

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail

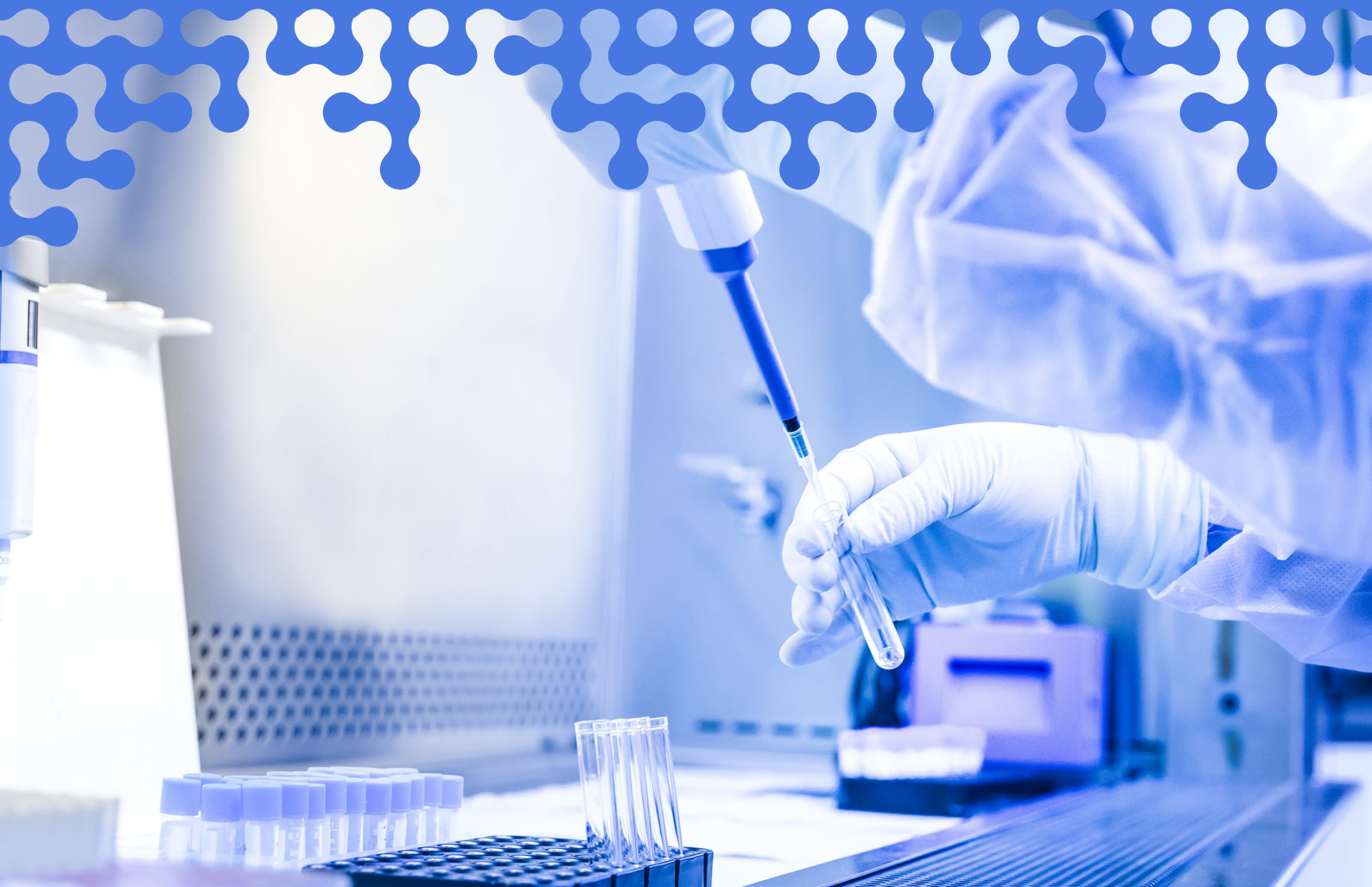


Connaître, évaluer, protéger

Dépistage de la tuberculose bovine par le test interféron

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

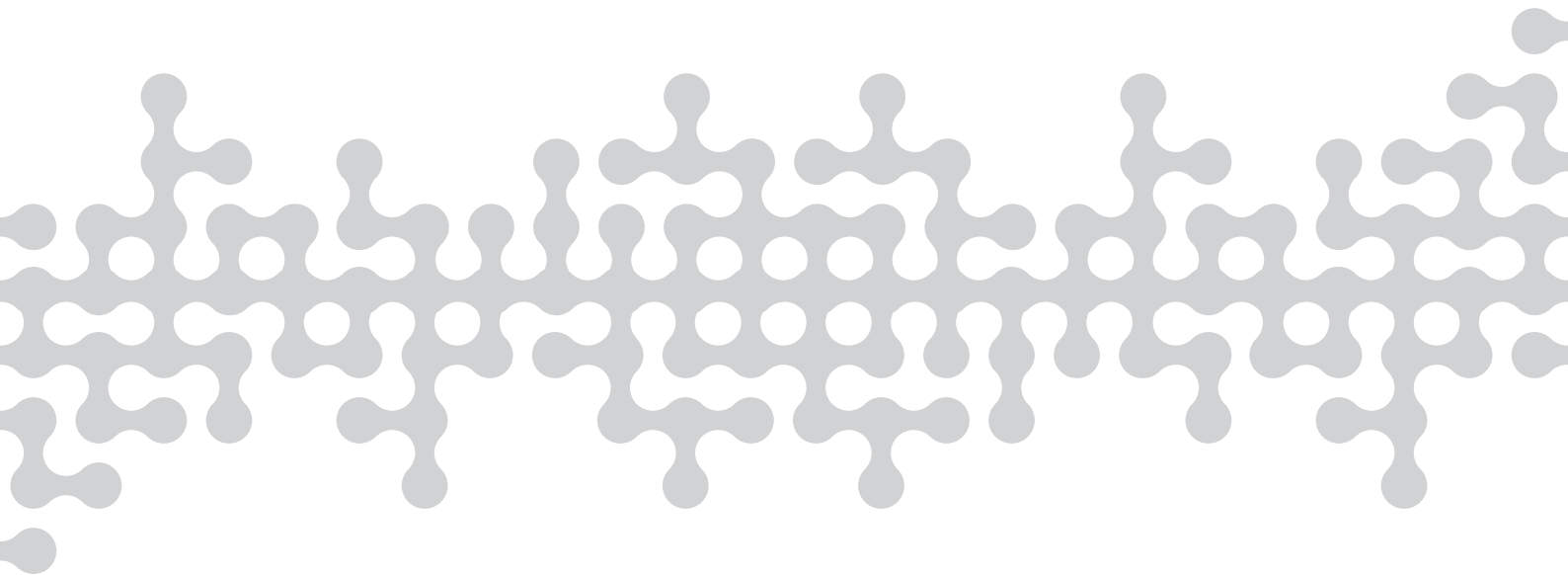
Décembre 2019 - Édition scientifique



Dépistage de la tuberculose bovine par le test interféron

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Décembre 2019 - Édition scientifique



Le directeur général

Maisons-Alfort, le 13 décembre 2019

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

relatif au recours au test de dosage de l'interféron gamma pour gérer des suspicions de tuberculose bovine faisant suite à des dépistages en élevage par intradermotuberculination

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

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

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

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

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie par la DGAL le 11 Mai 2017 par la Direction générale de l'alimentation (DGAL), d'une « demande d'avis relatif au recours au test de dosage de l'interféron gamma pour gérer des suspicions de tuberculose bovine faisant suite à des dépistages en élevage par intradermotuberculination ».

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

La France est reconnue indemne, au sens de la Directive 97/12/CE, de tuberculose bovine par l'Union Européenne (UE) depuis décembre 2000 (Décision CE/2001/26), c'est-à-dire que la proportion de troupeaux qualifiés « officiellement indemnes » en France est d'au moins 99,9 % au 31 décembre de chaque année, et la proportion de troupeaux infectés annuellement est inférieure à 0,1 % sur les six dernières années).

La prophylaxie de la tuberculose bovine en France repose, d'une part, sur le dépistage en élevage de l'infection chez les animaux vivants et d'autre part, sur la recherche de lésions évocatrices de tuberculose à l'abattoir. Le dépistage en élevage est effectué par une intradermotuberculination (IDT) qui peut être simple (IDS) ou comparative (IDC).

Dans le cadre de la qualification des troupeaux de bovins, une démarche d'interprétation et de traitement d'une suspicion issue du dépistage a été construite en se basant sur les principes de la Directive 64/432/CEE. Selon les termes de la note de service de la Direction générale de l'alimentation (DGAL) du 22/12/2016 (DGAL/SDSPA/2016-1001), l'interprétation d'une réaction non négative au test d'IDT peut :

- « Soit correspondre à un « animal positif », lorsque le contexte d'interprétation du dépistage est défavorable ou que le résultat du dépistage est nettement positif. Il s'agit alors d'une suspicion « forte » dont la gestion correspond aux dispositions réglementaires européennes les plus strictes. Lorsque le test réalisé en première intention est une IDC, un résultat positif est forcément associé à une suspicion forte ;
- Soit correspondre à un « animal à statut non déterminé », lorsque le contexte d'interprétation du dépistage est favorable (c'est-à-dire que l'infection est peu probable) et que le résultat est probablement lié à une réaction faussement positive. Il s'agit alors d'une suspicion « faible » ».

Qu'il s'agisse d'une suspicion « forte » ou « faible », l'élevage est mis sous Arrêté Préfectoral de Mise sous Surveillance (APMS). En cas de résultats faux positifs à l'IDT initiale et tant que la suspicion n'est pas levée, les conséquences de ces suspensions de qualification qui peuvent être répétées, sont principalement une décredibilisation et une perte d'acceptabilité de l'IDT auprès des vétérinaires, mais également de fortes contraintes économiques pour les éleveurs.

Afin d'améliorer cette situation, des échanges entre la DGAL et la Commission Européenne ont permis la mise en place à titre expérimental d'un protocole de diagnostic non autorisé à l'échelle européenne. L'objectif de ce protocole était de tester si le recontrôle des animaux à statut non déterminé, prévu par IDC six semaines après la lecture de l'IDT initiale, pouvait être remplacé par un test de dosage de l'interféron gamma (IFN γ) le jour de la lecture de l'IDT initiale. Le protocole expérimental a été conduit pendant les deux campagnes de prophylaxie 2013-2014 et 2014-2015 et une partie des données a fait l'objet d'un article publié en 2016 (Praud, Boireau et Dufour 2016).

Les avis de l'Anses (Anses 2012) et de l'EFSA (EFSA 2012) s'accordent sur le fait que le test IFN γ utilisé en série après une IDT, présente des avantages. Cependant, des études complémentaires sont recommandées afin de valider son utilisation. Face aux difficultés liées à la réalisation du test IDT sur le terrain et à l'interprétation des résultats, les autorités françaises souhaitent désormais faire reconnaître le test IFN γ afin de l'intégrer dans la réglementation européenne.

Dans ce contexte, l'Anses a été saisie par la DGAL le 11 Mai 2017, d'une « demande d'avis relatif au recours au test de dosage de l'interféron gamma pour gérer des suspicions de tuberculose bovine faisant suite à des dépistages en élevage par intradermotuberculination ». Les questions, telles que posées dans la saisine, sont les suivantes :

Question 1 : « Outre la valorisation par l'article publié qui répond à l'objectif principal du protocole, d'autres exploitations des données sont-elles envisageables pour étudier l'effet de défaut de sensibilité de l'interféron gamma réalisé le jour de la lecture par rapport à celui réalisé 6 semaines plus tard ? »

Question 2 : « Pouvez-vous comparer le risque de lever à tort la suspension de qualification suite d'une part à un résultat interféron gamma négatif suite à la lecture du dépistage initial et suite d'autre part à un contrôle IDC négatif réalisé 6 semaines plus tard ? Pouvez-vous décliner la réponse en fonction du type d'antigènes utilisés et des règles d'interprétation des résultats, en

particulier si seuls les antigènes spécifiques sont utilisés ? Est-ce que cette évaluation dépend du type d'IDT réalisée en première intention ? »

Question 3 : « Pouvez-vous évaluer la pertinence du recours à l'IDS comme test de dépistage IDT en première intention dans le contexte épidémiologique actuel ? Est-ce que la perspective de pouvoir investiguer les résultats non conclusifs par un test interféron gamma modifie-t-elle cette évaluation ? ».

