBR Green I (Morrison T.B., Weis J.J. et Wittwer C.T., 1998). Ils sont capables d'émettre une fluorescence lorsqu'ils sont liés à l'ADN double brin. (Poitras E. et Houde A., 2002 ; Site web [10b]). D'autre part, il existe des molécules spécifiques comme les sondes d'hydrolyse ou d'hybridation ou, les amorces fluorescentes (Poitras E. et Houde A., 2002 ; Salmon M., 2002 ; Site web [10b]).

Etant donné que seules les sondes d'hydrolyse ont été employées durant ce travail de thèse, seul le fonctionnement détaillé de cette technologie sera décrit dans ce manuscrit.

Les sondes de type TaqMan[®] sont des oligonucléotides dont la longueur varie de 25 à 35 nucléotides. Elles portent à leur extrémité 5', un fluorophore émetteur appelé reporter (R) et à leur extrémité 3', un fluorophore suppresseur appelé quencher (Q). Lorsque les deux fluorophores sont proches, le quencher inhibe la fluorescence émise par le reporter. La séquence de la sonde choisie doit être « encadrée » par les deux amorces (Poitras E. et Houde A., 2002).

Ainsi, lors de l'étape d'hybridation, ces sondes de type TaqMan et les amorces s'accrochent spécifiquement à leur séquence complémentaire respective portée par le brin d'ADN modèle. La Taq polymérase procède ensuite à l'extension dans le sens 5'-3' de l'amorce jusqu'à atteindre la structure double brin constituée du brin modèle et de la sonde.

La réaction à la base de la fluorescence du reporter réside dans l'utilisation de l'activité 5'-3' exonucléasique de la Taq polymérase. En effet, lorsque la Taq rencontre le duplex sonde-brin d'ADN, elle ne peut pas continuer la synthèse du brin complémentaire car la sonde possède à son extrémité 3' un groupement phosphate qui l'empêche de s'étendre. Néanmoins, elle utilise son activité exonucléasique ou 5'-nucléase pour cliver (hydrolyser) séquentiellement la sonde. Par conséquent, le reporter s'éloigne de l'environnement du quencher et peut alors émettre de la fluorescence qui sera détectée par un fluorimètre (via une fibre optique). Par ailleurs, le brin modèle étant également libéré, la Taq polymérase peut continuer la synthèse du nouveau brin d'ADN.

La mesure de la fluorescence au terme de chaque étape d'extension de la PCR permet alors de suivre l'évolution de la réaction au cours du temps (Salmon M., 2002 ; China B., Ghafir Y. et Daube G., 2002 ; Site web [10b]).

3.5. Transcription des résultats PCR (système Taqman[®])

Le thermocycleur dans lequel se déroule la réaction de PCR est directement relié à un ordinateur qui à partir d'un logiciel (ABI PRISM 7500, par exemple) transcrit en temps réel les résultats de la PCR, en une courbe sigmoïdale.

La courbe type représentant l'amplification d'un échantillon d'ADN cible montre l'augmentation du signal fluorescent au fur et à mesure de l'évolution de la réaction (nombre de cycles écoulés). L'intensité de fluorescence à chaque cycle est proportionnelle à la concentration d'amplicons.

Durant les premiers cycles, la fluorescence reste à son niveau de base c'est-à-dire au niveau du bruit de fond qui correspond au signal de fluorescence initial émis par les sondes non clivées (libres ou fixées à l'ADN). A partir d'un certain cycle, la courbe de fluorescence augmente de façon exponentielle. Il en résulte un seuil de détection correspondant à un signal d'émission de fluorescence significativement plus élevé que la ligne de base. Ainsi, le premier cycle à partir duquel la courbe de fluorescence croise la droite correspondant au seuil de détection, représente le Ct (*Cycle threshold*). Celui-ci est inversement proportionnel à la quantité d'ADN cible présent dans l'échantillon avant la PCR. Ainsi, un Ct précoce correspond à une réaction positive (charge virale ou bactérienne élevée). A contrario, un Ct plus tardif reflète une plus faible amplification et par conséquent, la quantité d'ADN est plus faible (Salmon M., 2002). Une phase plateau suit la phase exponentielle. Elle correspond au ralentissement de l'amplification qui peut être dû à l'épuisement des différents réactifs de la PCR comme les amorces, les dNTPs, l'enzyme.

ANNEXE IX : Mode Opérateur du test PCR IS6110 de LSI (1^{ère} version)

Le mix réactionnel PCR du test PCR IS6110 de LSI (1^{ère} version), comprend du « Master mix », pour PCR basée sur un système Taqman[®] (Applied Biosystem, EUA), composé de Taq polymérase, de dNTPs et de tampons aqueux et, un mélange de séquences spécifiques du fragment d'IS6110 recherché (des amorces (chacune à 600 μ M) et une sonde Taqman[®] (à 150 nM) marquée en FAM (reporter) / TAMRA (quencher) et de séquences spécifiques de l'IPC endogène (des amorces (600 μ M) et une sonde Taqman[®] marquée en VIC/TAMRA (à 100 nM)).

Ce mix réactionnel PCR, appelé « mix » est à reconstituer suivant les indications du fournisseur. Ainsi, pour un échantillon à analyser (5 μ l), le mix réactionnel (20 μ l) comprend :

- 12,5 μ l de « Master mix »
- 2 μ l du mélange de séquences spécifiques
- 5,5 μ l d'eau ultra pure (« DNase/RNase free »)

Le volume final d'une réaction PCR (par puits) est de 25 μ l. Ainsi, 5 μ l d'échantillon ou de témoin sont distribués, selon un plan de distribution (préalablement déterminé) de la plaque PCR de 96 puits (Cf. figure A, proposition de plan de distribution), dans les 20 μ l de « mix » préalablement déposés dans le puits (ou cupule).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NCS											
B	NC											
C	Ech 1											
D	Ech 2											
E	Ech 3											
F	.../...											
G	EPC											
H												

Figure A. Exemple de plan de distribution des échantillons (Ech) et des témoins dans les puits d'une plaque PCR de 96 puits, pour un système d'amplification et de détection des cibles génétiques (l'IS6110 et l'IPC endogène) dans la même cupule (monocupule).

Un témoin d'extraction négatif pour les deux cibles génétiques, nommé NCS (*Negatif Control Sample*) est employé (Figure A). Il s'agit simplement de PBS qui est extrait comme un échantillon. Les résultats permettent de vérifier l'absence de contamination par l'IS6110 (MTBC) et/ou l'IPC_{endo} lors de l'extraction.

Un témoin d'amplification négatif pour les deux cibles génétiques, appelé NC (*Negative Control*) est également utilisé (Figure A). Ce NC est composé uniquement de « mix ». Les résultats permettent de vérifier l'absence de contamination par l'IS6110 (MTBC) et/ou l'IPC_{endo} lors de la préparation du Mix et du dépôt des échantillons

Enfin, un témoin d'amplification positif pour la cible IS6110, nommé EPC (*External Positive Control*) est proposé dans le kit (Figure A). Cet EPC est de l'ADN extrait de *M. bovis*. Les résultats permettent de vérifier l'efficacité de l'amplification par PCR de l'IS6110.

L'amplification et la détection des cibles IS6110 et IPC_{endo} s'effectuent donc dans la même cupule (monocupule, deux cibles recherchées par puits). Elles sont réalisées avec un système de détection de séquences (SDS pour *Sequence Detection System*), le thermocycleur ABIPRISM™ 7500.

Le programme nécessaire à cette réaction PCR comprend trois étapes de chauffage :

Étape 1 : 2 minutes à 50°C,

Étape 2 : 10 minutes à 95°C,

Étape 3 : 15 secondes à 95°C puis 1 minute à 60°C – *Répétitions (ou cycles) : 45*

A la fin de l'analyse PCR, la ligne de base correspondant au seuil de fluorescence doit être établie. Les résultats de ce test PCR sont alors exprimés en valeur de cycle seuil, Ct.

ANNEXE X : Validation de la qualité d'un échantillon analysé avec le test IFN γ Bovigam[®] modifié

Coad M. et ses collaborateurs (2008) ont considéré que la qualité d'un échantillon peut être validée lorsque les valeurs de DO de l'échantillon non stimulé, c'est-à-dire du témoin négatif de la stimulation cellulaire (équivalent à l'échantillon stimulé par du PBS (N)), et de l'échantillon stimulé avec un mitogène SEB, c'est-à-dire du témoin positif de la stimulation cellulaire, sont respectivement de $< 0,3$ et $> 0,5$ (soit $DO_N < 0,3$ et $DO_{SEB} > 0,5$).

De même, selon Schiller I. et ses collègues (2009), la qualité d'un échantillon est validée si les valeurs de DO du témoin négatif (PBS) et des témoins positifs (PWM et SEB) de la stimulation cellulaire sont respectivement de $< 0,3$ et $> 0,5$ (soit $DO_N < 0,3$, $DO_{SEB} > 0,5$ et $DO_{PWM} > 0,5$).

Nous avons donc définis les critères des témoins positif (échantillon stimulé avec le PWM) et négatif (échantillon stimulé avec le PBS) à partir des échantillons analysés pour l'étude de spécificité absolue et en s'appuyant sur les données de la littérature (Coad M. et *al.*, 2008 ; Schiller I. et *al.*, 2009).

➤ Critère de validité du témoin positif ou d'immunocompétence (PWM) :

Le contrôle positif (PWM) doit être retrouvé positif pour valider l'immunocompétence de l'échantillon.

Selon Schiller I. *et al.* (2009) en dessous d'une valeur de DO_{PWM} de 0,5, les résultats du témoin PWM sont considérés comme négatifs. Les échantillons pour lesquels le résultat de ce calcul est situé en dessous du seuil sont alors considérés comme inhibés et par conséquent les résultats de l'échantillon (PPD et R) sont inexploitable.

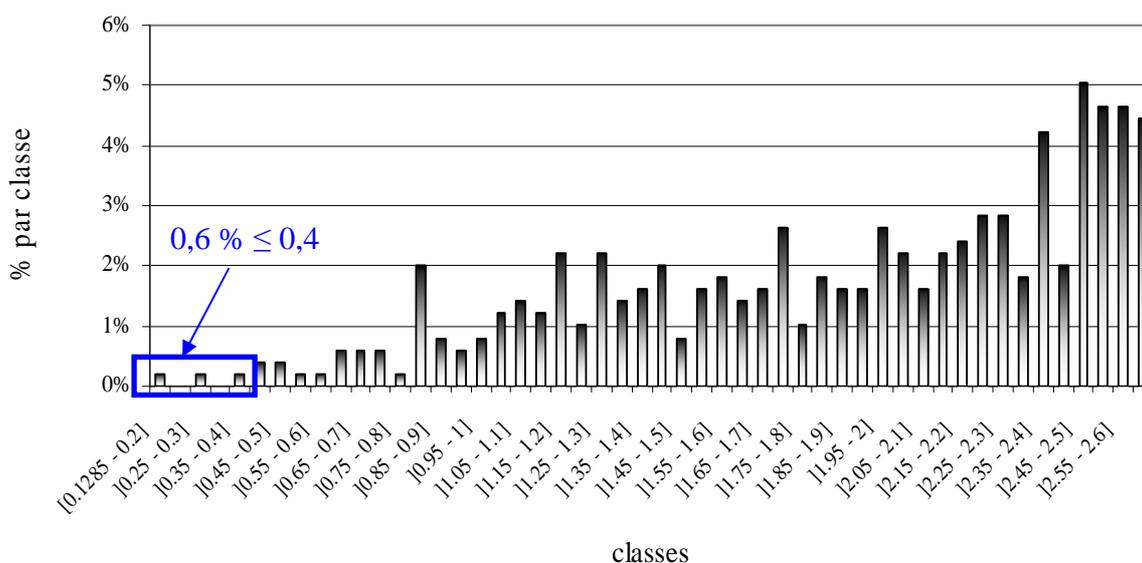


Figure A. Distribution par classes des valeurs de $DO_{PWM} - DO_N$ obtenues pour les 496 échantillons sélectionnés et analysés pour étudier la spécificité absolue du test IFN γ .

Toutefois, si ce seuil était redéfini pour une valeur de $DO_{PWM} - DO_N$ alors, il serait de 0,4. En effet, comme la valeur de la médiane des 496 valeurs de DO_N est de 0,1, alors nous pouvons

théoriquement déduire que selon Schiller I. et *al.*, le seuil des $DO_{PWM}-DO_N$ est de 0,4 ($DO_{PWM}-DO_N = 0,5-0,1=0,4$).

Si ce seuil ($DO_{PWM}-DO_N \leq 0,4$) est appliqué à la distribution des 496 valeurs de $DO_{PWM}-DO_N$ obtenues à partir de l'étude de spécificité absolue du test IFN γ (Figure A) alors, seulement 3/496 échantillons (0,6 %) stimulés par du PWM sont négatifs (« inhibés ») ; ce qui signifie que seulement 0,6 % des résultats (PPD et R) de l'étude sont inexploitable. Ce seuil a donc été retenu.

Ainsi, la qualité de l'échantillon ne peut pas être validée si $DO_{PWM}-DO_N \leq 0,4$.

➤ **Critère de validité du témoin négatif (PBS) :**

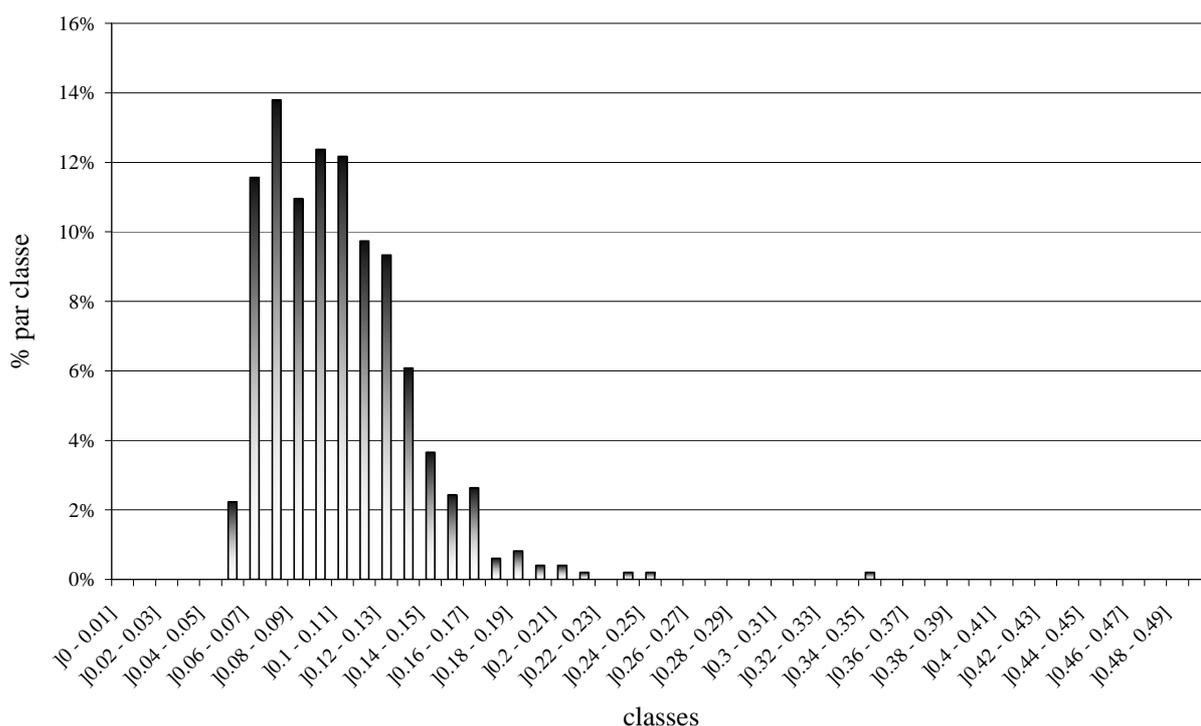


Figure B. Distribution par classe des valeurs de DO du PBS (DO_N) obtenues pour les 493 animaux restants (après élimination des 3 échantillons inhibés ($DO_{PWM}-DO_N \leq 0,4$) de l'étude de spécificité absolue du test IFN γ).