En accord avec la DGAL, les questions de la saisine ont été reformulées de la manière suivante :

- Question 1 : Suite à un résultat non négatif en IDT à J₃, quel est le risque de perte de sensibilité de substituer l'IDC réalisée à J₄₂, par un test IFN γ à J₃, cette éventualité ayant notamment comme prérequis l'évaluation de la sensibilité du test IFN γ à l'échelle individuelle et collective ?
- Question 2 : i) Pouvez-vous comparer le risque de lever à tort la suspension de qualification suite d'une part à un résultat interféron gamma négatif suite à la lecture du dépistage initial et suite d'autre part à un contrôle IDC négatif réalisé six semaines plus tard ? ii) A partir de données de comparaison des tests IFN γ réalisés sur les mêmes échantillons avec des antigènes différents et de la comparaison avec des résultats bactériologiques, quels critères d'interprétation et quels antigènes seraient à adopter en fonction du contexte, selon qu'il s'agit d'un dépistage (suspicion faible ou forte) ou d'un assainissement par abattage partiel, afin de viser une sensibilité maximale? iii) Est-ce que cette évaluation dépend du type d'IDT réalisée en première intention ?

Il a été convenu avec la DGAL que la question 3 ne serait pas traitée par les experts, le gestionnaire disposant désormais d'éléments techniques pour prendre une décision.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

2.1. Organisation de l'expertise

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

Le traitement de la saisine relève du domaine de compétences du comité d'experts spécialisé « Santé et bien-être des animaux » (CES SABA). L'Anses a confié au groupe de travail « Interféron gamma » (GT IFN γ), rattaché au CES SABA, l'instruction de cette saisine.

Le GT IFN γ était constitué de cinq experts et les échanges se sont tenus en réunion de GT, à raison d'une réunion par mois de mai 2018 à septembre 2019.

Les travaux d'expertise du GT ont été soumis au CES SABA tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques au cours des réunions des 11 décembre 2018, 16 avril, 03 juillet et 17 septembre 2019.

Le rapport produit par le GT tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES. Les travaux du GT IFN γ ont été adoptés par le CES SABA le 08 octobre 2019.

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

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

2.2. Moyens mis en œuvre

2.2.1. Collecte des données

Afin de mener à bien les travaux d'expertise, le GT a pu avoir accès à des données de terrain recueillies au cours des campagnes de prophylaxie 2013-2014 et 2014-2015. Ces données ont été fournies par la DGAL, Bureau de la santé animale. L'analyse de cette base de données est détaillée dans la partie 3.3 du présent avis.

2.2.2. Audition des parties prenantes

Le GT IFN γ a auditionné le Bureau de la santé animale de la DGAL, en la personne de M. Fabrice Chevalier (Référént National Tuberculose Bovine), qui a apporté des précisions sur le système de gestion sanitaire de la tuberculose bovine en France ainsi que la situation épidémiologique en Côte-d'Or, Dordogne et d'autres départements français. Ces compléments d'information ont conduit les experts à reformuler, en accord avec le demandeur, les questions de la saisine telles que présentées dans la partie 1 « Contexte et objet de la saisine ».

Le Laboratoire national de référence (LNR) Tuberculose de l'Anses de Maisons-Alfort a été également auditionné en la personne de sa responsable Maria-Laura Boschioli, qui dispose d'une expertise scientifique concernant le test IFN γ .

2.2.3. Recherche bibliographique

Une recherche bibliographique a été réalisée dans les moteurs de recherche Scopus et Pubmed afin de recenser les connaissances scientifiques existantes sur l'utilisation des tests IDT et IFN γ pour le dépistage de la tuberculose bovine. La stratégie de recherche est présentée dans l'Annexe 2 du rapport associé au présent Avis.

2.2.4. Prise en compte de l'incertitude

Un recensement des principales sources d'incertitudes auxquelles l'expertise a été confrontée a été réalisé (partie 6 du rapport), en se basant sur la typologie et les recommandations proposées par le groupe de travail de l'Anses « Méthodologie en évaluation des risques » (GT MER).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES SABA ET DU GT IFN γ

Le CES SABA rappelle que le présent avis est associé à un rapport d'expertise collective qui développe l'ensemble de l'argumentaire des réponses aux questions posées par la DGAL.

3.1. Préambule

La prophylaxie de la tuberculose bovine en France repose, d'une part, sur le dépistage de l'infection chez les animaux vivants en élevage et, d'autre part, sur la recherche de lésions évocatrices de tuberculose à l'abattoir. Dans le contexte de la présente saisine, ce dernier volet ne sera évoqué que dans la mesure où il s'intègre dans le dispositif de confirmation d'une suspicion après utilisation des tests de l'IDT et/ou du test IFN γ .

3.1.1. Tests d'intradermotuberculation (IDT)

Le principe du dépistage chez les animaux en élevage, que ce soit par intradermotuberculation simple (IDS) ou comparative (IDC), repose sur la détection d'une réaction d'hypersensibilité retardée (ou hypersensibilité de type IV classification de Coombs) chez les bovins infectés.

L'IDS consiste en une injection dans le derme d'une dose de tuberculine bovine (PPD-B)¹ issue de *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). L'injection doit se faire dans l'encolure². L'instruction technique DGAL/SDSPA/2019-581 du 31/07/2019 précise que « la lecture doit se faire 72 h +/- 4 h après l'injection » et que « le respect de ce délai est très important ». La taille de la réaction inflammatoire (augmentation d'épaisseur du pli de peau) doit être mesurée à l'aide d'un cutimètre (cf. partie 3.1.1.1 du rapport).

L'IDC consiste à comparer la réaction présentée par l'animal vis-à-vis d'une injection de PPD-B, à celle présentée vis-à-vis d'une injection de tuberculine aviaire (PPD-A)³ pratiquée simultanément. La lecture doit être effectuée dans les heures qui suivent la 72^{ème} heure \pm 4 h, par mesure de l'épaisseur des plis de peau à chaque site d'injection. Un calcul des épaissements des plis de peau est ensuite réalisé (cf. partie 3.1.1.2 du rapport).

3.1.2. Test de dosage de l'interféron gamma (IFN γ)

Le test de dosage de l'IFN γ est un test *in vitro* à partir d'une prise de sang chez l'animal. Ce test, alternatif à la tuberculination, repose également sur la détection de la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Au laboratoire, ce test se déroule en deux étapes à savoir *i*) la stimulation des lymphocytes T producteurs. Le sang est mis en présence de différents antigènes mycobactériens (PPD-B, PPD-A et antigènes spécifiques ESAT-6⁴ et CFP-10⁵) et *ii*) le dosage de l'IFN γ produit est quantifié par un test ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

¹ Purified Protein Derivative Bovine

² L'injection dans l'épaule ou au niveau du pli sous caudal (PSC) est interdite en France

³ Purified Protein Derivative Avian

⁴ Early Secretory Antigenic Target, 6 kDa (kiloDalton)

⁵ Culture Filtrate Protein, 10 kDa

L'étape de stimulation est la plus difficile à standardiser d'autant plus qu'elle se fait dans différents laboratoires. À ce jour, au niveau international, aucune procédure n'existe pour la production et le contrôle de la qualité des antigènes utilisés pour les tests IFN γ . Un effort d'homogénéisation est mené en France, en particulier, au niveau de la réalisation du test ELISA. Cependant, les formules utilisées pour définir les seuils de positivité ne sont pas toujours les mêmes et devraient être harmonisées.

L'interprétation finale du test IFN γ résulte de la combinaison des résultats de trois ratios pour conclure sur la base de trois catégories (positif, négatif ou non conclusif, cf. Tableau 8 du rapport). Ces ratios sont calculés à partir des densités optiques (DO) obtenues par stimulation avec les PPD (PPD-B et PPD-A) et les antigènes recombinants ESAT-6/CFP-10 (Praud *et al.*, 2019 ; note de service DGAL/SDSPA/2014-864).

3.2. Evaluation de la sensibilité et de la spécificité des tests IDT et IFN γ à partir des données issues de la littérature

Afin d'avoir un ordre de grandeur des valeurs de sensibilité⁶ et de spécificité⁷ des tests IDT retrouvées dans la littérature, les experts ont analysé cinq travaux basés sur des études de méta-analyses : trois publications scientifiques, un rapport de l'EFSA de 2012 et un rapport de master (cf. partie 3.1.1.1.2 du rapport).

3.2.1. Sensibilité et spécificité des tests IDT

3.2.1.1. Sensibilité

Les tests IDS et IDC permettant le dépistage *in vivo* des animaux infectés, reposent sur la détection de la réponse immunitaire à médiation cellulaire, spécifique de *M. bovis*. L'IDS ne permet pas de distinguer la réaction vis-à-vis des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* de celle vis-à-vis des antigènes communs présents chez les mycobactéries atypiques, alors que l'IDC basée sur la comparaison du niveau d'immunisation des animaux vis à vis de *M. bovis* et de *M. avium*, est plus à même de détecter des réactions croisées avec des mycobactéries atypiques.

Les données de la bibliographie exploitées par les experts concordent sur le fait que la sensibilité de l'IDC est inférieure à celle de l'IDS. En effet, d'après la littérature analysée, la valeur médiane de la sensibilité de l'IDS varie entre 76,0 et 94,0 % alors que celle de l'IDC varie entre 49,0 % et 80,0 %.

Selon les experts, les variations de sensibilité de l'IDS sont probablement liées à des différences dans la réalisation et l'interprétation de ce test sur le terrain, ainsi qu'à des facteurs physiologiques chez les bovins pouvant conduire à des résultats faussement négatifs (contamination récente de l'animal, état anergique dit « post-tuberculeux », désensibilisation liée à la réalisation récente d'une première IDT ou toutes les causes d'immunodéficience).

⁶ La sensibilité est l'aptitude d'un test à fournir une réponse positive chez un individu infecté [Toma, B., B. Dufour, J. Bénet, M. Sanaa, A. Shaw and F. Moutou (2010). *Épidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures. Les biais*, Maisons-Alfort: AEEMA]

⁷ La spécificité est l'aptitude d'un test à fournir une réponse négative chez un individu indemne [Toma, B., B. Dufour, J. Bénet, M. Sanaa, A. Shaw and F. Moutou (2010). *Épidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures. Les biais*, Maisons-Alfort: AEEMA]

Les facteurs concourant aux résultats faussement négatifs pour l'IDS, peuvent également être invoqués dans le cas de l'IDC. Pour cette dernière, s'y ajoutent d'autres facteurs techniques et immunologiques liés à l'utilisation combinée de la PPD-A et de la PPD-B. Il faut également noter que la réalisation technique de l'IDC est plus contraignante que celle de l'IDS.

Un autre critère concourant à la variabilité des valeurs de sensibilités obtenues dans la littérature est la définition des populations infectées. En effet, les critères pour définir un animal infecté dans les publications exploitées par les experts n'étaient pas toujours les mêmes : certaines publications considèrent qu'un animal est infecté si le résultat des tests PCR (*polymerase chain reaction*) ou de la culture bactériologique est positif, alors que d'autres articles considèrent qu'un animal est infecté si les résultats sont positifs aux deux tests simultanément. De plus, il est maintenant acquis que la détection de lésions à l'abattoir ne peut pas être considérée comme le test de référence (« *gold standard* »). En effet, une proportion non négligeable d'animaux récemment infectés ne présente pas de lésion au moment de l'abattage (Bénet et Dufour 2014).

3.2.1.2. Spécificité

Les valeurs médianes de spécificité de l'IDS obtenues dans la littérature varient entre 91,0 % et 98,2 % selon les études.

En revanche, la comparaison de la réaction entre la PPD-B et la PPD-A permet d'augmenter la spécificité de l'IDC en comparaison avec l'IDS, avec des valeurs médianes pouvant atteindre 100 % selon certains auteurs.

Parmi les facteurs physiopathologiques pouvant conduire à des résultats faussement positifs pour l'IDS, les experts citent l'exposition à des mycobactéries atypiques, en particulier les mycobactéries du complexe MAC (*Mycobacterium avium intracellulare*), responsables de réactions croisées.

Un autre critère important concourant à la variabilité des valeurs de spécificité obtenues dans la littérature est la définition des populations de référence. En effet, la majorité des études sont des études de terrain, pour lesquelles les populations d'étude se composent d'animaux infectés ou suspects, et pour lesquelles la population indemne pouvant servir de référence pour faire les calculs n'est pas disponible. La définition des populations indemnes se fait donc par exclusion, les animaux étant déclarés indemnes dès lors qu'ils ne sont pas trouvés infectés avec les tests de référence. Or, comme précisé ci-dessus, les critères des auteurs, pour définir un animal infecté dans ces publications, sont variables d'une publication à une autre. Il demeure donc un certain niveau d'incertitude quant à l'absence réelle d'infection et donc quant aux chiffres de spécificité obtenus, probablement sous-évalués, pour les études ayant défini la population indemne par exclusion tout au moins.

Par ailleurs, il ressort des auditions menées par les experts que la réalisation et la lecture des IDT sur le terrain en France ne sont pas de qualité suffisante. Une mise en pratique rigoureuse des tests IDT est nécessaire sur le terrain, notamment la mesure initiale du pli de peau avant injection (J_0) et lors de la lecture de la réaction (J_3) à l'aide d'un cutimètre. Cette observation est corroborée par plusieurs travaux qui ont soulevé le problème du non-respect des bonnes pratiques de réalisation des IDT en Belgique et en France (Humblet *et al.* 2011) avec comme conséquences, des erreurs au niveau de l'interprétation des résultats et une diminution des valeurs de sensibilité et de spécificité des tests IDT. D'ailleurs, pour l'IDS, la très grande majorité des vétérinaires

sanitaires n'utilise pas de cutimètre pour évaluer l'inflammation : seule une inspection visuelle et éventuellement une palpation sont réalisées à ce stade (Boireau 2015).

3.2.2. Sensibilité et spécificité du test IFN γ

3.2.2.1. Sensibilité

Comme pour la définition de la sensibilité des IDT, les populations de référence « infectées » sont, dans la littérature, variables d'un article à un autre.

La majorité des données disponibles porte sur les tests utilisant les antigènes PPD. Il existe peu d'études utilisant simultanément les tests avec les antigènes PPD et les antigènes recombinants ESAT-6 et CFP-10.

Les données de la littérature (revues, méta-analyses et rapports) exploitées par les experts montrent que la valeur médiane de sensibilité du test IFN γ utilisant les PPD variait de 73,6 à 87,6 %. Cette sensibilité est équivalente à celle du test utilisant les antigènes ESAT-6 et CFP-10, dont la valeur médiane est comprise entre 78,0 et 83,9 % ainsi que celle du test IDS, dont la valeur médiane varie entre 76,0 et 94,0 %. Selon les experts, il est difficile de généraliser ces données et de les extrapoler au contexte d'utilisation du test IFN γ en France. Les deux principales raisons sont :

- les seuils de positivité, qui ne sont pas harmonisés et qui sont différents d'un pays à un autre ;
- les antigènes utilisés, sachant que la majorité des études utilisent les PPD-A et B ou les antigènes recombinants ESAT-6 et CFP-10, mais n'utilisent pas les quatre de façon combinée ;

En France, les travaux de Boireau⁸ ont montré que la sensibilité médiane du test IFN γ utilisant la combinaison PPD et ESAT-6/CFP-10 était de 93 % lorsque seuls les résultats positifs étaient pris en compte, et de 97 % si les résultats non conclusifs étaient inclus dans les résultats positifs (Boireau 2015).

3.2.2.2. Spécificité

Les données de la littérature analysées par les experts montrent que globalement la spécificité du test IFN γ utilisant les PPD est proche de celle de l'IDT, avec une valeur médiane variant de 87,1 à 97 % selon les publications. Par ailleurs, la spécificité du test utilisant les antigènes recombinants ESAT-6 et CFP-10 est meilleure que celle du test utilisant des PPD, mais elle reste plus faible que celle de l'IDC, selon les données fournies par la récente méta-analyse de Nuñez-García *et al.* (2018).

En France, l'étude de Praud *et al.* (2019) réalisée sur 1 825 bovins déclarés indemnes de tuberculose, montre que la spécificité du test IFN γ à J₃ utilisant la combinaison PPD et ESAT-6/CFP-10) est de 46,08 % si les résultats négatifs sont uniquement pris en compte, alors qu'elle

⁸ Les travaux de cette thèse vétérinaire ont porté sur des animaux issus de la base de données qui est présentée dans la partie 3.3 de cet avis. Ainsi, la population de référence était définie à partir des animaux ayant donné un résultat positif à la culture ou au test PCR : 29 animaux infectés ont été testés à l'IFN γ (PPD + ESAT-6/CFP-10). Pour la campagne 2013-2014, en Dordogne : utilisation des antigènes PPD + ESAT-6/CFP-10. En Côte-d'Or, utilisation des antigènes: PPD + ESAT-6.

est de 82,47 % si les résultats non conclusifs sont inclus dans les résultats négatifs⁹. Selon les experts, cette faible valeur de spécificité est à mettre en lien avec l'existence d'un biais dans la population suivie, puisque les animaux déclarés indemnes dans cette étude ont été sélectionnés sur la base d'un résultat non négatif à l'IDT initiale. Les auteurs n'ont pas présenté des résultats du test IFN γ à J₃ pour des animaux indemnes non sélectionnés sur le critère IDT J₀ non négative.

Finalement, les experts soulignent que les populations de référence supposées infectées (au sens réglementaire du terme) pour les essais de sensibilité et supposées indemnes (au sens réglementaire du terme) pour les essais de spécificité, ne sont pas caractérisées comme telles sans ambiguïté dans un certain nombre d'études. De plus, il est important de noter que les données de sensibilité ou de spécificité issues de la littérature sont dépendantes des kits et des antigènes utilisés. D'ailleurs, pour certains kits, il existe plusieurs versions disponibles qui n'ont pas forcément les mêmes caractéristiques. Enfin, il faut aussi souligner que les formules utilisées pour définir les seuils de positivité du test IFN γ ne sont pas toujours les mêmes d'une étude à une autre. Les données présentées sont donc des valeurs très générales et elles ne peuvent pas être utilisées comme valeurs de référence. Pour cela, il faudrait utiliser des données obtenues avec les kits, les antigènes et les formules appliquées en France.

Un effort d'homogénéisation est mené en France, en particulier au niveau de la réalisation du test ELISA. Selon les experts, ce travail doit être poursuivi à l'échelle nationale et européenne.

3.2.2.3. Facteurs impactant la réalisation du test IFN γ

En ce qui concerne l'impact possible de facteurs en lien avec la réalisation du test IFN γ , la plupart des auteurs souligne l'importance du facteur temps dans la préservation de l'intégrité des lymphocytes (acheminement de l'échantillon, délai entre la réception de l'échantillon et son traitement) et du facteur température (maintien de l'échantillon à température ambiante). S'y ajoutent tous les facteurs de laboratoire développés dans la partie 3.1.2.5 du rapport, qui influent sur la sensibilité et la spécificité du test.

Par ailleurs, les données bibliographiques relatives à l'impact d'une IDS au pli sous-caudal ou d'une IDC initiale sur la réponse au test IFN γ réalisé, ne permettent pas de tirer de conclusion(s) convergente(s). Ceci est notamment lié à la disparité des conditions d'étude. Certains auteurs préconisent notamment de réaliser davantage d'études en conditions naturelles ou proches des conditions du terrain.

3.3. Analyse des données IDT et IFN γ dans le cadre du protocole expérimental pour la période 2013-2015

3.3.1. Description de la base de données et mise à jour des seuils d'interprétation du test IFN γ

Les données transmises aux experts sous format d'un fichier Excel[®] correspondaient à 14 270 bovins provenant de 1 395 élevages, pour les deux campagnes de prophylaxie 2013-2014 et

⁹ Il s'agit dans ce cas d'une spécificité apparente (cf. infra, partie 3.4 de l'avis)

2014-2015. Ces données ont été recueillies sur une période allant de février 2013 à décembre 2015, pour 11 départements¹⁰.

La base de données comportait les résultats des tests IDT (IDS ou IDC) et des tests IFN γ . Concernant les tests réalisés au premier contrôle :

- le résultat de l'IDT initiale ou IDT J₀ désigne l'IDT réalisée à J₀ et lue à J₃ ;
- le résultat IFN γ J₃ désigne le test IFN γ réalisé en série le jour de la lecture (J₃) de l'IDT initiale.

Concernant les tests réalisés au deuxième contrôle, les délais de réalisation des tests IDT, tels que renseignés dans la base de données, pouvaient varier entre 35 et 68 jours. Les tests IDT et IFN γ seront intitulés, dans la suite de l'avis, respectivement « IDT J₄₂ » et « IFN γ J₄₂ ».

Les animaux de la base de données étaient répartis en trois groupes :

- « Protocole » : il s'agit d'animaux testés en prophylaxie et qui ont intégré le protocole expérimental suite à l'obtention d'un résultat non négatif à l'IDT à J₀ ;
- « Suivi renforcé » (SR) : cette dénomination est propre au département de la Dordogne¹¹ et correspond aux animaux appartenant à des élevages en lien épidémiologique avec un foyer de tuberculose, où les bovins pouvaient avoir des contacts fréquents sur des parcelles mitoyennes ;
- « Issu » : il s'agit des animaux issus de foyers en assainissement par abattage partiel progressif.

Afin de pouvoir analyser les résultats, un important travail de « nettoyage »¹² a été effectué au niveau de la base de données. De plus, certaines données incomplètes et relatives en particulier au type d'IDT, ont été renseignées ou corrigées après échange avec la DGAL. Concernant l'interprétation des résultats du test IFN γ , elle a été faite sur la base des nouveaux seuils établis en 2014 (Note de service DGAL/SDSPA/2014-864).

Le critère d'entrée des animaux « protocole » et des animaux « SR » n'étant pas le même, les calculs de sensibilité et de spécificité pour les tests IDT et IFN γ ont été faits séparément pour chaque groupe. Les animaux provenant du groupe « Issu » n'ont pas été exploités, seuls deux animaux ayant été enregistrés dans la base de données pour cette catégorie.

3.3.2. Sélection des individus infectés et « indemnes »

La base de données a permis d'identifier 114 animaux infectés provenant de 75 élevages, qui ont fourni des résultats positifs pour *M. bovis* en culture et/ou par PCR sur lésions et/ou nœuds lymphatiques. Ces animaux reconnus infectés selon la réglementation, ont servi de population de référence « infectée » pour l'estimation des valeurs de sensibilité à partir des données de terrain.

La base de données a permis également d'identifier au départ 3 411 animaux reconnus indemnes selon la réglementation, c'est à dire provenant d'élevages officiellement indemnes. Ces animaux, qui avaient donc tous fourni un résultat négatif en IDT ont servi de population de référence pour l'estimation des valeurs de spécificité à partir des données de terrain. Les experts soulignent toutefois que la majorité de ces animaux proviennent de départements à risque, que la valeur

¹⁰ Ardennes (08), Ariège (09), Charente (16), Côte-d'Or (21), Dordogne (24), Gers (32), Lot-et-Garonne (47), Pyrénées-Atlantiques (64), Hautes-Pyrénées (65), Tarn (81) et Haute-Vienne (87)

¹¹ Ainsi qu'au département de la Charente. Cependant la base de données ne comportait pas d'animaux « SR » en provenance de la Charente

¹² Suppression des doublons, des données erronées ou incomplètes et correction de dates

prédictive négative (VPN)¹³ des tests IDT n'est pas de 100 % dans un tel contexte, avec des tests dont la sensibilité n'est pas de 100 %. Dans la suite du rapport, sur la base des informations disponibles, les experts ont considéré qu'*a minima*, il convenait de s'assurer que les élevages inclus dans la catégorie des élevages indemnes dans la base de données n'avaient pas été déclarés infectés ultérieurement, soit jusqu'à 2018. Il s'est avéré que deux élevages ont été reconnus infectés entre 2015 et 2018, ils ont donc été exclus de la base de données des élevages indemnes.

3.4. Evaluation de la sensibilité et de la spécificité apparentes des tests IDT et IFN γ à partir de la base de données

En préambule, il convient de préciser que la sensibilité déterminée ci-après ne représente pas la sensibilité intrinsèque des tests. En effet, les experts n'ont eu accès qu'à un effectif de 114 animaux infectés. En outre, pour les tests IDT, la sensibilité intègre l'ensemble des facteurs de terrain (modalités de réalisation et effet opérateur notamment) pouvant influencer sur les résultats du test. Pour le test IFN γ , les antigènes utilisés, les seuils utilisés et les modalités d'interprétation peuvent aussi avoir une influence sur les résultats.

Les experts précisent également que la spécificité déterminée ci-après ne représente pas non plus la spécificité intrinsèque des tests. Comme pour la sensibilité, ce terme a été employé avec une acception large intégrant des paramètres de terrain. En outre, la spécificité individuelle des tests IDT et IFN γ a été déterminée à partir des données issues des animaux « indemnes » pour les animaux « protocole » et « SR ». Ces résultats doivent donc être considérés avec prudence, compte tenu des incertitudes sur la réalité du statut indemne des animaux pour des raisons techniques et épidémiologiques, particulièrement dans les zones à risque.