Le seuil du PBS, le témoin négatif (N) de la stimulation cellulaire a été fixé à partir de la distribution des valeurs de DO_N obtenues pour les 493 animaux restants (après élimination des 3 échantillons inhibés (contrôle PWM invalide)) de l'étude de spécificité absolue (Figure B).

La figure B montre que 492/493 valeurs de DO du PBS (DO_N) se trouvent dans l'intervalle [0,05; 0,25] (une seule valeur de DO_N à 0,34). Soit une seule valeur de DO_N est supérieure à 0,25 sur un total de 493.

Afin de ne pas retrouver dans les résultats finaux ce bruit de fond élevé (pouvant fausser les résultats), la valeur de DO du seuil pour le PBS a donc été fixée à 0,3 (déjà utilisée par Coad M. et *al.* (2008)).

Ainsi, à partir de 0,3 unité de DO pour le témoin négatif ($DO_N \geq 0,3$), la qualité de l'échantillon ne peut pas être validée. [D'après la figure B, 1 seul échantillon présente un témoin négatif invalide et par conséquent, des résultats en PPD et R ininterprétables]

Par conséquent, la qualité d'un échantillon est validée si $DO_N < 0,3$ et $DO_{PWM}-DO_N > 0,4$.

**ANNEXE XI : Examen des échantillons présentant des résultats invalides
pour les PPD en raison d'une saturation d'absorbance
(concernant les études de Se_r et Sp_r du test $IFN\gamma$)**

I. Échantillons invalides de l'étude de la sensibilité relative à la confirmation *post mortem* de Tb du test $IFN\gamma$

Parmi les 73 animaux sélectionnés initialement pour l'étude de la sensibilité relative à la confirmation *post mortem* de Tb (Se_r) du test $IFN\gamma$ modifié, 13 animaux ont obtenu des résultats individuels invalides pour les PPD alors que les résultats des R étaient valides.

En effet, la valeur de DO de PPDA (DO_{PPDA}) était élevée en même temps que celle de PPDB (DO_{PPDB}) et était supérieure à 2,5 unités de DO, avec un rapport DO_{PPDB}/DO_{PPDA} compris entre 0,850 et 1,150. Or, au-delà de 2,5 unités de DO, le graphique représentant la valeur de DO en fonction de la concentration en $IFN\gamma$ n'est plus linéaire en raison d'un phénomène de saturation de l'absorbance (Cf. Figure A). Par conséquent, ces échantillons ont dû être éliminés de l'étude la Se_r du test.

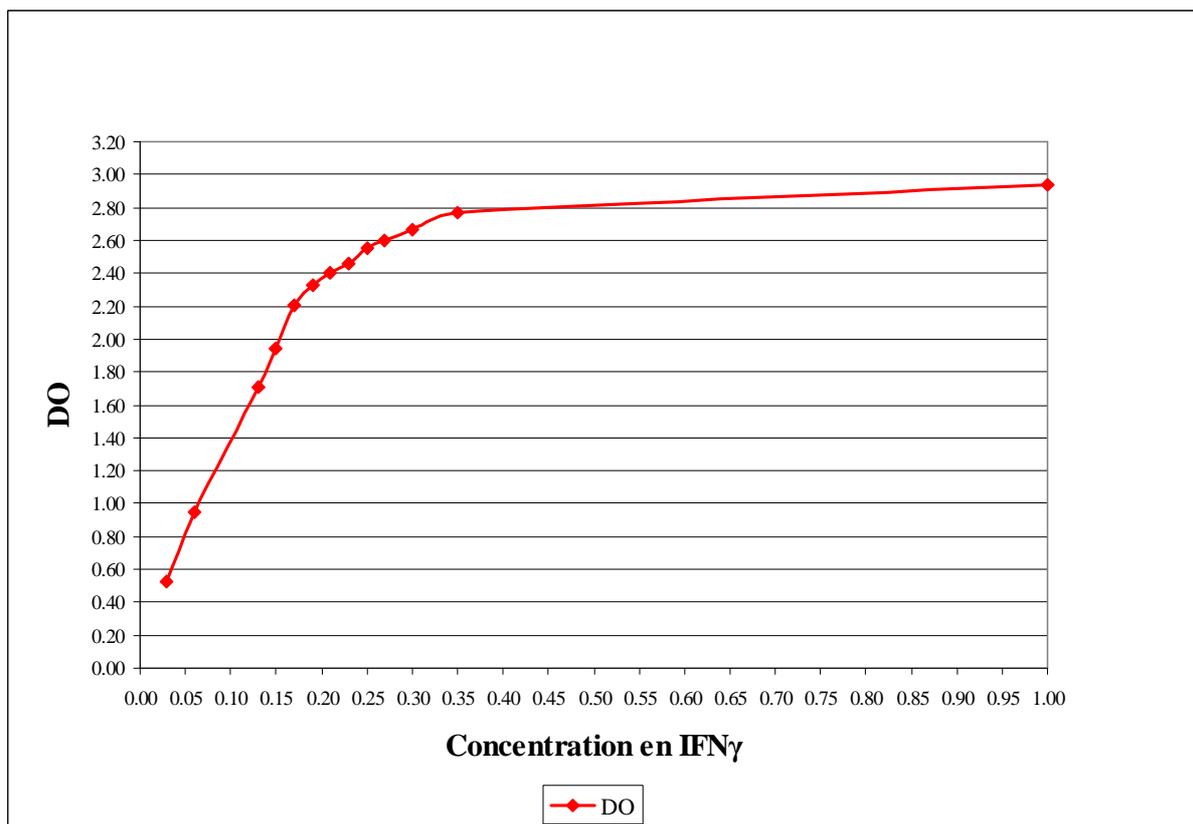


Figure A. Représentation graphique des valeurs de DO en fonction de la concentration en $IFN\gamma$, réalisée à partir du dosage d' $IFN\gamma$ par ELISA d'un échantillon de plasma pur (obtenu après stimulation de l'échantillon sanguin par du PWM) puis, dilué plusieurs fois (13 points de dilution : 1 ; 0,35 ; 0,30 ; 0,27 ; 0,25 ; 0,23 ; 0,21 ; 0,19 ; 0,17 ; 0,15 ; 0,13 ; 0,06 ; 0,03),

Cette saturation des valeurs de DO des PPD concernant ces 13 échantillons ne semble pas liée aux types de méthode employée pour la stimulation cellulaire, car ces échantillons ont été analysés avec les deux méthodes (3 par macro-méthode et 10 par micro-méthode).

En outre, ces 13 animaux avaient tous une IDS non-négative, un résultat positif en R ($1,072 < DO_R - DO_N < 0,098$, avec une valeur médiane à 1,026) et avaient été confirmés *a posteriori* par une des trois méthodes de diagnostic direct (histologie, PCR MTBC et bactériologie), (tableau A). De plus, 12/13 avaient une IDC non-négative (l'animal négatif à l'IDC avait fourni des résultats positifs en PCR et histologie).

Ces résultats laissaient penser que les animaux auraient dus être retrouvés positifs au test IFN γ .

La décision prise a donc été de diluer au 1/10 les 13 échantillons de plasmas et de les réanalyser. Ils ont été finalement trouvés positifs avec les PPD.

Tableau A. Résultats positifs (nombre d'animaux) en Bactériologie, Histologie et PCR obtenus pour les 13 animaux analysés et éliminés de l'étude de la Se_r du test IFN γ modifié, en raison de leurs valeurs de DO en PPDs invalides.

Résultats (Nombre d'animaux)	Histologie positive	PCR positive	Histologie et PCR positives	Total
Bactériologie positive	0	1	6	7
Exclusivement	5	0	1	
Total	12	8	7	

II. Échantillons invalides de l'étude de la spécificité relative à l'IDS non-négative du test

31 animaux parmi les 578 animaux sélectionnés initialement pour l'étude de la spécificité relative à l'IDS non-négative ou spécificité opérationnelle (Sp_r) du test IFN γ modifié, ont obtenu des résultats individuels invalides pour les PPD alors que les résultats des R sont valides.

En effet, comme pour l'étude de la Se_r du test, ces échantillons présentaient des valeurs de DO_{PPDA} et DO_{PPDB} élevées et supérieures à 2,5, avec un rapport DO_{PPDB}/DO_{PPDA} compris entre 0,850 et 1,150. Par conséquent, ces échantillons ont dus être éliminés de l'étude de la Sp_r du test.

Quelques uns des ces 31 échantillons de plasmas ont été dilués au 1/10 et réanalyser. Ils ont été finalement trouvés négatifs avec les PPD.

**ANNEXE XII : Méthode pour déterminer le nombre de copies d'IS6110
présentes dans une solution de 0,01 ng/μl d'ADN purifié de *M. bovis*
(monocopie IS6110)**

Méthode de calcul :

La concentration de la solution d'ADN purifié de *M. bovis* monocopie IS6110 (souche sauvage identifiée par la technique RFLP IS6110) est de 0,01 ng/μl. Comme la souche de *M. bovis* étudiée présente une seule copie d'IS6110, alors il suffit de connaître la taille de son génome pour calculer le nombre de génome (ou copie) présent dans la solution à 0,01 ng/μl.

Or, Garnier T. et *al.* (2003) ont estimé la taille du génome de *M. bovis* (AF2122/97, monocopie IS6110) à 4 345 492 paires de base. De plus, le poids moléculaire d'une paire de base (pb) est de 660 daltons et 1 dalton (da) est équivalent à $1,66 \times 10^{-24}$ g. Donc, le poids moléculaire du génome est de : $4,4 \times 10^6$ pb x (660 da x ($1,66 \times 10^{-24}$ g)) = $4,76 \times 10^{-15}$ g ou $4,76 \times 10^{-6}$ ng.

Dans 0,01 ng/μl d'ADN de *M. bovis* monocopie IS6110, il y a donc environ 2 100 copies de génome [$0,01 / (4,76 \times 10^{-6})$] et donc environ 2 100 copies d'IS6110.

Par conséquent, environ 10 500 copies d'IS6110 sont présentes dans 5 μl d'une solution d'ADN de *M. bovis* à 0,01 ng/μl (0,05 ng/PCR).

ANNEXE XIII : Etude de la limite de détection au seuil de confiance de 95 % du test PCR (PCR IS6110 en temps réel de LSI)

La limite de détection d'un test PCR correspond à la quantité minimale de gène d'intérêt amplifiable (dans ce cas-ci, nombre de copies d'IS6110) et détectable ou encore au plus petit nombre d'unité génome générant un résultat positif (amplification) au seuil de 95 %.

Des essais ont donc été réalisés afin de déterminer la limite de détection au seuil de confiance de 95 % (Ld 95 %) du test PCR IS6110 et déduire une méthode d'interprétation des résultats pour les études de sensibilité et spécificité analytiques des amorces et sonde spécifiques de l'IS6110.

➤ Matériels et méthodes

La limite de détection de ce test a été évaluée à partir de dilutions sériées d'ADN quantifié de *M. bovis* présentant une seule copie d'IS6110 (plusieurs essais successifs). Cet ADN purifié a été extrait au phénol-chloroforme à partir d'une souche terrain de *M. bovis* monocopie IS6110 (identifiée par la technique RFLP IS6110) puis, quantifié à l'aide d'un nanodrop™ par l'Afssa-Lerpaz.

• 1^{er} essai : Gamme A

Afin de cibler le nombre de dilutions nécessaires, une première estimation du seuil de positivité a été obtenue par un premier essai d'amplification d'une gamme A de cet ADN quantifié, en 7 points de dilutions sériées de raison 10 (répliquée 3 fois).

De plus, le premier point de cette gamme (A) a été déterminé en *a parte*, à partir d'une amplification d'une autre gamme ADN de *M. bovis* (monocopie IS6110) ayant à la dilution 10^{-4} , une concentration estimée à 0,01 ng/μl avec un Ct_{IS6110} de 24,8. Ainsi, la concentration du premier point de la gamme A, a été choisie à 0,01 ng/μl pour obtenir un Ct_{IS6110} entre 24 et 25.

Pour la préparation de la gamme A, nous sommes donc partis de 5 μl de cet ADN à 270 ng/μl que nous avons dilués au $1/27^{\text{ème}}$ dans 130 μl d'eau DNase/RNase free, afin d'obtenir une concentration en ADN de 10 ng/μl (vérifiée par le spectromètre Evolution 300 équipé de l'accessoire nanocell). Puis, 5 μl d'ADN à 10 ng/μl ont été dilués au 1/100 dans 495 μl d'eau DNase/RNase. La concentration en ADN obtenue était alors de 0,1 ng/μl ce qui correspondait à un Ct_{IS6110} de 20,6, vérifié deux fois par amplification. Ensuite, 5 μl d'ADN à 0,1 ng/μl ont été dilués dans 45 μl d'eau DNase/RNase free pour obtenir le premier point de la gamme A à 0,01 ng/μl (« pur A »), puis 6 dilutions successives au $1/10^{\text{ème}}$ (10^{-1} à 10^{-6}) ont été réalisées de manière similaire.

Les résultats d'amplification par PCR de cette gamme répliquée 3 fois devaient permettre de cibler la zone du seuil de positivité.

• 2^{ème} essai : Gamme B

Trois autres gammes identiques (B1, B2 et B3) en 4 points de dilutions, de raison déterminée à partir des résultats obtenus pour la gamme A, c'est-à-dire de raison 5, ont été préparées. La concentration du premier point (pur B) des gammes B1, B2 et B3 devait également être choisie à partir de résultats obtenus pour la gamme A, soit un pur B à 133,3 ng/μl. Chacune des 3 gammes devait être ensuite amplifiée 8 fois.

La détermination de la Ld 95 était alors possible par l'analyse des résultats obtenus pour les gammes B.

Pour la préparation de la gamme B, nous sommes partis de 40 µl d'ADN concentré à 10 000 fg/µl (pur A) que nous avons dilués au tiers dans 80 µl d'eau DNase/RNase free, afin d'obtenir une concentration en ADN de 3333,3 fg/µl. Puis, 40 µl d'ADN à cette concentration ont été dilués au 1/5 dans 160 µl d'eau DNase/RNase. Enfin, 100 µl d'ADN à 666,7 fg/µl ont été dilués au 1/5 dans 400 µl d'eau DNase/RNase. La solution obtenue pour une concentration en ADN de 133,3 fg/µl constituait le 1^{er} point de la gamme B (pur B). Ensuite trois dilutions successives au 1/5 ont été réalisées de la manière suivante : 30 µl d'ADN concentré dans 120 µl d'eau DNase/RNase.

➤ Résultats et Discussion

• Essai 1 :

Les résultats d'analyse par PCR de la gamme A en 7 points de dilution de raison 10 (ayant au premier point une concentration de 0,01 ng/µl), répliquée 3 fois (R1, R2 et R3) ont donc été retranscrits dans le Tableau A.

Pour déterminer le nombre de copies d'IS6110 présent dans les puits correspondants au premier point (pur A) de la gamme A, nous avons calculé la quantité de génome de *M. bovis* pour une concentration en ADN de *M. bovis* monocopie IS6110, de 50 000 fg/5µl soit 50 000 fg/PCR (Cf. Annexe XVI).

Les résultats obtenus pour la gamme A montrent qu'aux trois premiers points de gamme, les valeurs des Ct_{IS6110} pour les trois répliques sont quasi-identiques (Ct_{IS6110} au pur A : 24,3 pour les 3 répliques / Ct_{IS6110} à 10⁻¹ : 27,7 pour R1 et 27,8 pour R2 et R3 / Ct_{IS6110} à 10⁻² : 31,8 pour R1 et 31,2 pour R2 et R3). De plus, nous obtenons un écart de Ct_{IS6110} entre les deux premiers points de gamme, compris entre 3,4 et 3,5 (écart théorique de 3,3 Ct entre 2 dilutions successives de raison 10).

Tableau A. Résultats de l'analyse PCR (valeurs de Ct_{IS6110} obtenues) des trois répliques (R1, R2 et R3) de la gamme A en 7 points de dilution de raison 10 (ayant au premier point une concentration de 0,01 ng/µl).

7 points de dilution de la gamme A de raison 10	Concentration (ng/µl)	Concentration (fg/PCR)	Nombre de copies d'IS6110	Valeurs des Ct _{IS6110} obtenues		
				R1	R2	R3
10 ⁰ = pur A	1x10 ⁻²	50 000	10500	24,3	24,3	24,3
10 ⁻¹	1x10 ⁻³	5 000	1050	27,7	27,8	27,8
10 ⁻²	1x10 ⁻⁴	500	105	31,8	31,2	31,2
10 ⁻³	1x10 ⁻⁵	50	10 (10,50)	36,9	35,7	34,7
10 ⁻⁴	1x10 ⁻⁶	5	1 (1,05)	> 50	> 50	37,7
10 ⁻⁵	1x10 ⁻⁷	0,5	0 (0,10)	> 50	> 50	> 50
10 ⁻⁶	1x10 ⁻⁸	0,05	0 (0,01)	> 50	> 50	> 50

Cependant, à partir de la dilution 10^{-3} , les valeurs de Ct_{IS6110} ne sont plus répétables (Ct_{IS6110} à la dilution 10^{-3} : 36,9 pour R1; 35,7 pour R2 et 34,7 pour R3). De plus, à la dilution 10^{-4} , nous obtenons seulement un signal d'amplification et de détection pour la réplique R3 (Ct_{IS6110} à 37,7). Toutefois, pour cette réplique, l'écart de Ct_{IS6110} entre les points de gamme 10^{-2} et 10^{-3} est de 3,5 et celui entre les points de gamme 10^{-3} et 10^{-4} est de 3,0.

Par conséquent, comme l'écart entre deux dilutions successives de raison 10 est théoriquement de 3,3 Ct, alors cette réplique 3 semble être convenable. L'ensemble de ces résultats permet de cibler la zone du seuil de positivité pour des concentrations d'ADN comprises entre 10 et 1 fg/ μ l.

Néanmoins, il était nécessaire de vérifier cette supposition pour définir la concentration du premier point de la gamme B ainsi que la raison des dilutions successives de cette gamme.

Afin s'assurer que le seuil de positivité se situe entre 1 et 10 copies d'IS6110, un essai supplémentaire (gamme A') a été réalisé à partir de la dilution 10^{-3} de la gamme A. En effet, une gamme A' en 5 points de dilution de raison 2, disposant au premier point de dilution (pur A') d'une concentration en ADN de 10 fg/ μ l, a été préparée. Pour obtenir la dilution 2^{-1} , 20 μ l du pur A' ont été ajoutés à 20 μ l d'eau DNase/ RNase free. Puis, 3 dilutions successives au demi (2^{-2} à 2^{-4}) ont réalisées de manière analogue. Cette gamme A' a été répliquée deux fois (R1 et R2) puis analysée par PCR. Les résultats obtenus ont été retranscrits dans le Tableau B.

Les résultats obtenus pour la gamme A' montraient qu'aux trois premiers points de gamme, des signaux d'amplification étaient visualisables mais les valeurs des Ct_{IS6110} entre deux mêmes répliques n'étaient pas répétables (Ct_{IS6110} au pur A' : 35,5 pour R1 et 34,4 pour R2). Par ailleurs, à la dernière dilution, un seul signal d'amplification est apparu (à 2^{-4} , $Ct_{IS6110} > 50$ pour R1 et Ct_{IS6110} de 37,0 pour R2). Il en était de même pour la dilution précédente (à 2^{-3} , Ct_{IS6110} de 38,8 pour R1 et $Ct_{IS6110} > 50$ pour R2).

Tableau B. Résultats de l'analyse PCR (valeurs de Ct_{IS6110} obtenues) des deux répliques (R1 et R2) de la gamme A' en 5 points de dilution de raison 2 (ayant au premier point une concentration de 10 fg/ μ l).

5 points de dilution de la gamme A' de raison 2	Concentration (fg/ μ l)	Concentration (fg/PCR)	Nombre de copies d'IS6110	Valeurs des Ct_{IS6110} obtenues	
				R1	R2
$2^0 = \text{pur A'}$	10	50	10 (10,5)	35,5	34,4
2^{-1}	5	25	5 (5,3)	37,9	36,2
2^{-2}	2,5	12,5	3 (2,6)	37,8	36,3
2^{-3}	1,25	6,25	1 (1,3)	38,8	> 50
2^{-4}	0,625	3,125	1 (0,7)	> 50	37,0

Au regard de l'ensemble de ces résultats, nous avons pu supposer que le seuil de détection était de 3 copies d'IS6110. De plus, nous avons remarqué qu'il n'était pas souhaitable d'utiliser une raison de 2 (trop petite pour visualiser les écarts de Ct).

Par conséquent, ces résultats ont permis de définir la gamme B : en 4 points de dilutions de raison 5, disposant d'une concentration pour le pur B de 133,3 fg/ μ l (correspondant à 140 copies d'IS6110). Toutefois, il fallait ajouter un autre point correspondant à 3 copies d'IS6110 soit le point 5^{-2} dilué au demi.

- **Essai 2 :**

Afin de déterminer si cette gamme B convenait pour la détermination précise du seuil, un essai préliminaire d'amplification de cette gamme réalisée en trois exemplaires (B1, B2, B3) mais en une seule réplique a été effectué.

Les résultats de cet essai, notés dans le Tableau C, ont permis de déterminer la limite de détection de la PCR IS6110 étudiée, à 3 copies d'IS6110 (Ct_{IS6110} moyen de 37,6, sur trois valeurs seulement). Toutefois, pour que ce résultat soit statistiquement fiable, il fallait à nouveau effectuer cet essai mais en réalisant 8 répliques de chacune des trois gammes B (B1-R1 à B1-R8 ; B2-R1 à B2-R8 ; B3-R1 à B3-R8).

Tableau C. Résultats de l'analyse PCR (valeurs de Ct_{IS6110} obtenues) de la gamme B en trois exemplaires (B1, B2, B3) mais une seule réplique (essai préliminaire). *Gamme B en 4 points de dilution de raison 5 (ayant au premier point une concentration de 133 fg/μl), avec un point supplémentaire à 2,7 fg/μl (5^{-2} dilué au demi).*

4 points de dilution de la gamme B de raison 5 et 1 autre point	Concentration (fg/μl)	Nombre de copies d'IS6110	Valeurs des Ct_{IS6110} obtenues		
			B1	B2	B3
$5^0 = \text{pur B}$	133,3	140	29,5	29,3	30,1
5^{-1}	26,7	28	31,5	31,2	32,4
5^{-2}	5,3	6 (5,6)	35,8	35,9	34,6
5^{-3}	1,1	1 (1,1)	>50	>50	>50
5^{-2} dilué au 1/2	2,7	3 (2,8)	37,6	38,3	37,0

Les résultats de cet essai final ont permis de confirmer que la limite de détection de la PCR IS6110 étudiée était de 3 copies d'IS6110, correspondant à une valeur médiane de Ct_{IS6110} de 38.

➤ **Conclusion**

Les résultats de cette étude ont donc permis de déterminer la limite de détection de la PCR IS6110 étudiée à 3 copies d'IS6110, correspondant à un Ct_{IS6110} de 38.

Ainsi, un nouveau mode d'interprétation des résultats PCR obtenus pour la cible IS6110 a été proposé et utilisé pour les études de sensibilité et spécificité analytiques des amorces et sonde spécifiques de l'IS6110. Ce système d'interprétation des résultats est présenté dans le tableau D.

Tableau D. Système d'interprétation des résultats PCR, en tenant compte seulement des valeurs de Ct obtenues pour la cible IS6110 (Ct_{IS6110}), adopté pour les études de sensibilité et spécificité analytiques des amorces et sonde spécifiques de l'IS6110, du test PCR utilisé.

Résultats PCR IS6110 (Ct_{IS6110})	Interprétation des résultats
$Ct_{IS6110} \leq 38$	Positif MTBC
$38 < Ct_{IS6110} \leq 40$	Positif MTBC en limite de détection / douteux
$40 < Ct_{IS6110} \leq 50$	Négatif MTBC mais à retester
$Ct_{IS6110} > 50$	Négatif MTBC

ANNEXE XIV : Etude comparative des résultats obtenus avec les méthodes histologiques employées par les deux laboratoires agréés

Une étude comparative des méthodes employées par les deux laboratoires (LDA22 et ENV/Afssa-Lyon) a été réalisée à partir des études de sensibilité et spécificité diagnostiques de la *PCR*. Nous avons donc scindé chaque étude en deux sous-études, en fonction de la méthode histologique employée.

➤ Etude de la sensibilité diagnostique de la *PCR2b*

Parmi les 67 bovins étudiés (126 échantillons présentant des lésions suspectes), 43 animaux provenaient de 15 cheptels infectés de Côte d'Or et 24 animaux provenaient de 14 cheptels infectés de Dordogne. Ainsi, les analyses histologiques des 65 échantillons d'animaux de Côte d'Or et des 31 échantillons d'animaux de Dordogne ont été réalisées respectivement par l'ENV/Afssa-Lyon et le LDA22.

Les concordances obtenues entre les techniques histologique, bactériologique et *PCR2b* pour les deux sous-études (sous-étude 1, 24 animaux analysés par examen histologique au LDA22 et sous-étude 2, 43 animaux analysés par examen histologique à l'ENV/Afssa-Lyon), déduites à partir du Tableau A, ont été décrites dans le Tableau B.

Tableau A. Résultats (nombre d'animaux) positifs (+) et négatifs (-) de la *PCR2b*, de l'histologie (*Hist.*) réalisée au LDA22 ou à l'ENV/Afssa-Lyon (ENVL) et de la bactériologie (*Bact.*) obtenus dans l'étude de la sensibilité diagnostique de la *PCR2b* (n=67) scindée en deux sous-études en fonction des laboratoires d'analyses histologiques (LDA22, n=24 ; ENV/Afssa-Lyon, n=43).

		<i>Hist.</i> +		<i>Hist.</i> -		Total <i>Hist.</i>	
		LDA22	ENVL	LDA22	ENVL	LDA22	ENVL
<i>PCR2b</i> +	<i>Bact.</i> +	16	33	1	2	17	35
	<i>Bact.</i> -	2	3	0	0	2	3
	Total <i>Bact.</i>	18	36	1	2	19	38
<i>PCR2b</i> -	<i>Bact.</i> +	1	2	0	0	1	2
	<i>Bact.</i> -	2	0	2	3	4	3
	Total <i>Bact.</i>	3	2	2	3	5	5
<i>Bact.</i> +		17	35	1	2	18	37
<i>Bact.</i> -		4	3	2	3	6	6
Total <i>Bact.</i>		21	38	3	5	24	43

Les pourcentages de résultats concordants entre l'histologie et la bactériologie et/ou la *PCR2b* semblaient plus élevés dans la sous-étude 2, c'est-à-dire pour les cas où la méthode histologique réalisée, était celle de l'ENV/Afssa-Lyon. En outre, indépendamment de l'examen histologique, les concordances obtenues entre la *PCR2b* et la bactériologie pour les deux sous-études étaient semblables. L'ensemble de ces résultats laissait donc supposer que la méthode histologique de l'ENV/Afssa-Lyon était légèrement plus sensible que celle du LDA22.

Toutefois, comme les différences observées étaient globalement faibles et les effectifs réduits, il était difficile de conclure. La réalisation d'un test statistique, le Chi 2 a donc permis d'infirmer ces suppositions et, de prouver que les concordances obtenues entre l'histologie et

la bactériologie et/ou la *PCR2b* pour la sous-étude 1 n'étaient pas significativement différentes de celles obtenues pour la sous-étude 2.

Tableau B. Résultats (nombre d'animaux/total - % (IC 95%)) concordants entre *Hist.* & *PCR2b*, *Hist.* & *Bact.*, *Bact.* & *PCR2b* et *PCR2b*, *Bact.* & *Hist.* obtenus dans l'étude de la sensibilité diagnostique de la *PCR2b* (n=67) scindée en deux sous-études en fonction des laboratoires d'analyses histologiques (Sous-étude 1 : LDA22, n=24 ; Sous-étude 2 : ENV/Afssa-Lyon, n=43).

Concordance entre les résultats des techniques	Sous-étude 1 : 24 animaux dont examen histologique des échantillons réalisé par le LDA22	Sous-étude 2 : 43 animaux dont examen histologique des échantillons réalisé par l'ENV/Afssa-Lyon
<i>Hist.</i> & <i>PCR2</i>	20/24 – 83 % (± 16 %)	39/43 – 91 % (± 8 %)
<i>Hist.</i> & <i>Bact.</i>	19/24 – 79 % (± 16 %)	38/43 – 88 % (± 10 %)
<i>Bact.</i> & <i>PCR2</i>	21/24 – 88 % (± 14 %)	38/43 – 88 % (± 10 %)
<i>PCR2</i> , <i>Bact.</i> & <i>Hist.</i>	18/24 – 75 % (± 18 %)	36/43 – 84 % (± 12 %)

➤ Etude de la spécificité diagnostique de la *PCR*

Parmi les 38 bovins étudiés (47 échantillons présentant des lésions suspectes), 25 animaux provenaient de 25 cheptels indemnes de Côte d'Or et 13 animaux provenaient de 12 cheptels indemnes de Dordogne. Par conséquent, les analyses histologiques des 29 échantillons d'animaux de Côte d'Or et des 18 échantillons d'animaux de Dordogne ont été réalisées respectivement par l'ENV/Afssa-Lyon et le LDA22.

Les concordances obtenues entre les techniques histologique, bactériologique et *PCR* pour les deux sous-études (sous-étude 1, 13 animaux analysés par examen histologique au LDA22 et sous-étude 2, 25 animaux analysés par examen histologique à l'ENV/Afssa-Lyon), déduites à partir du Tableau C, ont été décrites dans le Tableau D.