Etant donné que l'interprétation de la spécificité des tests varie en fonction du contexte épidémiologique, le GT a décidé de distinguer les résultats de Dordogne et Côte-d'Or et ceux des autres départements¹⁴. Concernant les résultats douteux¹⁵ de l'IDT et ceux non conclusifs pour l'IFN γ , ils ont été inclus dans les résultats positifs pour la Dordogne et la Côte-d'Or, et dans les résultats négatifs pour les autres départements.

Dans la suite de cet avis, et pour toutes les raisons énoncées ci-dessus, les termes sensibilité et spécificité seront à comprendre au sens de sensibilité et spécificité apparentes.

¹³ La valeur prédictive d'un résultat négatif se définit comme la probabilité qu'une réponse négative à un test de dépistage corresponde bien à un individu indemne. Elle peut être estimée par la proportion de vrais négatifs parmi l'ensemble des réponses négatives fournies pour un test de dépistage [Toma, B., B. Dufour, J. Bénet, M. Sanaa, A. Shaw and F. Moutou (2010). Épidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures. Les biais, Maisons-Alfort: AEEMA]

¹⁴ Ardennes (08), Ariège (09), Charente (16), Gers (32), Lot-et-Garonne (47), Pyrénées-Atlantiques (64), Hautes-Pyrénées (65), Tarn (81) et Haute-Vienne (87)

¹⁵ Les résultats douteux en IDC incluent les résultats « petits douteux » et « grands douteux » (cf. partie 3.1.1.2.1 du rapport)

3.4.1. Sensibilité et spécificité apparentes des tests IDT

3.4.1.1. Sensibilité

L'exploitation de la littérature (articles de méta-analyses et rapports) ainsi que l'analyse de la base de données par les experts montre qu'il existe, dans la majorité des cas, une grande différence entre les valeurs de sensibilité des tests IDT relevées dans la littérature et celles obtenues sur le terrain en France.

➤ Sensibilité individuelle

Concernant la sensibilité individuelle pour les animaux « protocole », il n'a pas été possible de la calculer¹⁶ pour les tests IDT à J_0 , le critère d'entrée étant un résultat IDT à J_0 non négatif. Pour l'IDC, la sensibilité individuelle calculée à J_{42} est de 38,9 %.

Pour les animaux « SR », la sensibilité individuelle du test IDS à J_0 est de 30,6 % et celle du test IDC à J_{42} de 50 %. Selon les experts :

- il est surprenant que ces valeurs soient aussi basses puisque ces données ont été obtenues dans le cadre d'un suivi renforcé : les biais liés à une mauvaise réalisation ou à une mauvaise lecture du test IDT auraient dû être limités ;
- la meilleure sensibilité de l'IDC à J_{42} dans cette population « SR » pourrait s'expliquer par le fait que certains animaux récemment infectés, n'auraient pu devenir réagissants qu'après l'IDT initiale, ce qui aurait permis de les détecter à J_{42} en IDC. Cependant, cette hypothèse ne peut pas être validée compte tenu du faible effectif d'animaux de la base de données. Un effet opérateur pourrait également être intervenu entre les deux IDT, dans l'hypothèse où les opérateurs étaient différents à J_0 et J_{42} . Il n'est pas possible d'exclure non plus l'hypothèse qu'un plus grand soin ait été apporté à la réalisation du 2^{ème} test (IDC J_{42}), du fait du statut suspect des animaux concernés, qui plus est dans un contexte épidémiologique défavorable (animaux « SR »). En outre, les experts n'excluent pas des erreurs de saisie dans la base de données.

➤ Sensibilité collective

Concernant la sensibilité collective, il ressort de la base de données que 78 % des élevages « protocole » et 50 % des élevages « SR » n'avaient qu'un seul animal reconnu comme infecté. Ces résultats sont en accord avec des données françaises antérieures selon lesquelles, dans 66 % des élevages déclarés infectés, seuls un à trois animaux avaient été trouvés réagissants à l'IDT.

¹⁶ Calcul de la sensibilité : nombre d'animaux ayant fourni un résultat positif au test / nombre total d'animaux infectés. Pour les animaux « protocole », seuls les bovins ayant donné un résultat positif à l'IDT à J_0 étaient inclus dans la base de données. Il n'est donc pas possible de calculer une sensibilité (elle serait forcément de 100 % mais pas du tout le reflet de la réalité).

3.4.1.2. Spécificité

➤ Spécificité individuelle

Concernant la spécificité individuelle des animaux « protocole », dans la mesure où les animaux ont été sélectionnés sur la base d'un résultat non négatif au test IDT initial, la spécificité de ce test à J₀ ne peut être calculée¹⁷. Quant à la spécificité du test IDT à J₄₂, les valeurs obtenues en Dordogne et en Côte-d'Or (88,5 %) sont équivalentes à celles obtenues dans les autres départements (82,7 %).

Concernant la spécificité individuelle des animaux « SR » tous issus de la Dordogne, la spécificité du test IDC J₄₂ est de 93,9 %, sachant que les résultats douteux ont été classés comme positifs.

➤ Spécificité collective

La spécificité collective n'a pas été calculée pour les animaux « protocole » dans la mesure où les données analysées par les experts ne sont pas représentatives de la population générale mais uniquement des animaux ayant fourni un résultat non négatif à l'IDT J₀.

La spécificité collective n'a pas été calculée non plus pour les animaux « SR », étant donné qu'il s'agit d'animaux appartenant à des élevages à risque élevé d'être infectés et qui, outre le fait que l'échantillonnage est faible quantitativement, n'est surtout pas représentatif d'une population d'animaux indemnes.

3.4.2. Sensibilité et spécificité apparentes du test IFN γ

3.4.2.1. Sensibilité

Il ressort de l'analyse de la base de données que les valeurs de sensibilité individuelle du test IFN γ se situent dans le même ordre de grandeur que celles retrouvées dans la littérature.

➤ Sensibilité individuelle

La sensibilité individuelle du test IFN γ à J₃ pour les animaux « protocole » est de 93,5 % si seuls les résultats positifs sont pris en compte, ou de 97,4 % si les résultats non conclusifs sont inclus dans les résultats positifs. Il convient de souligner que ces animaux ont été initialement sélectionnés sur la base d'une IDT initiale non négative, ce qui tend probablement à sous-estimer la sensibilité de l'IFN γ , certains animaux infectés avec un résultat IDT négatif pouvant présenter un résultat positif au test IFN γ à J₃. Inversement, cette valeur pourrait traduire une surestimation, dans la mesure où la base de données ne donne pas accès aux bovins ayant fourni une réponse initiale négative en IDT et qui auraient fourni une réponse également négative au test IFN γ à J₃. Concernant les tests réalisés à J₄₂, la sensibilité de l'IFN γ est de 80,5 % si uniquement les résultats positifs sont pris en compte, ou de 95,1 % si les résultats non conclusifs sont inclus dans les résultats positifs.

¹⁷ Calcul de la spécificité : nombre d'animaux ayant fourni un résultat négatif au test / nombre total d'animaux indemnes.

Pour les animaux en suivi renforcé (« SR »), la sensibilité individuelle du test IFN γ à J₃ est de 75,0 % si uniquement les résultats positifs sont pris en compte, ou de 86,1 % si les résultats non conclusifs sont inclus dans les résultats positifs. Concernant les tests réalisés à J₄₂, la sensibilité du test IFN γ est de 89,7 % si uniquement les résultats positifs sont pris en compte, ou de 96,5 % si les résultats non conclusifs sont inclus dans les résultats positifs. Les experts soulignent que dans tous les cas, la sensibilité du test IFN γ est supérieure à celle du test IDT.

➤ Sensibilité collective

Concernant la sensibilité collective du test IFN γ réalisé à J₃ pour les animaux « protocole » et « SR », elle est supérieure à celle du test IDC réalisé à J₄₂, pour les campagnes de prophylaxie 2013-2014 et 2014-2015.

3.4.2.2. Spécificité

➤ Spécificité individuelle

Concernant la spécificité individuelle des animaux « protocole » du test IFN γ à J₃, les valeurs obtenues en Dordogne et en Côte-d'Or (43,9 %) sont équivalentes à celles obtenues dans les autres départements (45,4 %). Selon les experts, ces faibles valeurs de spécificité seraient dues à la sélection des animaux, faite précisément en raison d'un résultat non négatif à l'IDT initiale.

Cependant, une amélioration de la spécificité du test IFN γ réalisé à J₄₂ est constatée par rapport au test réalisé à J₃, avec des valeurs obtenues en Dordogne et en Côte-d'Or (60,6 %) comparables à celles obtenues dans les autres départements (64,4 %).

Pour les animaux « SR » (Dordogne), la spécificité individuelle du test IFN γ à J₃ apparaît comme particulièrement faible (22,1 %). Cela n'est qu'en partie imputable au critère d'inclusion des bovins (réaction non négative au test IDT à J₀) qui a pris en compte le fait que dans le protocole national, le test IFN γ à J₃ est utilisé en série avec le test IDT. En effet, la spécificité reste faible lorsqu'on inclut l'ensemble des animaux « SR », qu'ils aient fourni une réponse positive ou négative en IDT à J₀. Le protocole national utilisé pour le dépistage est de nature à sur-sélectionner les animaux susceptibles de fournir une réponse positive au test IFN γ , notamment une réponse faussement positive. Une autre explication pourrait être qu'il s'agit d'animaux authentiquement infectés mais non détectés comme tels *in fine*. Il convient par ailleurs de relever que la taille de l'effectif est limitée. Les experts soulignent en outre les difficultés d'analyse générées par la qualité de la base de données. De ce fait, les experts ne peuvent se prononcer quant aux causes sous-jacentes à l'amélioration significative de la spécificité à J₄₂ du test IFN γ par rapport à celle observée à J₃, tout en relevant la faible spécificité du test IFN γ à J₄₂ comparée à celle de l'IDC J₄₂ et concernant globalement la très faible concordance observée entre les résultats des tests issus de la base de données.

➤ Spécificité collective

Concernant la spécificité collective du test IFN γ pour les animaux « protocole » et « SR », le test IFN γ n'est pas utilisé en première intention, mais seulement sur les animaux ayant présenté une réponse non négative en IDT à J₀. Son usage est donc limité à un contexte particulier. Ce test n'est donc pas utilisé comme un test collectif et n'est ainsi pas susceptible de fournir des réponses

faussetment positives accrues par le nombre d'animaux testés à une telle échelle et ce, d'autant plus que le test IFN γ n'est autorisé à J₃ qu'en cas de suspicion faible.

3.4 Conclusions : réponses aux questions de la saisine

Afin de répondre aux questions de la saisine, les experts se sont basés sur l'argumentaire développé ci-dessus qui porte sur l'analyse des valeurs de sensibilité et de spécificité des tests IDT et IFN γ à partir de la littérature, ainsi que celles issues de la base de données.

- *Question 1* : Suite à un résultat non négatif en IDT à J₃, quel est le risque de perte de sensibilité si l'on substitue l'IDC réalisée à J₄₂, par un test IFN γ à J₃ ? Cette éventualité ayant notamment comme prérequis l'évaluation de la sensibilité du test IFN γ à l'échelle individuelle et collective.

En se basant sur les résultats issus de l'analyse de la base de données, les experts concluent que la substitution du test IDC réalisé à J₄₂ par un test IFN γ réalisé à J₃ combinant les antigènes PPD et ESAT-6/CFP-10, ne semble pas induire un risque de perte de sensibilité au niveau individuel et au niveau collectif. Les experts rappellent à ce propos, que la réponse IFN γ qu'aurait fournie certains des animaux « protocole » non réagissants en IDT à J₀ s'ils avaient été soumis à ce test, ne peut être connue. Or, si ces animaux non réagissants à l'IDT à J₀ avaient été soumis au test IFN γ à J₃, certains auraient pu fournir un résultat positif et s'avérer infectés *in fine*. Il est donc probable que la sensibilité individuelle et collective du test IFN γ effectuée à partir de la base de données soit sous-estimée.

- *Question 2i* : Pouvez-vous comparer le risque de lever à tort la suspension de qualification suite d'une part à un résultat IFN γ négatif suite à la lecture du dépistage initial et suite d'autre part à un contrôle IDC négatif réalisé 6 semaines plus tard ?