Tableau C. Résultats (nombre d'animaux) positifs (+) et négatifs (-) de la *PCR*, de l'histologie (*Hist.*) réalisée au LDA22 ou à l'ENV/Afssa-Lyon (ENVL) et de la bactériologie (*Bact.*) obtenus dans l'étude de la spécificité diagnostique de la *PCR* (n=38) scindée en deux sous-études en fonction des laboratoires d'analyses histologiques (LDA22, n=13 ; ENV/Afssa-Lyon, n=25).

		<i>Hist.</i> +		<i>Hist.</i> -		Total <i>Hist.</i>	
		LDA22	ENVL	LDA22	ENVL	LDA22	ENVL
<i>PCR</i> +	<i>Bact.</i> -*	1	0	0	0	1	0
<i>PCR</i> -	<i>Bact.</i> -*	1	7 ¹	11	18	12	25
<i>Bact.</i> -*		2	7	11	18	13	25

* Comme tous les cheptels étaient indemnes car aucun animal n'avait été trouvé positif en bactériologie dans les cheptels, alors tous les animaux sélectionnés pour l'étude étaient nécessairement négatifs en bactériologie ; ¹/ Isolement de *M. avium* sur un animal.

Les proportions de résultats concordants entre l'histologie et la bactériologie et/ou la *PCR* semblaient plus élevées dans la sous-étude 1 (de spécificité), c'est-à-dire pour les cas où la méthode histologique réalisée, était celle du LDA22. En outre, indépendamment de l'examen histologique, les concordances obtenues entre la *PCR* et la bactériologie pour les deux sous-études étaient quasi-semblables. L'ensemble de ces résultats laissait donc supposer avec une

grande réserve que la méthode histologique du LDA22 était légèrement plus spécifique que celle de l'ENV/Afssa-Lyon.

Toutefois, comme les différences observées étaient globalement très faibles et les effectifs extrêmement réduits, pour être exploitables, il était difficile de conclure. La réalisation d'un Chi 2 a donc permis d'infirmer ces suppositions et, de prouver que les concordances obtenues entre l'histologie et la bactériologie et/ou la *PCR* pour la sous-étude 1 n'étaient pas significativement différentes de celles obtenues pour la sous-étude 2.

Tableau D. Résultats (nombre d'animaux/total) concordants entre *Hist. & PCR*, *Hist. & Bact.*, *Bact. & PCR* et *PCR, Bact. & Hist.* obtenus dans l'étude de la spécificité diagnostique de la *PCR* (n=38) scindée en deux sous-études en fonction des laboratoires d'analyses histologiques (Sous-étude 1 : LDA22, n=13 ; Sous-étude 2 : ENV/Afssa-Lyon, n=25).

Concordance entre les résultats des techniques	Sous-étude 1 : 13 animaux dont examen histologique des échantillons réalisé par le LDA22	Sous-étude 2 : 25 animaux dont examen histologique des échantillons réalisé par l'ENV/Afssa-Lyon
<i>Hist. & PCR</i>	12/13	18/25
<i>Hist. & Bact.</i>	11/13	18/25
<i>Bact. & PCR</i>	12/13	25/25
<i>PCR, Bact. & Hist.</i>	11/13	18/25

➤ Conclusion

Par conséquent, comme il n'existait pas de différence significative entre les deux méthodes, nous avons pu réunir les sous-études afin d'augmenter les effectifs des études de sensibilité diagnostique de la *PCR2b* (67 animaux) et de spécificité diagnostique de la *PCR* (38 animaux) et, obtenir subséquemment des résultats statistiquement fiables.

ANNEXE XV : Etude comparative entre la *PCR2b* et la *PCR IS6110* de l'Afssa-Lerpaz

Parmi les 42 échantillons utilisés pour l'étude comparative 1 entre *PCR1* et *PCR2*, 31 échantillons ont été également analysés par l'Afssa-Lerpaz avec leur test *PCR IS6110* en temps réel (noté *PCR-Afssa*). Les résultats de cette étude comparative entre la *PCR2b* et la *PCR-Afssa* ont été retranscrits dans le tableau A.

Les résultats obtenus indiquent des concordances excellentes entre la *PCR2b* et la *PCR-Afssa* (30/31). En effet, la *PCR2b* a permis de détecter un échantillon supplémentaire (par rapport à la *PCR-Afssa*) qui de plus, était confirmé par la bactériologie.

Par ailleurs, deux autres échantillons positifs en bactériologie ont été retrouvés négatifs en *PCR2b* et *PCR-Afssa* (2/2 positifs en histologie mais 1 invalide en *PCR1* et l'autre négatif en *PCR1* (résultats des échantillons dilués et ré-analysés)). Toutefois, les deux tests *PCR* ont permis de découvrir deux échantillons positifs alors qu'ils étaient négatifs en bactériologie (1/2 positif en histologie et 2/2 positifs en *PCR1*). En outre, les concordances entre la *PCR2b*, la *PCR-Afssa* et la bactériologie sont satisfaisantes (26/31, soit 84 % ± 13 %).

Tableau A. Résultats (nombre d'échantillons positifs (+), négatifs (-) (après ré-analyse si nécessaire des éluats dilués au 1/10)) de *PCR2b* & *Bact.* et *PCR-Afssa* & *Bact.*, à partir de 31 échantillons de l'étude comparative 1 entre *PCR1* et *PCR2* (où n=42).

		PCR-Afssa +	PCR-Afssa -	Total
<i>PCR2b</i> +	<i>Bact.</i> +	14	1	15
	<i>Bact.</i> -	2	0	2
	<i>Bact.</i> + & -	16	1	17
<i>PCR2b</i> -	<i>Bact.</i> +	0	2	2
	<i>Bact.</i> -	0	12	12
	<i>Bact.</i> + & -	0	14	14
<i>Bact.</i> +		14	3	17
<i>Bact.</i> -		2	12	14
<i>Bact.</i> + & -		16	15	31

Par conséquent, la *PCR2* (17/31 échantillons positifs) et la *PCR-Afssa* (16/31 échantillons positifs) semblent globalement être aussi sensibles que la bactériologie (17/31 échantillons positifs).

Etudes de la spécificité et de la sensibilité relatives aux tests tuberculiques de la technique de dosage d'Interféron gamma pour le diagnostic de la tuberculose bovine en Dordogne

FAYE S. (1), BOSCHIROLI M. L. (2), MOYEN J. L. (1), BENET J. J. (3), GARIN-BASTUJI B. (2), GARES H. (1).

(1) Laboratoire départemental d'analyse et de recherche de la Dordogne (LDAR24) - 161 avenue Winston Churchill - 24660 Coulounieix-Chamiers

(2) Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA), LERPAZ - Unité des Zoonoses Bactériennes - 23 avenue du Général De Gaulle - 94706 Maisons-Alfort

(3) Ecole nationale vétérinaire d'Alfort (ENVA) - Unité des Maladies Contagieuses - 7 avenue du Général De Gaulle - 94704 Maisons-Alfort

RESUME - Bien que la France ait été déclarée indemne de tuberculose bovine (TB) en 2001 (UE), le taux d'élevages infectés de TB dans certains départements comme la Dordogne est remonté de façon préoccupante au cours des dernières années. Le dépistage réglementaire actuel de la TB est encore basé sur une intradermotuberculation simple (IDS) et/ou une IDC (comparative). Leurs principaux inconvénients sont la subjectivité dans l'interprétation des résultats, le manque de spécificité de l'IDS, de sensibilité de l'IDC et un long délai (obligatoire entre deux tests) de suspension de la qualification du cheptel.

Un test de diagnostic alternatif, le dosage d'interféron gamma (IFN γ) a donc été étudié selon les conditions de terrain de la Dordogne. Ainsi, malgré l'absence de gold standard, des études de sensibilité et spécificité comparées (aux tests tuberculiques) du test IFN γ basé sur le kit Bovigam[®] avec les Dérivés Protéiques Purifiés Aviaires et Bovins (PPDA=A et PPDB=B), et avec les peptides recombinants ESAT6 et CFP10 (R) ont été effectuées dans le but de déterminer un seuil de décision pour lequel, la spécificité absolue et la sensibilité relative du test seront optimales.

Les résultats ont montré que pour la validation du mode opératoire, il serait intéressant d'utiliser différents seuils de positivité et méthodes d'interprétation du résultat du test (interprétation positive : si résultats des PPD et R positifs; si résultats des PPD ou R positifs), en fonction des zones ou des situations épidémiologiques rencontrées. Par ailleurs, dans certains cas particuliers, il conviendrait de se baser sur les résultats obtenus avec les antigènes recombinants. La sensibilité relative à l'IDC non négative du test étudié varie de 70 % à 72 % et sa spécificité absolue est estimée à 100 %. Cependant, il est nécessaire de poursuivre ces études en prenant des plus grands effectifs afin de tirer de conclusions statistiquement fiables.

Studies of the specificity and the sensitivity relative to skin tests of the dosage of the Interferon gamma technique for the diagnosis of the bovine tuberculosis in Dordogne

FAYE S. (1), BOSCHIROLI M. L. (2), MOYEN J. L. (1), BENET J. J. (3), GARIN-BASTUJI B. (2), GARES H. (1).

(1) LDAR24 - 161 avenue Winston Churchill - 24660 Coulounieix-Chamiers

SUMMARY - Even though France is considered bovine tuberculosis (BTB) free since 2001 (EU), BTB-infected cattle rates increased in the last years in regions such as Dordogne. Official screening of BTB is still based on single intradermal skin test (SIST) and/or the comparative version of the test (CIST). The main inconveniences of these tests are the subjectivity of interpretation of the result, the lack of specificity of SIST and of sensitivity of CIST and, upon declaration of an SICT non negative result, the long disqualification period imposed until CIST is carried out.

An alternative diagnostic test, interferon gamma (IFN γ) dosage, has been studied according to the field conditions in Dordogne. Thus, in spite of the lack of gold standard, studies of sensitivity and specificity compared to skin tests of the IFN γ test based on Bovigam[®] kit with Avian and Bovine Purified Protein Derivatives (PPDA=A and PPDB=B), and with recombinant peptides ESAT6 and CFP10 (R), were undertaken in order to determine a decisional cut off value for which absolute specificity and relative sensitivity of the test are optimal.

Ours results show that for validating the test procedure it would be interesting to use different cut off values and interpretation methods of the test result (positive interpretation : if positive PPD and R results ; if positive PPD or R results), depending on a given region or epidemiological situation. Besides, in particular cases, it would be convenient to consider the recombinant peptide-values only. Sensitivity relative to no negative IDC of the test vary between 70% and 72% and its absolute specificity is estimated to 100%. Nevertheless, it would be necessary to pursue these studies with a bigger number of animals in order to obtain statistically reliable conclusions.

INTRODUCTION

La tuberculose bovine (TB) due à *Mycobacterium bovis* est une maladie infectieuse contagieuse et chronique largement répandue dans le monde. Bien que la France ait été déclarée indemne de TB en 2001 par l'Union Européenne, les taux d'incidence de certains départements comme la Côte d'Or, les Pyrénées Atlantiques, la région de la Camargue et la Dordogne continuent à être élevés. Ce dernier a subi une augmentation de foyers de TB depuis 2003 (3 foyers ; 0,5 p. mille), le rendant jusqu'en 2006 le département le plus infecté de France (29 foyers ; 0,6 p. cent). Le dépistage réglementaire historique de la TB, encore utilisé à l'heure actuelle chez les bovins est basé sur des tests tuberculiques dont l'utilisation sur le terrain

rencontre des limites. En effet, l'intradermotuberculation simple (IDS, très sensible mais manquant de spécificité) est réalisée pour le dépistage de première intention. Dans le cas d'un résultat non négatif, la qualification du cheptel est suspendue. Après un délai obligatoire de 6 semaines, une intradermotuberculation comparative (IDC, plus spécifique) est effectuée afin de confirmer ou d'infirmer le résultat et ainsi décider, en cas de résultat positif, de l'abattage d'animaux afin de réaliser des prélèvements en vue de la mise en évidence du bacille tuberculeux, condition qui permet de déclarer le cheptel infecté de TB. Cette période de déqualification est par conséquent longue et elle engendre des pertes économiques considérables ce qui conduit à une sous-déclaration des résultats

non négatifs de l'IDS par certains vétérinaires traitants. Durant ces dernières années, un test de diagnostic alternatif, le dosage d'interféron gamma (IFN γ), a été développé afin de déceler l'infection à *M. bovis*. Ses principaux avantages sont la détection précoce de l'infection et la possibilité de l'utiliser à de multiples reprises sans délai d'attente entre deux examens. De plus, sa réalisation et son interprétation par le laboratoire le rendent indépendant des acteurs du terrain. Bien que ce test figure dans la réglementation française, son cadre d'utilisation précis n'a pas été défini en raison de l'absence de son évaluation en France.

L'objectif de ce travail est d'estimer, malgré l'absence de gold standard, la sensibilité relative à l'IDC non négative et la spécificité absolue du test de dosage d'IFN γ selon les conditions de terrain de la Dordogne. Le kit commercial utilisé est Bovigam[®] (Prionics) avec lequel des peptides recombinants, ESAT6 et CFP10 (Statens Serum Institut, SSI) ont été ajoutés.

Le but final de ce travail est d'évaluer si l'utilisation du test IFN γ conduit à une amélioration du programme de prophylaxie de la TB. En concertation avec la D. G. Al. (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche), les conditions d'inclusion de ce test dans le cadre réglementaire de la lutte contre cette maladie pourraient donc être envisagées.

1. MATERIEL ET METHODES

L'étude de la sensibilité relative du test a été effectuée rétrospectivement à partir des résultats des analyses effectuées pendant les campagnes de prophylaxie 2006-2007 et 2007-2008 en Dordogne.

L'étude de la spécificité absolue du test a été réalisée en début d'année 2008.

L'ensemble des résultats obtenus pour ces deux études va nous permettre de déterminer les seuils (« cut-off ») de validation du test IFN γ afin de définir des valeurs optimales de spécificité absolue et sensibilité relative.

1.1. TEST IFN γ

1.1.1. Stimulation cellulaire et dosage d'IFN γ

1.1.1.1. Macro-méthode

La stimulation cellulaire constitue la première étape de l'analyse. Pour la macro-méthode, le volume de sang utilisé est de 1 500 μ L. Ainsi, chaque échantillon sanguin est stimulé avec 1/ 100 μ L de tuberculines aviaires (PPDA=A) et bovines (PPDB=B) du kit Bovigam[®] (PPD Csl), 2/ 100 μ L de deux immunogènes spécifiques du bacille, les peptides recombinants ESAT6 et CFP10 (en individuel et/ou en mélange (Mix)), 3/ 100 μ L d'un témoin d'immunocompétence (témoin positif de la culture cellulaire), le PWM (Pokeweed mitogen) (seulement pour la campagne de prophylaxie 2007-2008) et 4/ 100 μ L d'un témoin négatif de la stimulation cellulaire (N), le tampon PBS (Phosphate buffer saline).

Ensuite, le dosage d'IFN γ par la méthode immuno-enzymatique (EIA) en sandwich est réalisée pour chaque plasma surnageant (Cf. notice du kit Bovigam[®]). Des témoins négatifs (TN) et positifs (TP) de l'EIA ainsi qu'un traceur (contrôle externe au kit de concentration et de valeur connues) sont ajoutés.

1.1.1.2. Micro-méthode

La différence entre macro- et micro-méthodes se situe au niveau de la stimulation cellulaire qui pour la micro-méthode, est réalisée en double et ses volumes sont réduits. En effet, seuls 250 μ L de sang sont incubés avec 25 μ L de stimulant. Macro- et micro-méthodes donnent des résultats similaires (Schiller I., com. personnelle).