À partir des résultats de l'analyse de la base de données, le risque de lever à tort la suspension de qualification suite à un résultat IFN γ négatif suite à un dépistage initial en IDT non négatif, paraît moins élevé par rapport à celui associé à un résultat négatif à une IDC réalisée six semaines après l'IDT initiale. Il faut noter que compte tenu du faible nombre d'animaux analysés, il n'est pas possible de quantifier ce risque. A partir de l'analyse de la base de données et compte tenu des incertitudes, les experts considèrent que l'utilisation du test IFN γ à J₃ pourrait cependant améliorer la sensibilité du dispositif.

- *Question 2ij* : A partir de données de comparaison des tests IFN γ réalisés sur les mêmes échantillons avec des antigènes différents et de la comparaison avec des résultats bactériologiques, quels critères d'interprétation et quels antigènes seraient à adopter en fonction du contexte, selon qu'il s'agit d'un dépistage (suspicion faible ou forte) ou d'un assainissement par abattage partiel, afin de viser une sensibilité maximale ?

L'analyse de la bibliographie et de la base de données n'a pas permis aux experts de recommander des antigènes autres que ESAT-6 et CFP-10, en plus des PPD. Les experts soulignent que l'utilisation combinée des PPD et d'ESAT-6/CFP-10 est pertinente. La combinaison

des antigènes (PPD + ESAT-6/CFP-10) permet, comme déjà signalé par l'étude de Faye *et al.* (2011) en France, d'adapter le test IFN γ en fonction des contextes épidémiologiques. Les experts soulignent l'importance de la prise en compte du contexte épidémiologique (contexte défavorable ou favorable), compte tenu du nombre important des résultats non conclusifs, et du fait que la majorité des animaux de la base de données proviennent de zones à risque. Il apparaît donc nécessaire de statuer sur le devenir de cette catégorie d'animaux ayant obtenu des résultats non conclusifs. Pour ce faire, mais aussi plus largement, pour poursuivre l'utilisation optimale du test IFN γ dans le processus national de dépistage, il conviendrait d'actualiser les seuils de positivité d'ESAT-6/CFP-10 seul et des PPD seuls, et de réévaluer l'interprétation des résultats des combinaisons, en fonction du contexte épidémiologique. Ce travail nécessite cependant des études complémentaires.

- Question 2iii : *Est-ce que cette évaluation dépend du type d'IDT réalisée en première intention ?*

Aucune donnée disponible ni à partir de la base de données ni à partir de la littérature, n'a permis aux experts de comparer la sensibilité de la combinaison IDS J₀ / IFN γ J₃ versus celle de la combinaison IDC J₀ / IFN γ J₃ (tests en série ou en parallèle).

Par ailleurs, suite à l'analyse de la bibliographie actuellement disponible, il a été difficile de conclure à l'effet d'une tuberculination initiale préalable (IDC ou IDS) sur la réponse au test à l'IFN γ , *a posteriori*, notamment dans des conditions d'infection naturelle. Ceci est imputable à la fois au faible nombre d'études et à la disparité des approches (même si une étude récente a utilisé à la fois des bovins infectés naturellement et expérimentalement). Nombre d'auteurs préconisent, dans leur conclusion, la réalisation d'études supplémentaires en conditions naturelles (d'autant plus que la majorité des études expérimentales utilisent de fortes doses de *M. bovis*, qui ne sont pas celles de la majorité des infections naturelles). Ces préconisations visent en particulier les bovins présentant une faible réponse IFN γ et les bovins non infectés. Pour les tests utilisant les PPD, certains auteurs insistent également sur la nécessité de prendre en compte le possible impact de l'infection des bovins par des mycobactéries de l'environnement sur les réponses IFN γ , les tests basés sur certains cocktails peptidiques comme ESAT-6/CFP-10 et Rv3615c ne présentant pas de tels inconvénients.

3.5 Recommandations

Suite à cette analyse, plusieurs recommandations sont formulées par les experts, des recommandations d'études et de recherches mais également des recommandations plus axées sur la surveillance de la tuberculose en France et les tests de dépistage (les recommandations listées dans les paragraphes ci-dessous ne sont pas classées par ordre d'importance) :

- Compte tenu du nombre important des résultats non conclusifs observés pour le test IFN γ , tel qu'il est standardisé en France aujourd'hui, il est nécessaire de statuer sur le devenir de cette catégorie d'animaux. Pour cela les experts recommandent d'adapter le mode d'interprétation des résultats du test IFN γ en fonction du contexte épidémiologique, comme préconisé par les travaux de Faye *et al.* (2011) :

- ✓ en « contexte défavorable » (élevages situés en zone à risque, dans une zone présentant une augmentation significative de l'incidence, ou élevages présentant d'autres facteurs de risque, par exemple des élevages en lien épidémiologique avec un foyer), la positivité d'une seule des deux stimulations (soit PPD, soit ESAT-6/CFP-10) devrait être prise en compte pour considérer un résultat comme positif ;
- ✓ dans les autres situations, en « contexte favorable », c'est la positivité des deux stimulations (PPD et ESAT-6/CFP-10) qui serait requise pour considérer un test comme positif.

Nonobstant ces critères d'interprétation, l'accumulation de données devrait permettre de réévaluer les seuils de positivité des tests et par voie de conséquence, limiter la proportion de résultats non conclusifs. Dans ce cadre, les experts recommandent de mener une évaluation fine du contexte, incluant la réalisation et la documentation des enquêtes épidémiologiques.

- Les experts soulignent également qu'un important travail d'harmonisation est nécessaire pour le test IFN γ . Ce travail doit être poursuivi en France et à l'échelle européenne. Alors que le manuel de l'OIE décrit les procédures de production et de contrôle de la qualité des tuberculines, à ce jour, au niveau international, aucune procédure n'existe pour les antigènes utilisés pour les tests IFN γ . De même la validation des kits ELISA utilisés pour le dosage de l'IFN γ ne fait pas l'objet de procédure standardisée. Les méthodes sont également fort disparates et devront être harmonisées ;
- En matière d'études et recherches, les experts soulignent l'importance de mettre en place des études épidémiologiques rigoureuses afin de collecter des données de terrain de qualité, et de les analyser de manière approfondie pour mieux caractériser les performances des tests disponibles. Ceci permettra de mieux appréhender l'utilisation potentielle de ces tests dans le dispositif de décision sanitaire, en fonction des différents contextes épidémiologiques, particulièrement au sein des zones où la tuberculose bovine est la plus présente. Il conviendrait non seulement d'exploiter les données issues du dépistage utilisant le protocole national (tests en série), mais aussi celles issues de l'assainissement des troupeaux reconnus infectés par abattage partiel progressif, afin de disposer des données fournies par l'utilisation de plusieurs tests en parallèle. Dans ce contexte, un effort particulier pourrait être fourni en testant (par PCR et/ou culture) un échantillon d'animaux ayant fourni un résultat positif ou négatif en IDT et IFN γ , afin d'évaluer plus finement sur le terrain, dans un contexte d'infection avérée, les performances respectives et conjointes de ces tests. Une telle étude pourrait par ailleurs contribuer à anticiper la question de la pertinence de l'utilisation d'un test en parallèle dès le dépistage dans les situations les plus à risque. Inversement, des essais d'estimation de la spécificité des tests IDT et IFN γ et de leur combinaison devraient être réalisés dans des zones reconnues indemnes depuis longtemps en France ;
- Les experts insistent, à cet égard, sur la nécessité de permettre à la plateforme ESA (Epidémiosurveillance en Santé Animale) un accès plus aisé aux données de la base sanitaire (Sigal/Resytal). Des études *ad hoc* pourraient ainsi être développées, associant les différentes structures en charge de la surveillance épidémiologique, afin d'exploiter ces données au mieux et d'estimer plus finement les caractéristiques des tests de dépistage. Des équipes de recherche pourraient également être associées au pilotage de ces projets.

Ces études permettraient également d'avoir un suivi en temps réel de la situation épidémiologique et de répondre à certaines questions soulevées dans l'analyse présentée dans le rapport associé au présent Avis ;

- Les experts préconisent également l'application de toutes mesures visant à améliorer la mise en œuvre des tests de dépistage de la tuberculose sur le terrain. Une sensibilisation de tous les acteurs de terrain pour la bonne réalisation des tests IDT et IFN γ et le respect de la conduite à tenir en cas d'observation d'un résultat non négatif, sont à rappeler et à encourager ;
- Enfin, les experts s'accordent à dire que même si les données de la littérature exploitées donnent des indications sur les caractéristiques des tests de dépistage de la tuberculose bovine, seules des données fiables issues des campagnes de dépistage en France permettront de définir des valeurs de sensibilité et de spécificité des tests utilisés dans le contexte épidémiologique français.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions et recommandations du CES SABA relatives au test de dosage de l'interféron gamma pour gérer des suspicions de tuberculose bovine suite à des dépistages en élevage par intradermotuberculation.

En termes de diagnostic, l'Anses rappelle que l'absence de test de référence ou *gold standard* constitue un frein majeur pour la caractérisation de la tuberculose bovine. A ce titre, l'Anses rappelle qu'un test utilisant une tuberculine synthétique est en cours d'étude par le LNR.

L'Anses souligne que des données issues des campagnes de prophylaxie étaient nécessaires pour répondre aux questions de la saisine. A cet effet, l'Anses insiste sur l'importance d'harmoniser et de standardiser les systèmes de recueil et d'enregistrement des données de surveillance de la tuberculose bovine dans les différents départements, afin de disposer du plus grand nombre de données exploitables et de qualité.

Pour conclure, l'Anses rappelle que les dispositions qui permettent d'améliorer la sensibilité des tests de dépistage en particulier le dosage de l'IFN γ sont bénéfiques pour l'efficacité du dispositif de surveillance national. A cet égard, l'Anses insiste sur la nécessité de permettre à l'Agence un accès facilité aux données de la base sanitaire (Sigal/Resytal), en cas de traitement de saisines ou d'AST, afin de les exploiter au mieux et d'estimer plus finement les caractéristiques des tests de dépistage.

Dr. Roger Genet

MOTS-CLES

Tuberculose bovine, *Mycobacterium bovis*, dépistage, intradermotuberculation, intradermotuberculation simple, intradermotuberculation comparative, test en série, test interféron gamma, seuil, sensibilité, spécificité.

Bovine tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, screening, cervical skin tests, simple intradermal tuberculin, intradermal cervical comparative test, serial testing, interferon gamma test, cut-off, sensitivity, specificity.



Dépistage de la tuberculose bovine par le test interféron gamma

Saisine 2017-SA-0121

Saisines liées 2012-SA-0011 et 2018-SA-0186

RAPPORT d'expertise collective

GT « Interféron gamma »

CES « Santé et bien-être des animaux »

Octobre 2019

Mots clés

Tuberculose bovine, *Mycobacterium bovis*, dépistage, intradermotuberculation, intradermotuberculation simple, intradermotuberculation comparative, test en série, test interféron gamma, seuil, sensibilité, spécificité.

Bovine tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, screening, cervical skin tests, simple intradermal tuberculin, intradermal cervical comparative test, serial testing, interferon gamma test, cut-off, sensitivity, specificity.

Présentation des intervenants

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

GROUPE DE TRAVAIL

Présidente

Mme Nadia HADDAD – Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort - Infectiologie, maladies réglementées, zoonoses.

Membres

Mme Séverine BOULLIER – Enseignant-chercheur, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - Immunologie, vaccinologie, infections bactériennes.

M. Jordi CASAL – Universitat Autònoma de Barcelona (ES) - Zoonose, épidémiologie quantitative, maladies animales exotiques, analyse quantitative des risques.

M. David FRETIN – Chef de service de bactériologie vétérinaire. SCIENSANO (B) - Bactériologie, zoonoses, diagnostic de laboratoire, LNR tuberculose en Belgique.

M. Bruno GARIN-BASTUJI – Conseiller scientifique, Anses – Maladies animales, bactériologie, tuberculose.

COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉS

Les travaux, objets du présent rapport ont été suivis et adoptés par le CES « Santé et Bien-être de animaux » SABA le 08 octobre 2019 :

Président

M. Gilles MEYER – Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - Virologie, immunologie, vaccinologie, maladies des ruminants.

Membres

Mme Catherine BELLOC – Professeur, Oniris - Ecole Vétérinaire de Nantes - Infectiologie, approche intégrée de la santé animale, maladies des monogastriques.

M. Stéphane BERTAGNOLI – Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - Virologie, immunologie, vaccination, maladies des lagomorphes.

M. Alain BOISSY – Directeur de Recherche INRA Clermont-Ferrand – Theix - Bien-être animal.

M. Henri-Jean BOULOUIS – Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort - Bactériologie, diagnostic de laboratoire, immunologie, vaccinologie.

M. Eric COLLIN – Vétérinaire libéral - médecine vétérinaire, médicament vétérinaire, maladies vectorielles, maladies à prion, épidémiologie, maladies des ruminants.

M. Jean-Claude DESFONTIS – Professeur, Oniris - Ecole Vétérinaire de Nantes – Physiologie animale, bien-être animal, médicament vétérinaire.

Mme Maria-Eleni FILIPPITZI – Vétérinaire épidémiologiste, SCIENSANO (B) – épidémiologie quantitative, évaluation de risque.

M. David FRETIN – Chef de service de bactériologie vétérinaire. SCIENSANO (B) - Bactériologie, zoonoses, diagnostic de laboratoire, LNR tuberculose en Belgique.

Mme Emmanuelle GILOT-FROMONT – Professeur, VetAgro Sup – Campus vétérinaire de Lyon – Epidémiologie quantitative, évaluation de risque, interface faune sauvage-animaux domestiques, maladies réglementées.

M. Etienne GIRAUD – Chargé de recherche, INRA Toulouse – Bactériologie, antibiorésistance, maladies des poissons.

M. Lionel GRISOT – Vétérinaire libéral - Médecine vétérinaire, médicament vétérinaire, maladies des ruminants.

Mme Nadia HADDAD – Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort - Infectiologie, maladies réglementées, zoonoses.

Mme Viviane HENAU – Cheffe d'Unité Adjointe, Unité Epidémiologie et appui à la surveillance, Anses Lyon – Epidémiologie quantitative, évaluation de risque.

Mme Elsa JOURDAIN – Chargée de recherche, INRA Clermont-Ferrand - Theix - Zoonoses, épidémiologie, interface faune sauvage-animaux domestiques.

Mme Sophie LE BOUQUIN - LE NEVEU – Cheffe d'Unité Adjointe, Unité Epidémiologie, Santé et Bien-Être, Anses Ploufragan-Plouzané-Niort - Epidémiologie, évaluation de risque, approche intégrée de la santé animale.

Mme Sophie LE PODER – Maître de conférences, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort - virologie, immunologie, vaccinologie.

Mme Elodie MONCHATRE-LEROY – Directrice du Laboratoire de la rage et de la faune sauvage, Anses Nancy - Virologie, épidémiologie, évaluation de risques, faune sauvage.

Mme Monique L'HOSTIS – Retraitée, Oniris - Ecole Vétérinaire de Nantes – Parasitologie, santé des abeilles.

M. François MEURENS – Professeur, Oniris - Ecole Vétérinaire de Nantes - Virologie, immunologie, vaccinologie, pathologie porcine.

Mme Virginie MICHEL – Coordinatrice Nationale Bien-être Animal - Anses - Bien-être animal, approche intégrée de la santé animale, épidémiologie, évaluation de risque.

M. Pierre MORMEDE – Directeur de recherche émérite INRA - Bien-être animal, stress.

M. Hervé MORVAN – Chef de service du laboratoire de bactériologie vétérinaire, Labocéa 22 - Bactériologie, diagnostic de laboratoire.

Mme Carine PARAUD – Chargée de projet de recherche en parasitologie, Anses Ploufragan-Plouzané-Niort – Parasitologie, maladies des ruminants.

Mme Ariane PAYNE – Chargée d'étude, ONCFS - Epidémiologie, évaluation de risque, interface faune sauvage-animaux domestiques.

M. Michel PEPIN – Professeur, VetAgro Sup – Campus vétérinaire de Lyon – Infectiologie, immunologie, vaccinologie, maladies des ruminants.

Mme Carole PEROZ – Maître de conférences, Oniris Ecole Vétérinaire de Nantes - Infectiologie, maladies réglementées, approche intégrée de la santé animale.

Mme Claire PONSART – Chef de l'unité des zoonoses bactériennes, Laboratoire de Santé Animale, Anses Maisons-Alfort - Bactériologie, zoonoses, diagnostic de laboratoire.

M. Claude SAEGERMAN – Professeur, Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège - Epidémiologie, évaluation de risque.

Mme Gaëlle SIMON – Cheffe d'Unité Adjointe, Unité Virologie Immunologie Porcines, Anses Ploufragan-Plouzané-Niort - Virologie, immunologie, maladies des monogastriques.

M. Jean-Pierre VAILLANCOURT – Professeur, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal - Epidémiologie, biosécurité, zoonose, évaluation de risque.

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

Mme Elissa KHAMISSE-Coordinatrice scientifique d'expertise - Anses-DER-UERSABA

Mme Florence ÉTORÉ – Chef d'Unité adjointe- Anses-DER-UERSABA

Secrétariat administratif

M. Régis MOLINET- Anses

AUDITION DE PERSONNALITÉS EXTÉRIEURES

Direction Générale de l'Alimentation (DGAL), Bureau de la santé animale

M. Fabrice CHEVALIER – Référent national Tuberculose bovine

Laboratoire national de référence (LNR) Tuberculose, Laboratoire de santé animale, Anses Maisons-Alfort

Mme Maria-Laura BOSCHIROLI – Responsable LNR Tuberculose - Anses + Coordination du diagnostic et du dépistage de la tuberculose animale, toutes espèces animales.

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Liste des tableaux.....	8
Liste des figures	9
1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise.....	10
1.1 Contexte.....	10
1.2 Objet de la saisine.....	11
1.3 Modalités de traitement : organisation et moyens mis en œuvre.....	11
1.3.1 Organisation.....	11
1.3.2 Auditions et reformulations des questions	12
1.3.3 Moyens mis en oeuvre.....	12
1.3.3.1 Données transmises au GT.....	12
1.3.3.2 Recherche bibliographique.....	13
1.3.3.3 Incertitudes.....	13
1.4 Prévention des risques de conflits d'intérêts	13
2 Situation épidémiologique en France.....	14
3 Outils de dépistage et de diagnostic de la tuberculose bovine en France. 17	17
3.1 Dépistage en élevage chez les animaux vivants.....	17
3.1.1 Tests d'intradermotuberculination (IDT)	17
3.1.1.1 L'intradermotuberculination simple (IDS)	17
3.1.1.1.1 Principe et réalisation pratique	17
3.1.1.1.2 Evaluation de la sensibilité et de la spécificité de l'IDS	18
3.1.1.2 L'intradermotuberculination comparative (IDC)	23
3.1.1.2.1 Principe et réalisation pratique	23
3.1.1.2.2 Evaluation de la sensibilité et de la spécificité de l'IDC	24
3.1.2 Test de l'interféron gamma	25
3.1.2.1 Principe et réalisation pratique	25
3.1.2.3 Evaluation de la sensibilité du test IFN γ	28
3.1.2.4 Evaluation de la spécificité du test IFN γ	29
3.1.2.5 Autres facteurs impactant les résultats du test IFN γ et / ou leur interprétation.....	32
3.1.3 Modalités d'utilisation du test IFN γ en France et cadre réglementaire.....	38
3.1.3.1 Modalités d'utilisation	38
3.1.3.2 Cadre réglementaire.....	39
3.1.4 Bilan des données bibliographiques de sensibilités et spécificités des tests IDT et IFN γ	41
3.2 Analyses post-mortem.....	42
3.2.1 Inspection de la carcasse à l'abattoir.....	42
3.2.2 Analyses de laboratoire	43
4 Analyse des données IDT et IFNγ dans le cadre du protocole expérimental pour la période 2013-2015.....	44
4.1 Description de la base de données.....	44
4.2 Mise à jour des seuils d'interprétation du test IFN γ	45
4.3 Sélection des individus infectés	46
4.4 Sélection des individus « indemnes »	47
4.5 Analyse des données de sensibilité apparente.....	47
4.5.1 Calcul de la sensibilité individuelle apparente	48
4.5.1.1 Animaux « protocole ».....	48
4.5.1.2 Animaux « SR »	49

4.5.2	Calcul de la sensibilité collective apparente	50
4.6	Analyse des données de spécificité apparente.....	52
4.6.1	Spécificité individuelle apparente des animaux « protocole »	53
4.6.2	Spécificité individuelle apparente des animaux « SR »	54
4.6.3	Concordance entre les résultats des différents tests.....	54
5	Réponses aux questions de la saisine	56
6	Incertitudes	68
7	Conclusions et recommandations du groupe de travail.....	74
7.1	Conclusions du GT	74
7.1.1	Concernant la sensibilité des tests IDT	74
7.1.2	Concernant la spécificité des tests IDT	75
7.1.3	Concernant la sensibilité du test IFN γ	75
7.1.4	Concernant la spécificité du test IFN γ	76
7.1.5	Réponses aux questions de la saisine	76
7.2	Recommandations du GT	78
8	Bibliographie.....	80
8.1	Publications.....	80
8.2	Législation et réglementation.....	85
8.2.1	Directives	85
8.2.2	Décisions.....	85
8.2.3	Notes de service et instructions techniques	85
ANNEXES	87

Liste des tableaux

Tableau 1 : Valeurs de sensibilité et de spécificité des tests IDS et IDC à partir de la bibliographie (articles de méta-analyses et rapports)	22
Tableau 2 : Interprétation des résultats de l'IDC dans le cadre du dépistage de la tuberculose bovine en France	23
Tableau 3 : Exemples de seuils de positivité utilisés par le Laboratoire de Référence de l'Union Européenne (LRUE) et quelques Etats membres (EM) (M.L. Boschioli, communication personnelle)	28
Tableau 4 : Valeurs de sensibilité et de spécificité des différents tests IFN γ décrits dans la bibliographie (articles de méta-analyses et rapports)	31
Tableau 5 : Récapitulatif des résultats de l'évaluation de l'effet d'une IDT sur la réponse IFN γ	35
Tableau 6 : Modalités d'utilisation du test IFN γ en France	39
Tableau 7 : Rythmes de prophylaxie pour les 11 départements de la base de données, pour la période 2013-2015.....	44
Tableau 8: Grilles d'interprétations des résultats du test IFN γ (kit Bovigam™) élaborées en 2014. Le tableau à gauche porte sur l'interprétation des calculs des trois ratios et le tableau à droite porte sur l'interprétation finale des résultats combinés de ces ratios (DGAL/SDSPA/2014-864)	45
Tableau 9: Répartition des 114 animaux infectés (et de leurs élevages) selon leur département d'origine pour la période 2013-2015	46
Tableau 10 : Résultats des tests IDC en fonction de l'intervalle entre la première et la deuxième IDT	48
Tableau 11: Valeurs de sensibilité apparente des tests IDC (J ₄₂) et IFN γ (J ₃ et J ₄₂) pour les animaux « protocole »	49
Tableau 12 : Valeurs de sensibilité apparente des tests IDT (J ₀ et J ₄₂) et IFN γ (J ₃ et J ₄₂) pour les animaux « SR »	49
Tableau 13 : Résultats des tests IDS à J ₀ et IDT à J ₄₂ des 22 animaux testés à ces deux périodes...49	49
Tableau 14 : Valeurs de spécificité apparente des tests IDT et IFN γ pour les animaux « protocole » issus d'élevages « indemnes » de la Côte-d'Or et de Dordogne	53
Tableau 15 : Valeurs de spécificité apparente des tests IDT et IFN γ pour les animaux « protocole » issus d'élevages « indemnes » des autres départements	53
Tableau 16 : Spécificité des tests IDT et IFN γ pour les animaux « SR » issus de la Dordogne	54
Tableau 17 : Concordance des tests IDT et IFN γ pour les animaux « SR » et « protocole » pour les animaux « indemnes »	54
Tableau 18: Calcul de la sensibilité du test IFN γ en fonction des antigènes utilisés pour les animaux « protocole » et « SR »	61
Tableau 19 : Calcul de la spécificité du test IFN γ à J ₃ et J ₄₂ en fonction des antigènes utilisés pour les animaux « protocole » à partir de 2 928 résultats obtenus sur des bovins "indemnes" avec une IDT non négative	62
Tableau 20 : Calcul de la spécificité du test IFN γ en fonction des antigènes utilisés pour les animaux « SR » à partir de 1 260 résultats obtenus sur des bovins "indemnes" avec une IDT non négative....	63