Les peptides recombinants (R) sont systématiquement employés en individuel et mélange.

1.1.2. Interprétation des résultats

La méthode de validation de l'analyse par les différents témoins (sauf le PWM) est indiquée dans la notice Bovigam[®]. Pour l'interprétation des résultats, un mode de calcul et un seuil de positivité sont également décrits par le fabricant : $DO_B-DO_A > 0,10$. Pour les peptides recombinants, la valeur est : $DO_R-DO_N > 0,10$. Pour le PWM, la valeur retenue est $DO_{PWM}-DO_N > 0,40$ (seuil défini suite à des essais réalisés préalablement).

Le mode de calcul décrit dans le kit Bovigam[®] ne prend pas en compte les absorbances des témoins (TP et TN), et donc les variations d'absorbance dues aux conditions l'analyse (prévu dans la norme NF U 47-019).

Nous avons donc utilisé un calcul tenant compte des valeurs de DO obtenues pour les TP et TN par plaque d'analyse dans le résultat final (Cf. tableau 1). Les « cut off » ont également été redéfinis afin d'obtenir des valeurs correspondant aux seuils de 0,10 et de 0,04 (seuil étudié par Buddle B. *et al* (2001)). En effet, nous savons que théoriquement $DO_B-DO_A = 0,10$ (seuil haut) ou $DO_B-DO_A = 0,04$ (seuil bas) et la médiane $DO_{TP}-DO_{TN} = 2,4$ dans nos deux études.

Ainsi, $(DO_B-DO_A)/(DO_{TP}-DO_{TN}) = 0,10/2,4 = 0,04$. Les seuils pour ce nouveau mode de calcul sont donc de 0,04 (seuil haut) et de 0,02 (seuil bas). Il est intéressant d'étudier les résultats de l'utilisation de ce dernier en parallèle avec les tests tuberculiques pour les cheptels à risque.

Tableau 1 représentant les différents types de résultats obtenus avec les PPD et avec les R en utilisant le calcul normalisé au seuil 0,04.

Résultat individuel		Expression du résultat (DO)
PPD	Positif	$(DO_B-DO_A)/(DO_{TP}-DO_{TN}) > 0,04$
	Négatif	$(DO_B-DO_A)/(DO_{TP}-DO_{TN}) \leq 0,04$
R	Positif	$(DO_R-DO_N)/(DO_{TP}-DO_{TN}) > 0,04$
	Négatif	$(DO_R-DO_N)/(DO_{TP}-DO_{TN}) \leq 0,04$

Le résultat final du test est exprimé en tenant compte des résultats obtenus en PPD et en R (Cf. tableau 2).

Tableau 2 représentant les différents types de résultat final (association des résultats des PPD et R (PPD&R)) du test IFN γ .

Résultat PPD	Résultat R	Résultat final du test (PPD&R)
Positif	Positif	POSITIF
Négatif	Négatif	NEGATIF
Positif	Négatif	DIVERGENT
Négatif	Positif	

1.2. CRITERES DE SENSIBILITE RELATIVE & DE SPECIFICITE ABSOLUE DU TEST IFN γ

1.2.1. Critères de sensibilité relative

La population cible du test IFN γ est constituée de bovins provenant de cheptels confirmés infectés de TB d'une zone

en Dordogne. Les 59 bovins (issus de 27 cheptels) sélectionnés dans l'étude ont eu un résultat non négatif (non nég) en IDC selon les critères définis par Gormley E. *et al.* (2005). Notre étude concerne donc la sensibilité du test IFN γ conditionnelle à l'IDC non négative. Une IDS a également été effectuée pour ces bovins. Pour cette étude, nous avons utilisé la macro-méthode (Cf. 1.1.1.1.).

1.2.2. Critères de spécificité absolue

Vingt cinq cheptels provenant d'une zone en Dordogne indemne de TB à ce jour (toutes les prophylaxies négatives (notamment l'IDS) et aucun foyer déclaré depuis plusieurs années) ont été sélectionnés, soit 500 bovins. Pour cette étude, nous avons utilisé la micro-méthode (Cf. 1.1.1.2.).

2. RESULTATS

2.1. SENSIBILITE RELATIVE

Pour 9 animaux, la DO correspondant à la réponse à A était élevée (>1,7 unité DO) en même temps que celle de B et avec une différence de DO entre B et A comprise entre -0,50 et 0,1. Dans ce cas, l'application du calcul $(DO_B - DO_A) / (DO_{TP} - DO_{TN})$ risque au final de rendre négatif ou divergent un prélèvement provenant d'un animal infecté. En effet, 5/9 animaux ont été considérés infectés* après abattage (*au minimum des lésions évocatrices de tuberculose découvertes à l'abattoir ou un résultat positif en culture ou en histologie ou en PCR). De plus, ils ont tous une IDS non négative.

Il convient donc dans ce cas particulier de se baser sur la seule valeur de DO obtenue avec les peptides recombinants.

Ainsi, 50 bovins seulement, provenant de 25 cheptels, ont pu être retenus pour estimer la valeur de sensibilité relative (à l'IDC non nég) du test IFN γ (Se finale 1 (sensibilité finale ou pourcentage de résultats positifs en PPD et R, $PPD \cap R$)) actuellement utilisé en Dordogne.

Parmi ces 50 animaux avec un résultat non négatif en IDC, seuls 43 ont eu une réaction non négative à l'IDS (soit 86 %). De même, 19/50 bovins (soit seulement 38 %) ont été considérés infectés* après abattage. 18/19 ont eu un résultat positif en IFN γ et un seul a eu un résultat divergent. De plus, 17 animaux ont eu une réaction non négative à l'IDS.

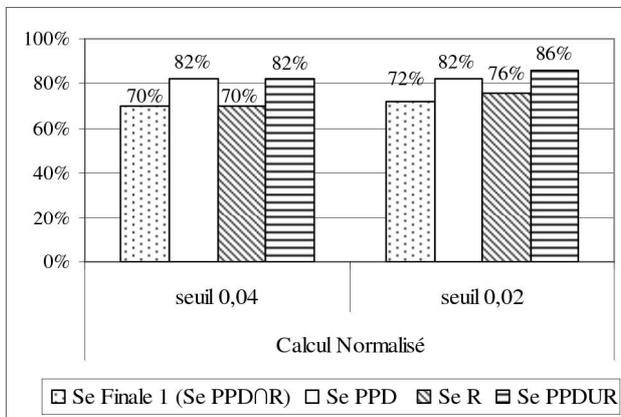


Figure 1 : Histogramme représentatif en pourcentage des sensibilités relatives individuelles des PPD (Se PPD) et R (Se R) et des sensibilités relatives du test (Se finale 1 ou Se PPDUR) pour le mode de calcul normalisé aux seuils 0,04 et 0,02 sur 50 animaux avec une IDC non négative.

Les résultats obtenus (Cf. figure 1) montrent que la sensibilité individuelle des PPD (Se PPD, pourcentage de résultats positifs en PPD) est plus élevée que celle des peptides recombinants (Se R, pourcentage de résultats positifs en R) et que la sensibilité du test (Se finale 1).

De plus, si on tenait compte du pourcentage de résultats positifs obtenus avec les PPD ou R (Se PPDUR), la sensibilité relative du test augmenterait (ex, au seuil 0,02, Se finale 1 de 72 % < Se PPDUR de 86 %, cf. figure 1).

Par ailleurs, les diverses sensibilités étudiées (Se PPDUR, Se PPD, Se R, et Se finale 1) sont meilleures pour le seuil bas (ex, Se finale 1 de 70 % à 0,04 et de 72 % à 0,02, cf. figure 1).

2.2. SPECIFICITE ABSOLUE

En raison de résultats non validés lors de l'analyse IFN γ (manque de plasma, PWM invalide, ...), le nombre total d'animaux retenu a été réduit à 492 animaux.

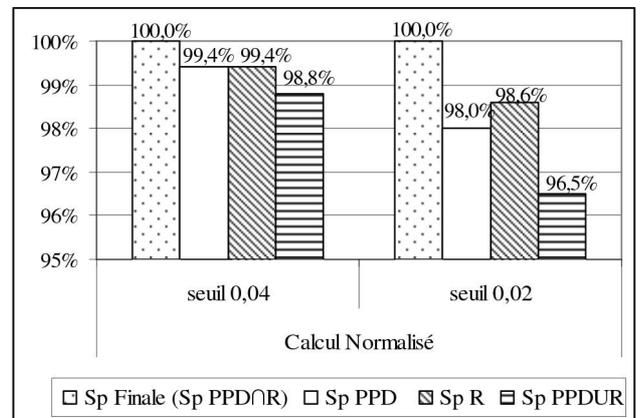


Figure 2 : Histogramme représentatif en pourcentage des spécificités absolues individuelles des PPD (Sp PPD) et R (Sp R) et des spécificités absolues du test (Sp finale ou Sp PPDUR) pour le mode de calcul normalisé aux seuils 0,04 et 0,02 sur 492 animaux.

La figure 2 montre que la spécificité des PPD (Sp PPD (pourcentage de résultats négatifs en PPD)) est de 99,4 % pour le seuil haut et de 98,0 % pour le seuil bas. Si l'on compare les spécificités individuelles (Sp PPD et Sp R (pourcentage de résultats négatifs en R)), la Sp R est identique à la Sp PPD au seuil haut mais elle est meilleure que la Sp PPD au seuil bas (98,6 %) (Cf. figure 2).

Par ailleurs, le pourcentage de résultats négatifs en PPD et R (Sp PPDUR) est de 98,8 % au seuil 0,04 et de 96,5 % au seuil 0,02 et le pourcentage de résultats négatifs obtenu avec les PPD ou R est plus élevé (Sp finale (Sp PPD ∩ R), de 100 % pour les deux seuils). Donc, comme il a été déjà démontré dans des travaux antérieurs, l'utilisation des peptides recombinants améliore nettement la spécificité finale du test Bovigam® (Van Pinxteren L. A. *et al.*, 2000 ; Vordermeier H. M. et Ewer K., 2006).

2.3. MISE EN COMMUN DES DEUX ETUDES

La spécificité absolue du test Bovigam® (PPD avec R inclus) actuellement utilisé en Dordogne est estimée à 100 % (Sp finale) alors que sa sensibilité relative étudiée à partir de 50 animaux avec une IDC non négative (Se finale 1) est comprise entre 70 % et 72 % (Cf. tableau 3).

Tableau 3 présentant les sensibilités relatives (Se finales : Se PPD∩R) et la spécificité absolue (Sp finale : Sp PPD∩R) du test IFN γ obtenues dans nos études.

Seuil :	0,04	0,02
Se finale 1 (<i>n</i> = 50 animaux avec IDC non nég)	70 %	72 %
Se finale 2 (<i>n</i> = 32 animaux avec IDC pos)	91 %	91 %
Se finale 3 (<i>n</i> = 43 animaux avec IDC et IDS non nég)	77 %	79 %
Sp finale (<i>n</i> = 492 animaux)	100 %	100 %

Néanmoins, parmi les 50 animaux de l'étude de sensibilité (Se finale 1), si seulement les 43 animaux avec des IDC et IDC non négatives sont étudiés, la sensibilité du test IFN γ augmente (Se finale 3 : 77 % – 79 %, cf. tableau 3).

De plus, pour l'étude de la sensibilité, 32/50 animaux (soit 64 %) ont eu une IDC positive (réaction positive à la tuberculine bovine supérieure de 4 mm à celle à la tuberculine aviaire) (Gormley E. *et al.*, 2005). Dans ce cas, la sensibilité individuelle des PPD passe alors à 100 %, celle des R à 91 % et la sensibilité du test IFN γ augmente nettement (Se finale 2 : 91 %, cf. tableau 3). Ainsi, tous les animaux ayant des IDC positives sont également détectés positifs avec le test IFN γ utilisant les PPD seulement. Une augmentation du pourcentage de bovins considérés infectés* après abattage (18/32 animaux soit 56 %) est également remarquée.

3. DISCUSSION

Dans notre étude, la spécificité du test IFN γ étudié (Sp finale) est estimée à 100 % pour les deux seuils et la Sp PPD est comprise entre 98,0 % et 99,4 % alors que la Sp PPD publiée par Wood P. R. *et al.* (1991) est de 98,1 % pour un seuil élevé et celle présentée par Lauzi S. *et al.* (2001) varie de 88,8 % à 93,5 %.

La sensibilité relative du test IFN γ étudié (Se finale 1) est comprise entre 70 % et 72 %.

Par ailleurs, les valeurs estimées de sensibilité et de spécificité obtenues avec le mode de calcul du fabricant aux deux seuils (résultats non présentés dans ce texte) sont respectivement quasi identiques avec celles obtenues avec le calcul normalisé. Cependant, comme ce dernier permet d'intégrer une correction des fluctuations liées aux conditions de l'analyse, il est donc le plus intéressant.

La comparaison des deux seuils montre que la spécificité finale est excellente pour les deux seuils (Sp finale de 100 %) alors que la sensibilité finale est meilleure au seuil 0,02 (Se finale 1 de 72 %). Ainsi, au seuil bas (0,02), le gain en sensibilité est de +2 % tandis que la spécificité n'est pas affectée. Le seuil 0,02 pourrait donc être le plus adapté. Néanmoins, cette comparaison de variations n'est pas significative car l'étude de la spécificité concerne un nombre d'échantillons (492 animaux) nettement plus important (11 fois plus) que pour la sensibilité (43 animaux). De plus, il conviendrait d'établir la courbe ROC pour déterminer les meilleures valeurs de sensibilité relative et spécificité absolue.

L'interprétation du test pourrait, cependant, être différente selon le cas rencontré. D'une part, dans le cas d'un cheptel susceptible d'être infecté par *M. bovis* (introduction, voisinage, résurgence), la sensibilité serait privilégiée par rapport à la spécificité. Le seuil décisionnel bas et la méthode d'interprétation PPDUR seraient les plus adaptés pour interpréter le résultat final du test. En revanche, le seuil décisionnel haut et la méthode d'interprétation

PPD∩R permettrait de privilégier la spécificité du test en gardant une sensibilité satisfaisante.

Une étude antérieure de sensibilité conditionnelle du test, réalisée par le LDAR24 à partir de la même population cible mais de 22 bovins choisis selon le critère, animaux considérés infectés* après abattage, a donné une sensibilité relative de 91 % à 95 % pour le calcul normalisé. 77 % des animaux ont eu une réaction non négative à l'IDS et 91 % à l'IDC (résultat idem à Costello E. *et al.*, 1997). En 2001, Wood P. R. *et al.* ont obtenu une sensibilité du test IFN γ à 88 % et de l'IDS à 75 % en Espagne. Au final, les différentes sensibilités de l'IFN γ obtenues par Wood P. R. *et al.* en 2001 varient de 81,8 % à 100 %. Bien que notre étude soit basée sur un faible effectif (22 animaux), elle montre que le test IFN γ est plus sensible que l'IDC avec le calcul normalisé (Wood P. R. *et al.*, 1991 et 2001; Coad M. *et al.*, 2008). Néanmoins, il conviendrait de confirmer ceci par des observations complémentaires.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Pour la validation du mode opératoire du test IFN γ , il serait intéressant de retenir le mode de calcul normalisé et, d'utiliser des seuils de positivité et des méthodes d'interprétation du résultat final du test (PPDUR ou PPD∩R) différents en fonction des zones ou des situations épidémiologiques rencontrées.