Liste des figures

Figure 1 : Répartition des foyers de tuberculose bovine en France pour la période 2004 à 2014 (Cavalerie <i>et al.</i> 2014).....	14
Figure 2 : Evolution de la prévalence et de l'incidence de la tuberculose en France de 1995 à 2017 (Delavenne <i>et al.</i> 2019).....	15
Figure 3 : Foyers incidents de tuberculose bovine en 2018 (n = 123) (Source : DGAL)	15
Figure 4 : Distribution par départements des foyers incidents de tuberculose bovine et circonstances de détection en 2019 (n = 45 au 19 mars 2019, source : DGAL).....	16
Figure 5 : Cinétique de l'expression de la réaction d'hypersensibilité retardée (HSR) suite à une infection (Crozet, Bénét et Praud 2019). Les chiffres en abscisses correspondent aux différents stades de l'HSR.	19
Figure 6 : Critères d'interprétation du test IDC à l'échelle du troupeau en fonction de la répartition des résultats de l'ensemble des bovins testés vis-à-vis des PPD (Crozet, Bénét et Praud 2019)	24
Figure 7 : Valeur de la sensibilité troupeau des tests IDT à J ₄₂ et IFN γ à J ₃ pour les animaux « protocole »	50
Figure 8 : Valeurs de la sensibilité troupeau des tests IDT à J ₄₂ et IFN γ à J ₃ pour les animaux « SR »	51
Figure 9 : Résultats obtenus au test IFN γ à J ₃ et au test IDC à J ₄₂ chez les animaux « protocole » ayant fourni un résultat non négatif en IDT à J ₀ et reconnus <i>in fine</i> infectés	58
Figure 10 : Résultats obtenus au test IFN γ à J ₃ et au test IDC à J ₄₂ chez les animaux « SR » ayant fourni un résultat non négatif en IDS à J ₀ et reconnus <i>in fine</i> infectés	59
Figure 11 : Exemple de l'impact du ratio sur le CV (lot 401) sur un MRI-traceur suite à l'utilisation des formules normalisées par l'inclusion des ratios.	97

1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise

1.1 Contexte

La France est reconnue officiellement indemne de tuberculose bovine par l'Union Européenne (UE) depuis décembre 2000 (Décision CE/2001/26), c'est-à-dire que la proportion de troupeaux qualifiés « officiellement indemnes » en France est d'au moins 99,9 % au 31 décembre de chaque année, et la proportion de troupeaux infectés annuellement est inférieure à 0,1 % sur les six dernières années (Directive 97/12/CE).

La prophylaxie de la tuberculose bovine en France repose, d'une part, sur le dépistage en élevage de l'infection chez les animaux vivants et d'autre part, sur la recherche de lésions évocatrices de tuberculose à l'abattoir. Le dépistage en élevage est effectué par une intradermotuberculination (IDT) qui peut être simple (IDS) ou comparative (IDC).

Dans le cadre de la qualification des troupeaux de bovins, une démarche de suspicion a été construite en se basant sur les principes de la Directive 64/432/CEE. Selon les termes de la note de service de la Direction générale de l'alimentation (DGAL) du 22/12/2016 (DGAL/SDSPA/2016-1001), l'interprétation d'une réaction non négative au test d'IDT peut :

- « Soit correspondre à un « animal positif », lorsque le contexte d'interprétation du dépistage est défavorable ou que le résultat du dépistage est nettement positif¹. Il s'agit alors d'une suspicion « forte » dont la gestion correspond aux dispositions réglementaires européennes les plus strictes. Lorsque le test réalisé en première intention est une IDC, un résultat positif est forcément associé à une suspicion forte ;
- Soit correspondre à un « animal à statut non déterminé », lorsque le contexte d'interprétation du dépistage est favorable (c'est-à-dire que l'infection est peu probable) et que le résultat est probablement lié à une réaction faussement positive. Il s'agit alors d'une suspicion « faible » ».

Qu'il s'agisse d'une suspicion « forte » ou « faible », l'élevage est mis sous Arrêté Préfectoral de Mise sous Surveillance (APMS). Les conséquences de ces suspensions de qualification répétées, sont principalement une décredibilisation et une perte d'acceptabilité de l'IDT auprès des vétérinaires, mais également de fortes contraintes économiques pour les éleveurs en cas de résultats faux positifs à l'IDT initiale et tant que la suspicion n'est pas levée (ce qui prend six semaines au moins).

Afin d'améliorer cette situation, des échanges entre la DGAL et la Commission Européenne ont permis la mise en place à titre expérimental d'un protocole de diagnostic non autorisé à l'échelle européenne. L'objectif de ce protocole était de tester si le recontrôle des animaux à statut non déterminé, prévu par IDC six semaines après la lecture de l'IDT initiale, pouvait être remplacé par un test de dosage de l'interféron gamma (IFN γ) le jour de la lecture de l'IDT initiale. Le protocole expérimental a été conduit pendant les deux campagnes de prophylaxie 2013-2014 et 2014-2015 et une partie des données a fait l'objet d'un article publié en 2016 (Praud, Boireau et Dufour 2016).

¹ Paragraphes 3.1.1 et 3.1.2

1.2 Objet de la saisine

Les avis de l'Anses (Anses 2012) et de l'EFSA (EFSA 2012) s'accordent sur le fait que le test IFN γ utilisé en série après une IDT, présente des avantages. Cependant, des études complémentaires sont recommandées afin de valider son utilisation. Face aux difficultés liées à la réalisation du test IDT sur le terrain et à l'interprétation des résultats, les autorités françaises souhaitent désormais faire reconnaître le test IFN γ afin de l'intégrer dans la réglementation européenne. Dans ce contexte, l'Anses a été saisie par la DGAL le 11 Mai 2017 (saisine 2017-SA-0121, Annexe 1), d'une « *demande d'avis relatif au recours au test de dosage de l'interféron gamma pour gérer des suspicions de tuberculose bovine faisant suite à des dépistages en élevage par intradermotuberculination* ». Les questions, telles que posées dans la saisine, sont les suivantes :

Question 1 : « *Outre la valorisation par l'article publié qui répond à l'objectif principal du protocole, d'autres exploitations des données sont-elles envisageables pour étudier l'effet de défaut de sensibilité de l'interféron gamma réalisé le jour de la lecture par rapport à celui réalisé 6 semaines plus tard ?* »

Question 2 : « *Pouvez-vous comparer le risque de lever à tort la suspension de qualification suite d'une part à un résultat interféron gamma négatif suite à la lecture du dépistage initial et suite d'autre part à un contrôle IDC négatif réalisé 6 semaines plus tard ? Pouvez-vous décliner la réponse en fonction du type d'antigènes utilisés et des règles d'interprétation des résultats, en particulier si seuls les antigènes spécifiques sont utilisés ? Est-ce que cette évaluation dépend du type d'IDT réalisée en première intention ?* »

Question 3 : « *Pouvez-vous évaluer la pertinence du recours à l'IDS comme test de dépistage IDT en première intention dans le contexte épidémiologique actuel ? Est-ce que la perspective de pouvoir investiguer les résultats non conclusifs par un test interféron gamma modifie-t-elle cette évaluation ?* ».

1.3 Modalités de traitement : organisation et moyens mis en œuvre

1.3.1 Organisation

L'Anses a confié au groupe de travail « Interféron gamma » (GT IFN γ), rattaché au Comité d'Experts Spécialisé « Santé et bien-être des animaux » (CES SABA), l'instruction de cette saisine. La mise en commun des contributions des experts et les débats collectifs se sont tenus en réunions plénières du GT. Ces travaux sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences transversales et complémentaires.

Les travaux d'expertise du groupe de travail ont été soumis aux membres du CES SABA tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques, au cours des réunions des 11 décembre 2018, 16 avril, 03 juillet et 17 septembre 2019.

Le rapport produit par le GT IFN γ tient compte des observations et des éléments complémentaires transmis par les membres du CES.

Les travaux du GT IFN γ ont été adoptés par le CES SABA le 08 octobre 2019.

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

1.3.2 Auditions et reformulations des questions

Le GT IFN γ a auditionné la DGAL (cf. page 7 pour les personnes auditionnées) qui a apporté des précisions sur le système de gestion sanitaire de la tuberculose bovine en France ainsi que la situation épidémiologique en Côte-d'Or, Dordogne et autres départements français. Ces compléments d'information ont conduit les experts à reformuler, en accord avec le demandeur, les questions de la saisine de la manière suivante :

Question 1 : Suite à un résultat non négatif en IDT à J₃, quel est le risque de perte de sensibilité de substituer l'IDC réalisée à J₄₂, par un test IFN γ à J₃, cette éventualité ayant notamment comme prérequis l'évaluation de la sensibilité du test IFN γ à l'échelle individuelle et collective ?

Question 2 : i) Pouvez-vous comparer le risque de lever à tort la suspension de qualification suite d'une part à un résultat interféron gamma négatif suite à la lecture du dépistage initial et suite d'autre part à un contrôle IDC négatif réalisé six semaines plus tard ? ii) A partir de données de comparaison des tests IFN γ réalisés sur les mêmes échantillons avec des antigènes différents et de la comparaison avec des résultats bactériologiques, quels critères d'interprétation et quels antigènes seraient à adopter en fonction du contexte, selon qu'il s'agit d'un dépistage (suspicion faible ou forte) ou d'un assainissement par abattage partiel progressif, afin de viser une sensibilité maximale ? iii) Est-ce que cette évaluation dépend du type d'IDT réalisée en première intention ?

Concernant la question 3, il a été convenu avec la DGAL qu'elle ne sera pas traitée par les experts, le gestionnaire disposant actuellement d'éléments techniques pour prendre une décision.

Le Laboratoire national de référence (LNR) Tuberculose de l'Anses de Maisons-Alfort a été également auditionné en la personne de Maria-Laura Boschiroli, qui dispose d'une expertise scientifique concernant le test IFN γ . Des précisions concernant les antigènes utilisés ainsi que la mise en place des seuils d'interprétation, ont été apportés au GT.

1.3.3 Moyens mis en oeuvre

1.3.3.1 Données transmises au GT

Afin de mener à bien les travaux d'expertise, le GT a pu avoir accès à des données de terrain recueillies au cours des campagnes de prophylaxie 2013-2014 et 2014-2015. Ces données ont été fournies par la DGAL, Bureau de la santé animale. Des résultats d'IDT, d'IFN γ , de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) et de culture correspondant à 14 270 bovins provenant de 1 395 élevages, renseignés dans un fichier Excel[®] (qui sera dénommé « base de données » dans la suite du rapport) ont été fournis, qui concernent 11 départements : Ardennes (08), Ariège (09), Charente (16), Côte-d'Or (21), Dordogne (24), Gers (32), Lot-et-Garonne (47), Pyrénées-Atlantiques (64), Hautes -Pyrénées (65), Tarn (81) et Haute-Vienne (87).

Afin de pouvoir analyser ultérieurement les résultats, un travail de nettoyage et de réorganisation de la base de données a été effectué. De plus, certaines données incomplètes relatives au type d'IDT ont été renseignées ou corrigées après échange avec la DGAL. Ces aspects seront détaillés dans la partie 4 du rapport.

1.3.3.2 Recherche bibliographique

Une recherche bibliographique approfondie selon les recommandations du GT « Méthodologie en évaluation des risques » (GT MER) a été réalisée afin de recenser les connaissances scientifiques existantes sur l'utilisation de l'IDT et de l'IFN γ pour le dépistage de la tuberculose bovine (Anses 2017). La première étape de cette démarche a été de définir, avec les experts, les mots-clés pertinents en se basant sur le profil de recherche bibliographique selon le modèle proposé par l'Anses (ANSES/PR1/9/06-01) (Annexe 2). Une fois ces mots-clés validés, la recherche bibliographique a été menée sur les bases de données Scopus² et Pubmed³. Après élimination des doublons, 227 articles ont été recensés et 20 articles ont été inclus secondairement. Deux étapes de sélection des publications ont permis d'en réduire le nombre afin d'assurer l'exhaustivité et la pertinence de la sélection :

- Dans un premier temps, les experts en binôme, ont réalisé un premier tri des articles sur la base de la lecture du titre et du résumé, afin d'éliminer les publications clairement hors du champ de la saisine. Soixante dix articles ont été conservés à cette étape ;
- Dans un deuxième temps, les articles conservés ont été répartis entre les quatre experts (en moyenne 18 articles / expert) pour les étudier de manière approfondie (lecture de l'article et analyse de sa qualité). Ce deuxième tri a permis de conserver 50 articles qui rentrent dans le contexte de la saisine et qui pourraient apporter des éléments de réponses aux questions posées.