Ainsi, la sensibilité relative à l'IDC non négative du test IFN γ étudié est estimée entre 70 % et 72 % et la spécificité absolue est évaluée à 100 %. Cependant, ces premiers résultats sont simplement indicatifs. Il est nécessaire de poursuivre ces études en prenant des effectifs plus grands afin que les résultats soient statistiquement fiables.

Par ailleurs, certains cas particuliers peuvent nécessiter une interprétation différente. En effet, lorsque la DO correspondant à la réponse à A est supérieure à 1,5 unité de DO et avec une différence de DO entre B et A comprise entre -0,5 et 0,1, il convient donc de se baser sur la seule valeur de DO associée aux Ag recombinants. Ceci serait à confirmer par l'étude d'un échantillonnage plus grand.

Enfin, depuis 2006, l'utilisation du test IFN γ en Dordogne a permis de retrouver un taux satisfaisant de déclaration des IDS non négatives et de participer à la détection de nouveaux foyers en raison de la requalification rapide des cheptels suspendus.

Les auteurs remercient les sociétés Prionics et Statens Serum Institut pour leurs contributions.

Buddle B. M., Ryan T. J., Pollock J. M., Andersen P. and Lisle G. W., 2001. *Veterinary Microbiology*, 80, 37-46.

Coad M., Downs S. H., Durr P. A., Clifton-Hadley R. S., Hewinson R. G., Vordermeier H. M. et Whelan A. O., 2008. *The Veterinary Record*, 162, 382-384.

Costello E., Egan J. W. A., Quigley F.C. et O'Reilly P. F., 1997. *The Veterinary Record*, 141, 222-224.

Gormley E., Doyle M. B., Fitzsimons T., McGill K. et Collins J. D., 2005. *Veterinary Microbiology*, 112, 171-179.

Lauzi S., Pasotto D., Amadori M., Archetti I. L., Poli G. et Bonizzi L., 2000. *The Veterinary Journal*, 160, 17-24.

Van Pinxteren L. A. H., Ravn P., Agger E. M., Pollock J. and Andersen P., 2000. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7, 155-160.

Vordermeier H. M. et Ewer K., 2006. *Veterinary*. Defra.

Wood P. R., Corner L. A., Rothel J. S., Baldock C., Jones S. L., Cousins D. B., McCormick B. S., Francis B. R., Creeper J. and Tweddle N. E., 1991. *Aust Vet J*, 68, 286-290.

Wood P. R. et Jones S. L., 2001. *Tuberculosis*, 81, 147-155.

Determination of decisional cut-off values for the optimal diagnosis of bovine tuberculosis with a modified IFN γ assay (Bovigam[®]) in a low prevalence area in France

Sandy FAYE^{1,2,3,4}, Jean-Louis MOYEN¹, Hélène GARES¹, Jean-Jacques BENET³, Bruno GARIN-BASTUJI², María-Laura BOSCHIROLI^{2#}

1. Regional Analysis and Research Laboratory of Dordogne (LDAR24), 161 Av. Churchill, 24660 Coulounieix-Chamiers, France.
2. Bovine Tuberculosis Reference Laboratory, Bacterial Zoonoses Unit, French Food Safety Agency (AFSSA), 23 Av. du Général De Gaulle, 94706 Maisons-Alfort, France.
3. National Veterinary School of Alfort, (ENVA), Contagious Diseases Unit, 7 Av. du Général De Gaulle, 94704 Maisons-Alfort, France.
4. ABIES Doctoral School, ED 0435, AgroParisTech, 16 rue Claude Bernard, 75231, Paris Cedex 5, France.

#. Corresponding author: Bovine Tuberculosis Reference Laboratory, Bacterial Zoonoses Unit, AFSSA, 23 Av. du Général De Gaulle 94706 Maisons-Alfort, France.
Phone: +33 1 49 77 13 21; Fax: +33 1 49 77 13 44; E-mail: ml.boschiroli@afssa.fr

Abstract

The Bovigam[®] gamma interferon (IFN γ) assay was used to complement official skin-test screening in a low bovine tuberculosis (bTB) prevalence region in France.

The aim of our work was to determine decisional cut-off values for protein purified derivatives (PPD) and ESAT6-CFP10 antigens (R) in order to optimize the efficacy of the modified Bovigam[®] test, in this low-prevalence area, for optimal classification of infected or non-infected herds following positive skin tests.

The sensitivity of the IFN γ assay relative to *post-mortem* bTB-positive animals (Se_r) was studied in 60 cattle from 20 bTB-infected herds. Its absolute specificity (Sp) was studied in 492 cattle from 25 bTB-free herds from a bTB-free zone. Its operational specificity (relative to the positive skin test) (Sp_r) was also studied in 547 skin-test positive cattle from 172 bTB-free herds from an infected zone.

Using normalized interpretations for individual (PPD or R) results, the cut-off values at 0.02 for PPD and 0.01 for R were obtained with a view to employing them in low prevalence areas with no previously observed non-specific reactions to SITT.

Concerning its use after positive skin tests, cut-off values were set at 0.05 for PPD and at 0.03 for R. The choice of an interpretation method considering positive results with PPD and/or R (PPDUR), justified in a high risk context, provided a test Se_r of 93% [84-98] and Sp_r of 71.8% [67.9-75.6]. Analysis of positive results with PPD and R (PPD \cap R), ideal for low-risk contexts, provided a test Sp_r of 94.3% [92.0-96.1] and Se_r of 77% [64-87].

Thus, adapting the criteria to the region's infection status and to the conditions for its application is essential for the appropriate use of the IFN γ assay.

Keywords: Bovigam[®] IFN γ assay, ESAT6-CFP10, Diagnosis, Cut-off, Sensitivity, Specificity

Introduction

Bovine tuberculosis (bTB) is an important zoonosis found throughout the world which is particularly difficult to control and eradicate. France has been officially bTB-free since 2001, however, the number of infected herds in the south-west rose to 10-20 per year between 2003 and 2006 (Anonymous, 2009), despite strict bTB regulations.

bTB-infection status in a herd is officially established if *Mycobacterium bovis* is confirmed by bacteriology from at least one animal, or if bTB-like lesions are detected by histology from a positive single intradermal comparative cervical tuberculin test (SICCT) from the animal. In France, official screening of bTB is based on the skin test. The frequency of skin test controls depends on the area's bTB prevalence. Pre-movement controls have not been mandatory since 2005.

A single intradermal cervical tuberculin test (SITT) (Bénet J.J., 2008) is carried out first, which, if positive (*i.e.* detecting an increase in skin thickness at the bovine tuberculin injection site of more than 2 mm), leads to the herd being disqualified and activity being suspended until a SICCT is carried out

six weeks later. In the event of a negative SICTT result (*i.e.* if the bovine reaction is less than or equal to 2 mm or if the bovine reaction is greater than 2 mm but the difference between bovine and avian reactions is less than 1 mm), the herd is considered as bTB-free; on the contrary, if the SICTT result is positive (*i.e.* if the bovine reaction is greater than 2 mm and the difference between bovine and avian reaction is greater or equal to 1 mm), diagnostic culling of the affected animal is carried out. However, there are certain disadvantages to the skin test such as subjectivity in result interpretation, lack of specificity for the SITT and lack of sensitivity for the SICTT.

Because until 2005 animals testing positive to the SITT were under-declared, bTB surveillance in this region was almost entirely based on *post-mortem* examination at the slaughterhouse. Indeed, notification of a positive SITT reaction leads to a long suspension of the herd's status at least until a further SICTT is carried out. Besides, due to the very low bTB prevalence in France, the positive predictive value (PPV) of the SITT is consequently too low and thus the test is considered unreliable by veterinary practitioners.

An alternative diagnostic test, the gamma interferon (IFN γ) assay, allows early detection of bTB (Buddle *et al.*, 1995, 2009; Wood *et al.*, 2001; Gormley *et al.*, 2005; De la Rua-Domenech *et al.*, 2006a, 2006b; Vordermeier *et al.*, 2006). In contrast to the skin test, the IFN γ assay is a laboratory test that can be standardized, whose results can be interpreted objectively, independent of veterinary practitioners. Moreover, it can be carried out without any delay between the two analyses.

Due to the rise in the incidence of bTB in the region, preventive measures have been strengthened and the Bovigam[®] IFN γ assay (Prionics), has been included as an additional diagnostic tool to reinforce the skin test findings.

Since 2006, the Bovigam[®] assay has been included in surveillance programs to allow the rapid confirmation of positive SITTs (serial use) and also for simultaneous use with SITTs for epidemiological studies (parallel use) in this French region. ESAT6 and CFP10, *M. tuberculosis* complex specific antigens (from the Statens Serum Institut, SSI), have also been used to improve IFN γ assay specificity (Aagaard *et al.*, 2006), especially in population groups testing positive to the SITT. In addition, several modifications to the original protocol (Faye *et al.*, 2008 and Schiller *et al.*, 2009) have been introduced to optimize the test in a context of low bTB prevalence.

The aim of our work was to determine decisional cut-off values for the protein purified derivatives (PPDs) and specific antigens (ESAT6 and CFP10) in order to obtain optimal results in terms of sensitivity and specificity from this modified use of the Bovigam[®] assay in a low-prevalence area, in the region's infected or non-infected cattle population or after positive SITT responses.

Materials and methods

The IFN γ assay sensitivity study, relative to *post-mortem* bTB positive confirmation (Se_r), was conducted retrospectively using the results obtained during the 2006-2007, 2007-2008 and 2008-2009 bTB control programs in the affected French south-west region.

The IFN γ assay absolute specificity (Sp) study was performed in early 2008 in the same region (Faye *et al.*, 2008).

Cut-off values to determine optimal Se_r and Sp values were obtained by combining the results of the two studies (Se_r & Sp).

However, since the IFN γ assay was widely used as a routine SITT confirmatory tool, the operational specificity of the IFN γ assay, *i.e.* its relative specificity to positive SITTs (Sp_r), was also studied. This was carried out using the results of the 2007-2008 bTB control program.

I. Description of the IFN γ method employed

I.1. Cellular stimulation and IFN γ dosage: Micro-method

The guidelines for the use of the Bovigam[®] kit were those provided by the manufacturer, although the initial volumes for cellular stimulation were reduced (micro-method) as similar results are obtained with either of these methods (Schiller *et al.*, 2009).

Cellular stimulation was performed in duplicate in a 96-well plate. The bloods were processed on the day of collection (6-8 hours max delay). Each aliquot of blood (250 µl) was stimulated with either (i) 25 µl of avian tuberculin (PPD A = A) or bovine tuberculin (PPD B = B) at 20 µg/ml (Prionics PPDs), (ii) 25 µl of the recombinant peptides ESAT6 and CFP10 (R, from SSI) at 5 µg/ml of final blood concentration for each, (iii) 25 µl of the Pokeweed Mitogen (PWM, from Sigma), an immunocompetence control at 5 µg/ml of final blood concentration, (iv) 25 µl of the Phosphate Buffer Saline (PBS = N) as a negative control for cellular stimulation.

After 16-24 h incubation at 37°C in a humidified atmosphere, the plate was centrifuged for 10 minutes at 500 g to facilitate plasma collection.

IFN γ concentrations were determined for each supernatant plasma (tested in duplicate), using the sandwich enzyme immunoassay (EIA) method (see Bovigam[®] documentation). Bovigam[®] negative (NC) and positive (PC) controls were used. An additional external positive control, a homemade tracer consisting of a pool of positive IFN γ cattle plasma with a constant and well known optical density (OD) value, was also used in order to evaluate the test's reproducibility.

I.2. Method of interpreting results

The different control values (NC and PC) used for validating EIA were those of the manufacturer. The control values (PWM and PBS) used for validating the samples' quality were the following: $OD_{PWM} - OD_N > 0.40$ for PWM (Faye *et al.*, 2008) and $OD_N < 0.30$ for PBS (as previously described by Coad *et al.*, 2008). The level of variation between duplicate samples was below 10 %.

A new result interpretation calculation formula was used. It takes into account the NC and PC results per analysis plate, and thus absorbance variations due to analytical conditions (recommended by the French standard for EIA (NF U47-019)) and used by Olsen *et al.*, 2005): $(OD_B - OD_A) / (OD_{PC} - OD_{NC})$ for PPD and $(OD_R - OD_N) / (OD_{PC} - OD_{NC})$ for R. (Faye *et al.*, 2008).

Consequently, the 0.1 cut-off recommended for the Bovigam[®] kit has been adapted with a formula including median $OD_{PC} - OD_{NC}$ at 2.40: $(OD_B - OD_A) / (OD_{PC} - OD_{NC}) = 0.10 / 2.40 = 0.04$ (Faye *et al.*, 2008). The PC and NC OD values (for each analysis plate) are those obtained from our sensitivity and specificity studies.

Thus, the individual positive results of the IFN γ assay were as follows:

Positive result in PPD if $(OD_B - OD_A) / (OD_{PC} - OD_{NC}) \geq$ selected cut-off

Positive result in R if $(OD_R - OD_N) / (OD_{PC} - OD_{NC}) \geq$ selected cut-off

The final result of the IFN γ assay is determined according to the combined individual results of PPD and R. It is divided into 3 categories: positive (POS, positive individual results), negative (NEG, negative individual results) and divergent (DIV, different individual results), (Faye *et al.*, 2008).

II. Specimen description and processing

II.1. IFN γ assay sensitivity study in relation to *post-mortem* bTB positive confirmation (Se_r)

The IFN γ assay sensitivity study in relation to *post-mortem* bTB confirmation (Se_r) was carried out retrospectively in 73 cattle from 28 recognized bTB-infected herds (*i.e.* where at least one animal has been found to be culture-positive for *M. bovis*) from a high-prevalence zone in the studied region. All these cattle presented bTB-like lesions at the slaughterhouse and were thus considered bTB-positive (as described by Gormley *et al.*, 2005). In addition, 40 of these 73 animals were further analyzed and confirmed as bTB-infected by different direct diagnostic methods: 26 at least by culture and 14 at least by *Mycobacterium tuberculosis* complex PCR and/or histology (Faye *et al.*, 2008).

Collection of these blood samples was carried out between 3 and 10 days after the SITT.

II.2. IFN γ assay absolute specificity study (Sp)

IFN γ assay absolute specificity (Sp) was studied in 492 cattle from 25 bTB-free herds (*i.e.* where no cattle have been found to be culture-positive since 2001) from a bTB-free zone (no positive animal in any of the screening tests (SITT and SICTT) and no recognized outbreak for at least 10 years), (Faye *et al.*, 2008). These herds are still considered as bTB-free to date.

Collection of these blood samples was carried out on the same day as the SITT.

II.3. IFN γ assay specificity study in relation to positive SITT (Sp_r)

IFN γ assay specificity relative to positive SITT (Sp_r) was studied in 578 cattle testing positive to SITT from 176 bTB-free herds (*i.e.* where no cattle have been found to be culture-positive since 2001). Unlike the above-mentioned absolute specificity study, these herds were located in a bTB-infected zone (*i.e.* a zone where several bTB outbreaks had taken place in recent years). These herds were subsequently monitored annually and to date they are still considered bTB-free. Collection of these blood samples was carried out 3 days after the SITT.

III. Statistical methods

Different cut-off values were evaluated in a simulation to determine their effects on the sensitivity (Se_r) and specificities (Sp_r & Sp) of the test (Lauzi *et al.*, 2000). The R statistical software (R version 2.9.2 (August 2009), R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <http://www.R-project.org>) was used to estimate sensitivity and specificity values (with a 95% confidence interval, 95% CI).

To establish a set of conditions (a cut-point) to provide both the optimal test's sensitivity and specificity, receiver-operator characteristic (ROC) analyses of single variables were used (Ryan *et al.*, 2000).

Results

I. Individual Sensitivity relative to *post-mortem* bTB positive confirmation (Se_r) & Absolute Specificity (Sp) and final Se_r & Sp at selected cut-off values for optimal individual Se_r & Sp

In the Se_r study, 13/73 animals yielded invalid results with PPD stimulation. The OD value for A (OD_A) was high, as was that of B (OD_B) (each >2.5 OD units), with an OD_B/OD_A ratio ranging from 0.850 to 1.150. Indeed, beyond 2.5 OD units, the graph representing OD as a function of the IFN γ concentration was not linear (absorbance saturation). Therefore, only the remaining 60 cattle (from 20 herds) were used in our analysis.

Plasma from these invalid-result animals was diluted tenfold in PBS which allowed us to overcome the OD saturation problem and assign them as real positive infected animals (data not shown). The limited number of samples made it impossible to draw valid statistical conclusion.

I.1. Combined results of individual Se_r & Sp studies of the IFN γ assay

I.1.1. PPD Se_r & PPD Sp at different cut-off values

Table 1a shows the PPD Se_r figures for different cut-off values obtained from the Se_r study. PPD Sp values are shown in Table 1a using different cut-off values obtained from the Sp study (Faye *et al.*, 2008).

The results presented in Table 1a show that PPD is more specific than sensitive (cut-off at 0.04, 83% [95% CI, 72-92%] for PPD Se_r and 99.4% [95% CI, 98.2-99.9%] for PPD Sp).

A ROC curve of PPD [(OD_B-OD_A)/(OD_{PC}-OD_{NC})] was plotted from these PPD Se_r and Sp values (Figure 1a). The optimal PPD Se_r (93% [84-98]) and PPD Sp (98.0% [96.3-99.0]) were obtained when the cut-off is about 0.02 (Figure 1a and Table 1a).

I.1.2. R Se_r & R Sp at different cut-off values

ESAT6-CFP10 (R) Se_r values are shown in Table 1b using different cut-off values obtained from the Se_r study. The R Sp figures, using different cut-off values obtained from the Sp study, are shown in Table 1b.

The results presented in Table 1b show that R is more specific than sensitive (cut-off at 0.04, 80% [68-89] for R Se_r and 99.4% [98.2-99.9] for R Sp) as described in the literature.

A ROC curve of $R [(OD_R - OD_N)/(OD_{PC} - OD_{NC})]$ was plotted from these $R Se_r$ and $R Sp$ values (Figure 1b). The optimal $R Se_r$ (97% [89-100]) and $R Sp$ (95.9% [93.8-97.5]) were obtained when the cut-off is about 0.01 (Figure 1b and Table 1b).

I.2. Final Se_r & Sp of the IFN γ assay at selected cut-off values for optimal individual Se_r & Sp

I.2.1. Final Se_r at cut-off values 0.02 and 0.01 for PPD and R calculation methods respectively

The final Se_r of the IFN γ assay, at cut-off values 0.02 and 0.01 for PPD and R calculation methods respectively, are shown in Table 2. PPD \cap R results correspond to positive results while PPDUR results correspond to positive and divergent results.

The Se_r PPD \cap R [% (POS)] and the Se_r PPDUR [% (POS + DIV)] obtained were estimated at 90% [82-98] and 100% [95-100] respectively (Table 2).

I.2.2. Final Sp at cut-off values 0.02 and 0.01 for PPD and R calculation methods respectively

The final Sp of the IFN γ assay, at cut-off values 0.02 and 0.01 for PPD and R calculation methods respectively, are shown in Table 2.

The Sp PPD \cap R [$1 - \% (POS) = \% (NEG + DIV)$] and Sp PPDUR [$1 - \% (POS + DIV) = \% (NEG)$] obtained were estimated at 100% [99.2-100] and 93.9% [91.4-95.8] respectively (Table 2).

II. Individual Sensitivity relative to *post-mortem* bTB positive confirmation (Se_r) & Specificity relative to positive SITT (Sp_r) and final Se_r & Sp_r at selected cut-off values for optimal individual Se_r & Sp_r

In the Sp_r study of the IFN γ test, 31/578 animals yielded invalid results in PPD. Therefore, only the remaining 547 cattle (172 herds) were subsequently kept for our study.

Plasma from these invalid-result animals was diluted tenfold in PBS which allowed us to overcome the OD saturation problem and assign them as real negative infected animals (data not shown).

II.1. Combined results of individual Se_r & Sp_r studies of the IFN γ assay

II.1.1. PPD Se_r & PPD Sp_r at different cut-off values

For the different cut-off values obtained from the Se_r study, the PPD Se_r figures are given in Table 1a. For the different cut-off values obtained from the Sp_r study, the PPD Sp_r figures are also given in Table 1a.

The results, presented in Table 1a, show that PPD is more sensitive than specific (cut-off at 0.04, 83% [72-92] for PPD Se_r and 73.3% [69.4-77.0] for PPD Sp_r) in contrast to the results obtained in the absolute specificity (Sp) study.

A second ROC curve of PPD $[(OD_B - OD_A)/(OD_{PC} - OD_{NC})]$ was plotted from these PPD Se_r and Sp_r values (Figure 1c). The optimal PPD Se_r (83% [72-92]) and PPD Sp_r (75.5% [71.7-79.0]) were obtained when the cut-off is about 0.05 (Figure 1c and Table 1a).

II.1.2. R Se_r & R Sp_r at different cut-off values

The R Se_r figures, for different cut-off values obtained from the Se_r study, are given in Table 1b. The R Sp_r figures, for different cut-off values obtained from the Sp_r study, are also given in Table 1b.

The results, presented in Table 1b, show that R is more specific than sensitive (cut-off at 0.04, 80% [68-89] for R Se_r and 93.1% [90.6-95.0] for R Sp_r) as described in the literature.

A second ROC curve of R $[(OD_R - OD_N)/(OD_{PC} - OD_{NC})]$ was plotted from these R Se_r and Sp_r values (Figure 1d). The optimal R Se_r (87% [75-94]) and R Sp_r (90.7% [87.9-93.0]) were obtained when the cut-off is about 0.03 (Figure 1d and Table 1b).

This cut-off corresponds to 0.07 (0.03 x 2.4) with the following calculation method: $OD_R - OD_N$.

II.2. Final Se_r & Sp_r of the IFN γ assay at selected cut-off values for optimal individual Se_r & Sp_r

II.2.1. Final Se_r at cut-off values 0.05 and 0.03 for PPD and R calculation methods respectively

The final Se_r of the IFN γ assay, at cut-off values 0.05 and 0.03 for PPD and R calculation methods respectively, are shown in Table 3.

The Se_r PPD \cap R and Se_r PPDUR obtained were estimated at 77% [64-87] and 93% [84-98] respectively (Table 3).

II.2.2. Final Sp_r at cut-off values 0.05 and 0.03 for PPD and R calculation methods respectively

The final Sp_r of the IFN γ assay, at cut-off values 0.05 and 0.03 for PPD and R calculation methods respectively, are shown in Table 3.

The Sp_r PPD \cap R and Sp_r PPDUR obtained were estimated at 94.3% [92.0-96.1] and 71.8% [67.9-75.6] respectively (Table 3).

Discussion and Conclusion

In our study, a normalized interpretation formula was used to improve the test's reproducibility. Combining the individual results of the Se_r (sensitivities relative to *post-mortem* bTB positive confirmation) of PPD and ESAT6-CFP10 (R) stimulation and the Sp (absolute specificities) of PPD and R made it possible to determine the cut-off values for obtaining optimal values of individual Se_r and Sp .

The cut-off value of our PPD calculation method is estimated at 0.02 for optimal PPD Se_r of 93% [84-98] and Sp of 98.0% [96.3-99.0] (Table 1a), while the cut-off value of our R calculation method is estimated at 0.01 for optimal R Se_r of 97% [89-100] and Sp of 95.9% [93.8-97.5] (Table 1b).

However, Bovigam[®]'s OD_{PC} values are generally too high (average value about 2.5) and thus no longer corresponding to the dose-response zone. It is thus recommended for subsequent studies to dilute the kit's positive control so as to obtain OD_{PC} values in the linear zone which are constant for each batch.

The test's specificity and sensitivity were assessed considering positive and divergent results (PPDUR) or just positive results for each method (PPD \cap R).

If we consider PPD \cap R, the values of the relative sensitivity and absolute specificity of the IFN γ assay were finally estimated respectively at 90% [82-98] and 100% [99.2-100] (Table 2) at previously determined cut-off values (0.01 for R & 0.02 for PPD) in a context of low prevalence with no previous non-specific reactions to SITT. For PPDUR, relative sensitivity and absolute specificity were estimated at 100% [95-100] for Se_r and 93.9% [91.4-95.8] for Sp (Table 2).

We can then propose to interpret the test results according to different epidemiological contexts. Indeed, in the case of animals from an unfavorable context, *i.e.* belonging to a previously bTB-infected herd (risk of bTB resurgence) and/or a presently bTB-infected herd and/or a herd epidemiologically linked to another recognized bTB-infected herd, sensitivity should be favored rather than specificity. The PPDUR interpretation should then be chosen. For this type of interpretation, we obtained excellent test sensitivity (Se_r of 100%) with good specificity values (Sp of 93.9%).

Conversely, in a favorable context, *i.e.* a herd considered free of bTB for several years and presenting no other epidemiological link with other infected herds, or a herd from a bTB-free zone, specificity should be favored rather than sensitivity. The PPD \cap R interpretation would thus be more suitable. Here, we obtain excellent test specificity (Sp of 100%) with acceptable test sensitivity (Se_r of 90%).

However, since the IFN γ assay was mostly used after a positive SITT, we also studied the operational specificity of the test (Sp_r). The results obtained show that R is more specific than PPD at a selected cut-off value of 0.04 (93.1% [90.6-95.0] for R Sp_r (Table 1b) & 73.3% [69.4-77.0] for PPD Sp_r (Table 1a)). The use of R clearly allows the specificity of the IFN γ assay to be improved (Van Pinxteren *et al.*, 2000; Buddle *et al.*, 2001, 2003, 2009; Vordermeier *et al.*, 2001, 2006; Wood *et al.*, 2001 and Aagaard *et al.*, 2006; De la Rua-Domenech *et al.*, 2006a; Coad *et al.*, 2008).

Thus, as has already been described by others (Rothel *et al.* 1990; Wood *et al.*, 1991, 2001; Ryan *et al.*, 2000 and Gormley *et al.*, 2005), the Bovigam[®] assay appears to be a useful additional diagnostic tool for the detection of bTB in low-prevalence areas when used with specific peptides and an adapted protocol.

The combination of results from the individual Se_r and the individual Sp_r studies (specificities, relative to positive SITTs, of PPD and R) made it possible to determine cut-off values for obtaining optimal individual values.

The cut-off value of our PPD calculation method was estimated at 0.05 for optimal PPD Se_r of 83% [72-92] and Sp_r of 75.5% [71.7-79.0] (Table 1a); the cut-off value of our R calculation method was estimated at 0.03 for optimal R Se_r of 87% [75-94] and Sp_r of 90.7% [87.9-93.0] (Table 1b).

If we consider $PPD \cap R$, the values of the relative sensitivity and specificity of the $IFN\gamma$ assay were finally estimated respectively at 77% [64-87] and 94.3% [92.0-96.1] (Table 3) at previously determined cut-offs (0.03 for R & 0.05 for PPD), in a low prevalence context and in a positive SITT population, while they were estimated at 93% [84-98] for Se_r and 71.8% [67.9-75.6] for Sp_r (Table 3), with regard to the PPDUR method. Then, in an unfavorable context, the PPDUR interpretation would provide good test sensitivity (Se_r about 93%) with suitable test specificity (Sp_r about 71.8%). Conversely, in a favorable context, the $PPD \cap R$ interpretation would provide good test specificity (Sp_r about 94.3%) with suitable test sensitivity (Se_r about 77%). In these population groups, the loss in specificity led to a modification of the employed cut-off values and thus, a decrease in the sensitivity. This effect is more noticeable for PPD than for R.

In retrospective studies, *i.e.* Se_r and Sp_r studies, the totality of the assays could not be carried out with same delay after SITT. We did not take into account this variability in performing the test (3-10 days after SITT), even though the literature shows it may sometimes affect the results (Schiller *et al.*, 2010).

On the whole, the values for individual sensitivity and specificity depend on the specific field conditions when applying the test (the total population or just the positive SITT population). As a result, their corresponding decisional cut-offs also vary. Subsequent to the choice of decisional cut-off values, the result interpretation method ($PPD \cap R$ or PPDUR method) is selected according to a favorable or unfavorable epidemiological context.

To conclude, the present work made it possible to determine cut-off values of 0.02 and 0.01 for PPD and R respectively for the use of the modified $IFN\gamma$ assay in parallel to SITT, in a particular region in Dordogne, *i.e.* in a population without previous SITT's non-specific reactions and with a low bTB prevalence context. Concerning the use of this $IFN\gamma$ assay after positive SITTs and in a low prevalence area, we obtained cut-off values of 0.05 and 0.03 for PPD and R respectively. These cut-off values could also be suitable for other areas where cross reactions with environmental mycobacteria might occur.

The different data obtained show that, according to the region's infection status and the conditions of the test's application, it is necessary to study individual (PPD and R) sensitivities and specificities so as to define optimal decisional cut-off values for PPD and R. Moreover, the PPDUR interpretation method should be used when a bTB high-risk estimate is established (based on an unfavorable epidemiological context) whereas a $PPD \cap R$ interpretation method should be used for a low-risk assessment (favorable epidemiological context).

Finally, adapting the analysis criteria (cut-offs & interpretation method) to the region's infection status (for example low or high bTB prevalence, frequency of non-specific reaction, etc.) and to the test application conditions (for example confirmation of previous SITT results, total or partial depopulation, etc.), is essential for the appropriate use of our modified $IFN\gamma$ assay.

Acknowledgments

We would like to thank the Dordogne Regional Veterinary Services for their collaboration and the Immunoserology team at the LDAR24 for their technical contribution to this work. We would also like to thank Prionics and the Statens Serum Institut for their collaboration. We are grateful to the Dordogne Federation of Sanitary Defense Groups Health (GDS24). We are also grateful to the National Association for Research and Technology (ANRT) and the European Regional Development Funds (ERDF) for their financial contribution. Finally, we would like to express our gratitude to Dr. Keck, from the Hérault Regional Veterinary Laboratory (France).

References

- Aagaard, C., Govaerts, M., Meikle, V., Vallecillo, A. J., Gutierrez-Pabello, J. A., Suarez-Guêmes, F., McNair, J., Cataldi, A., Espitia, C., Andersen, P., Pollock, J. M., 2006. Optimizing antigen cocktails for *Mycobacterium bovis* diagnosis in herds with different disease prevalence: ESAT6/CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4326-4335.
- Anonymous, 2009. Bilan du rapport annuel ruminants 2007. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, France, note de service DGAL/SDSPA/ N2009-8079, <http://agriculture.gouv.fr/sections/publications/bulletin-officiel/2008>; Accessed February 25, 2009; Last accessed March 15, 2010.
- Bénet, J.J., 2008. Tuberculose Bovine. *In la tuberculose animale. Ecoles Nationales Vétérinaires Françaises, Unité des Maladies Contagieuses.* pp 8-39. http://cours.vet-alfort.fr/fichier/ensv/r_cours_405/Tuberculose%202008.pdf; Accessed December 11, 2009; Last accessed March 15, 2010.
- Buddle, B.M., De Lisle, G.W., Pfeffer, A., Aldwell, F.E., 1995. Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. *Vaccine* 13, 1123-1130.
- Buddle, B.M., Ryan, T.J., Pollock, J.M., Andersen, P., De Lisle, G.W., 2001. Use of ESAT-6 in the interferon- γ test diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. *Vet. Microbiol.* 80, 37-46.
- Buddle, B.M., McCarthy, A.R., De Lisle, G.W., Ryan, T.J., Pollock, J.M., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Andersen, P., 2003. Use of mycobacterial peptides and recombinant proteins for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-positive cattle. *Vet. Rec.* 153, 615-620.
- Buddle, B.M., Livingstone, P.G., De Lisle, G.W., 2009. Advances in *ante-mortem* diagnosis of tuberculosis in cattle. *N. Z. Vet. J.* 57, 173-180.
- Coad, M., Downs, S.H., Durr, P.A., Clifton-Hadley, R.S., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., Whelan, A.O., 2008. Blood-based assays to detect *Mycobacterium bovis*-infected cattle missed by tuberculin skin testing. *Vet. J.* 162, 382-384.
- De la Rua-Domenech, R., Goodchild, A.T., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Christiansen, K.H., Clifton-Hadley, R.S., 2006a. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnosis techniques. *Res. Vet. Sci.* 81, 190-210.
- De la Rua-Domenech, R., Goodchild, A.T., Vordermeier, H.M., Clifton-Hadley, R.S., 2006b. Ante mortem diagnosis of bovine tuberculosis: the significance of unconfirmed test reactors. *G.V.J.* 16, 65-71. http://www.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/diseases/atoz/tb/documents/gifn_specificityreport.pdf, Accessed August 08, 2006; last accessed March 15, 2010.
- Faye, S., Boschioli, M.L., Moyen, J.L., Bénet, J.J., Garin-Bastuji, B., Gares, H., 2008. Study of the specificity and the sensitivity of the dosage of the interferon gamma technique to the cattle for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Rencontres Recherches Ruminants* 15, 81-84.
- Gormley, E., Doyle, M. B., Fitzsimons, T., McGill, K., Collins, J. D., 2005. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam[®]) assay. *Vet. Microbiol.* 112, 171-179.
- Lauzi, S., Pasotto, D., Amadori, M., Archetti, I.L., Poli, G., Bonizzi, L., 2000. Evaluation of the specificity of the γ -interferon test in Italian bovine tuberculosis-free herds. *Vet. J.* 160, 17-24.
- Olsen, I., Boysen, P., Kulberg, S., Hope, J.C., Jungersen, G., Storset, A.K., 2005. Bovine NK cells can produce gamma interferon in response to the secreted mycobacterial proteins ESAT-6 and MMP14 but not in response to MPB70. *Infect. Immun.* 73, 5628-5635.

Rothel, J.S., Jones, S.L., Corner, L.A., Cox, J.C., Wood, P.R., 1990. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- γ and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust. Vet. J.* 67, 134-137.

Ryan, T.J., Buddle, B.M., De Lisle, G. W., 2000. An evaluation of gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *Res.Vet. Sci.* 69, 57-61.

Schiller, I., Waters, W.R., Vordermeier, H.M., Nonnecke, B.J., Welsh, M., Keck, N., Whelan, A., Sigafosse, T., Stamm C., Palmer, M.V., Thacker, T.C., Hardegger, R., Marg-Haufe, B., Raeber, A., Oesch, B., 2009. Optimization of a whole-blood gamma interferon assay for detection of *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Clin. Vaccine Immunol.* 16, 1196-1202.

Schiller, I., Vordermeier, H.M., Waters, W.R., Whelan, A., Coad, M., Gormley, E., Buddle, B.M., Palmer, M.V., Thacker, T.C., McNair, J., Welsh, M., Hewinson, R.G., Oesch B., 2010. Bovine tuberculosis: Effect of tuberculin skin test on *in vitro* interferon gamma responses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 136, 1-11.

Van Pinxteren, L.A.H., Ravn, P., Agger, E.M., Pollock, J., Andersen, P., 2000. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP-10. *Clin. Diagn. Lab. Immun.* 7, 155-160.

Vordermeier, H.M., Whelan, A., Cockle, P.J., Farrant, L., Palmier, N., Hewinson, R.G., 2001. Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immun.* 8, 571-578.

Vordermeier, H.M., Ewer, K., 2006. Specificity trial of the Bovigam[®] IFN-gamma test in GB cattle. *G.V.J.* 16, 72-80. http://www.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/diseases/atoz/tb/documents/gifn_specificityreport.pdf, Accessed August 08, 2006; last accessed March 15, 2010.

Wood, P.R., Corner, L.A., Rothel, J.S., Baldock, C., Jones, S.L., Cousins, D.B., McCormick, B.S., Francis B.R., Creeper, J. Tweddle, N.E., 1991. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Aust. Vet. J.* 68, 286-290.

Wood, P.R., Jones, S.L., 2001. Bovigam[®]: an vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 81, 144-155.

Tables

Table 1. Results (% - 95% CI) of individual Se_r , Sp and Sp_r of the IFN γ assay for different cut-off values, obtained in Se_r (n=60), Sp (n=492) and Sp_r (n=547) studies : a. Results of PPD Se_r , PPD Sp and PPD Sp_r (result calculation: $(OD_B - OD_A) / (OD_{PC} - OD_{NC})$); b. Results of R Se_r , R Sp and R Sp_r (result calculation: $(OD_R - OD_N) / (OD_{PC} - OD_{NC})$).

	Cut-off	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08
a. Results of PPD Se_r , PPD Sp and PPD Sp_r % - 95% CI (number)	PPD Se_r (i)	93% 84-98 (56)	93% 84-98 (56)	87% 75-94 (52)	83% 72-92 (50)	83% 72-92 (50)	75% 62-85 (45)	75% 62-85 (45)	75% 62-85 (45)
	PPD Sp (ii)	97.6% 95.8-98.7 (480)	98.0% 96.3-99.0 (482)	99.2% 97.9-99.8 (488)	99.4% 98.2-99.9 (489)	99.4% 98.2-99.9 (489)	99.4% 98.2-99.9 (489)	99.4% 98.2-99.9 (489)	99.4% 98.2-99.9 (489)
	PPD Sp_r (iii)	61.1% 56.8-65.2 (334)	66.5% 62.4-70.5 (364)	70.4% 66.4-74.2 (385)	73.3% 69.4-77.0 (401)	75.5% 71.7-79.0 (413)	77.1% 73.4-80.6 (422)	79.5% 75.9-82.8 (435)	80.8% 77.2-84.0 (442)
b. Results of R Se_r , R Sp and R Sp_r % - 95% CI (number)	R Se_r (iv)	97% 89-100 (58)	88% 76-95 (53)	87% 75-94 (52)	80% 68-89 (48)	72% 59-83 (43)	68% 55-80 (41)	67% 53-78 (40)	62% 48-74 (37)
	R Sp (v)	95.9% 93.8-97.5 (472)	98.6% 97.1-99.4 (485)	99.4% 98.2-99.9 (489)	99.4% 98.2-99.9 (489)	99.6% 98.5-99.9 (490)	99.6% 98.5-99.9 (490)	99.8% 98.9-100 (491)	99.8% 98.9-100 (491)
	R Sp_r (vi)	60.9% 56.6-65.0 (333)	84.8% 81.5-87.7 (464)	90.7% 87.9-93.0 (496)	93.1% 90.6-95.0 (509)	94.5% 92.3-96.3 (517)	95.4% 93.3-97.0 (522)	96.0% 94.0-97.5 (525)	96.5% 94.6-97.9 (528)

i. Number of PPD positives in Se_r study; ii. Number of PPD negatives in Sp study; iii. Number of PPD negatives in Sp_r study; iv. Number of R positives in Se_r study; v. Number of R negatives in Sp study; vi. Number of R negatives in Sp_r study.

Table 2. Final results (number of POS, DIV and NEG), at cut-off values 0.02 and 0.01 for the PPD and R calculation method respectively, in the Se_r study (n=60) and the Sp study (n=492) of the IFN γ assay and then the Se_r (% - 95% CI) and the Sp (% - 95% CI) of the IFN γ assay from the PPD \cap R or PPDUR interpretation method.

Cut-offs: 0.02 PPD & 0.01 R		
Number of	Final results in Sp study	Final results in Se_r study
POS	0	54
DIV	30	6
NEG	462	0
Interpretation method	Final Sp % - 95% CI (number of negative animals)	Final Se_r % - 95% CI (number of positive animals)
PPD \cap R	100% [99.2-100] (492)	90% [82-98] (54)
PPDUR	93.9% [91.4-95.8] (462)	100% [95-100] (60)

Sp PPD \cap R: $1 - \% (POS) = \% (NEG + DIV)$; Sp PPDUR: $1 - \% (POS + DIV) = \% (NEG)$;
 Se_r PPD \cap R: $\% (POS)$; Se_r PPDUR: $\% (POS + DIV)$.

Table 3. Final results (number of POS, DIV and NEG), at cut-off values 0.05 and 0.03 for the PPD and R calculation method respectively, in the Se_r study (n=60) and the Sp_r study (n=547) of the IFN γ assay and then the Se_r (% - 95% CI) and the Sp_r (% - 95% CI) of the IFN γ assay from the PPD \cap R or PPDUR interpretation method

Cut-offs: 0.05 PPD & 0.03 R		
Number of	Final results in Sp_r study	Final results in Se_r study
POS	31	46
DIV	123	10
NEG	393	4
Interpretation method	Final Sp_r % - 95% CI (number of negative animals)	Final Se_r % - 95% CI (number of positive animals)
PPD \cap R	94.3% [92.0-96.1] (516)	77% [64-87] (46)
PPDUR	71.8% [67.9-75.6] (393)	93% [84-98] (56)

Sp_r PPD \cap R: $1 - \% (POS) = \% (NEG + DIV)$; Sp_r PPDUR: $1 - \% (POS + DIV) = \% (NEG)$;
 Se_r PPD \cap R: $\% (POS)$; Se_r PPDUR: $\% (POS + DIV)$.

Figure

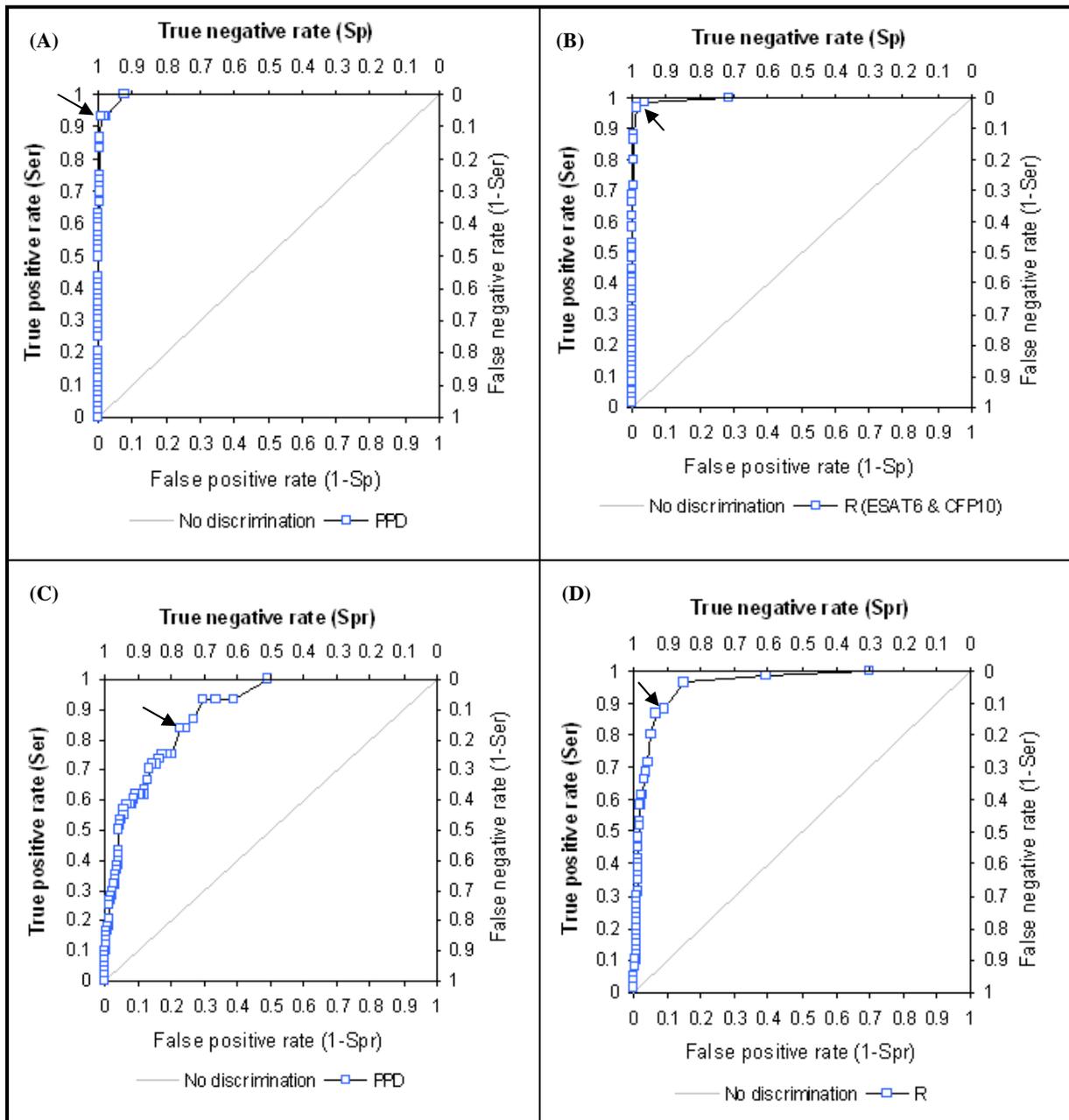


Figure 1. (A): ROC curve of PPD $[(OD_B - OD_A) / (OD_{PC} - OD_{NC})]$ from PPD Se_r & PPD Sp . The optimal cut-point of this calculation method at 0.02, yielding a Se_r of 0.93 and a Sp of 0.98, is shown (arrow); **(B):** ROC curve of R $[(OD_R - OD_N) / (OD_{PC} - OD_{NC})]$ from R Se_r & R Sp . The optimal cut-point of this calculation method at 0.01, yielding a Se_r of 0.97 and a Sp of 0.96, is shown; **(C):** ROC curve of PPD $[(OD_B - OD_A) / (OD_{PC} - OD_{NC})]$ from PPD Se_r & PPD Sp_r . The optimal cut-point of this calculation method at 0.05, yielding a Se_r of 0.83 and a Sp_r of 0.76, is shown; **(D):** ROC curve of R $[(OD_R - OD_N) / (OD_{PC} - OD_{NC})]$ from R Se_r & R Sp_r . The optimal cut-point of this calculation method at 0.03, yielding a Se_r of 0.87 and a Sp_r of 0.91, is shown.