Le nombre d'études triées et examinées en vue de leur éligibilité ainsi que celui des articles exclus sont présentés sous la forme d'un diagramme de flux PRISMA (Annexe 2)

1.3.3.3 Incertitudes

Un recensement des sources d'incertitudes a été mené en se basant sur la typologie proposée par le GT MER (Anses 2017). Les recommandations de ce GT ont aidé les experts dans l'étape de planification de l'évaluation afin de clarifier, avec les parties prenantes, le cadrage de l'expertise, la formulation des questions et la méthode d'évaluation.

1.4 Prévention des risques de conflits d'intérêts

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise. Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site de l'anses (www.anses.fr).

² <https://www.scopus.com/>

³ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

2 Situation épidémiologique en France

Depuis décembre 2000, la France a le statut d'État-membre de l'UE officiellement indemne de tuberculose bovine (cf. partie 1.1). Cependant, à partir de 2004-2006, certaines régions/départements, particulièrement la Côte-d'Or et la Nouvelle Aquitaine, ont vu le nombre de foyers déclarés augmenter significativement et ont concentré la majorité des cas annuels (Figure 1).

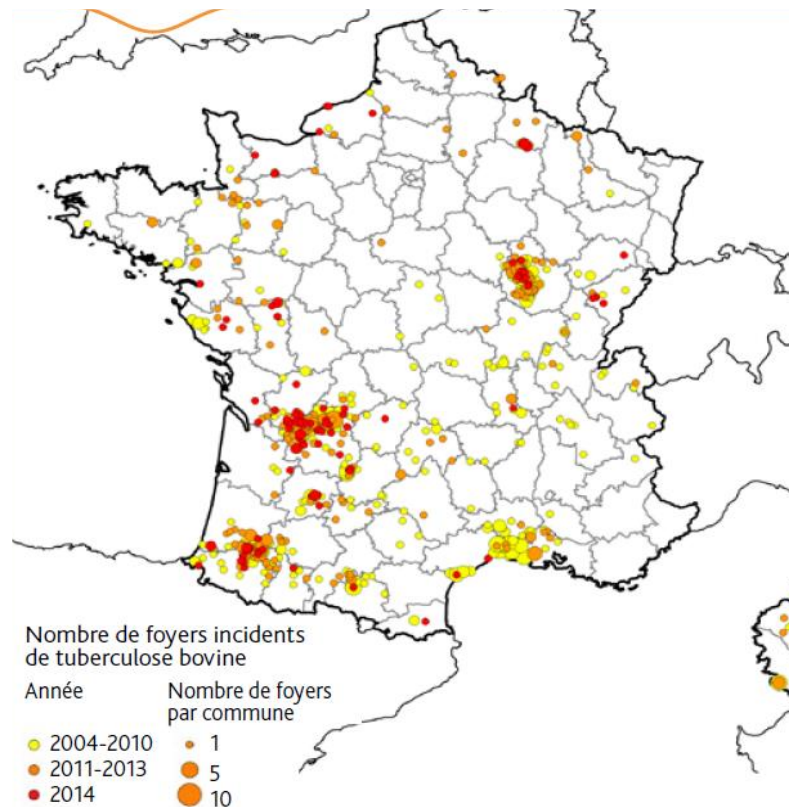


Figure 1 : Répartition des foyers de tuberculose bovine en France pour la période 2004 à 2014 (Cavalerie *et al.* 2014)

Ainsi, entre 2015 et 2017, l'incidence des cheptels déclarés infectés est stable, variant de 0,046 % à 0,049 %. En revanche, la prévalence apparente qui avait diminué entre 2013 et 2015, a augmenté progressivement, passant de 0,08 % en 2015 à 0,09 % en 2016 et à 0,10 % en 2017 (Figure 2), sans que ces évolutions soient statistiquement significatives (Delavenne *et al.* 2019).

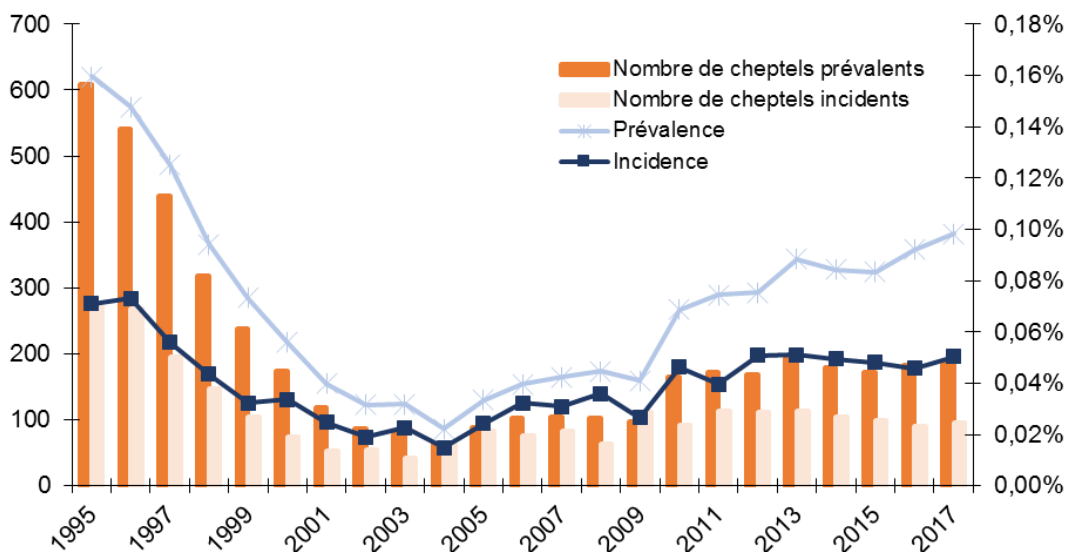
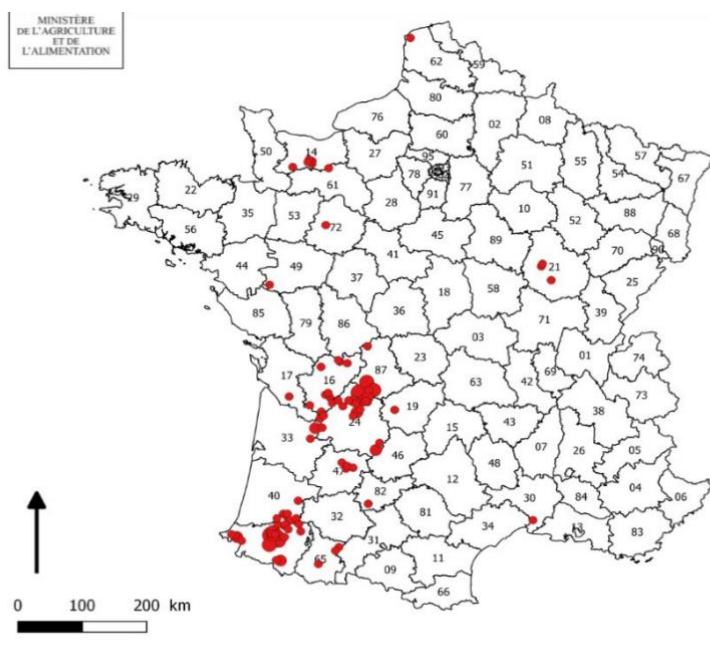


Figure 2 : Evolution de la prévalence et de l'incidence de la tuberculose en France de 1995 à 2017 (Delavenne et al. 2019)

Depuis 2017, la situation s’est considérablement améliorée en Côte-d’Or, alors que la situation en Nouvelle-Aquitaine reste très préoccupante (Figure 3). Ainsi, cette région a concentré 86 % des foyers déclarés en 2017 et 80 % en 2018 (90 % avec la Corse, dont le nombre de foyers est probablement sous-estimé, Figure 3), alors que trois foyers ont été déclarés en Côte-d’Or en 2018 (Figures 3 et 4). La Figure 3 illustre ces disparités. Au 19 mars 2019, les foyers déclarés en Nouvelle-Aquitaine en 2019 représentaient plus de 82 % des foyers incidents. Il est à noter qu’en 2018 comme en 2019, les Pyrénées-Atlantiques ont supplanté la Dordogne en terme d’incidence.



● Communes avec des foyers en 2018 (de 1 à 5 foyer(s) / commune)

Figure 3 : Foyers incidents de tuberculose bovine en 2018 (n = 123) (Source : DGAL)

La Figure 4, outre le fait qu'elle met en exergue le nombre plus élevé de foyers dans certains départements, suggère que le dépistage de l'infection est réalisé précocement dans les départements les plus atteints, dans les élevages infectés (prophylaxie) plutôt qu'à l'abattoir. Ceci peut être imputé au fait que le dépistage par IDT est réalisé à une fréquence annuelle, tout au moins dans les zones à risque. Il conviendrait par ailleurs de s'assurer que le dépistage à l'abattoir se fait selon des critères de qualité permettant de lui conférer une sensibilité suffisante. Néanmoins, il convient de noter que ce constat est à l'opposé de celui fait en Dordogne lors de la campagne 2003-2004, période où la quasi-totalité des foyers avaient été découverts à l'abattoir (Bénet et Dufour 2014). La Figure 4 montre également l'existence d'une modalité particulière mise en place par la Dordogne et la Charente, celle des contrôles renforcés.

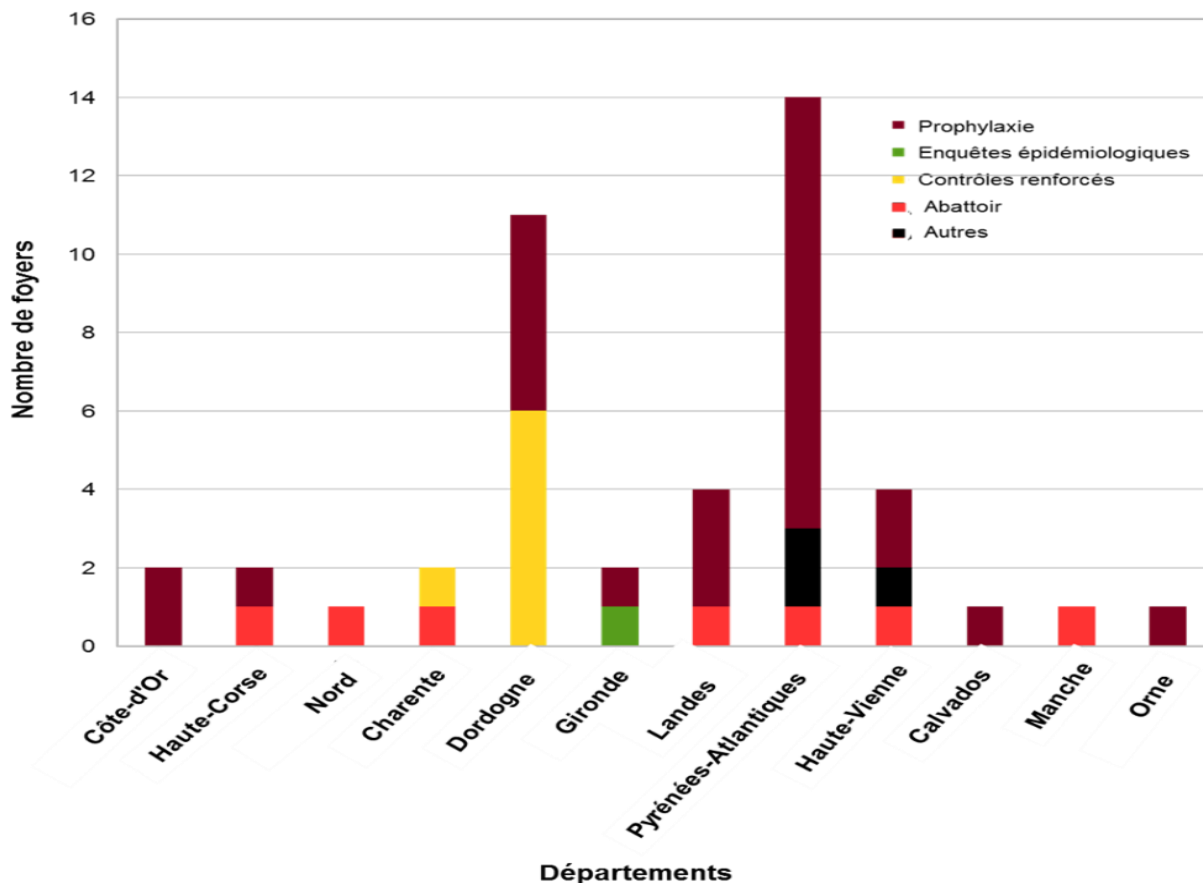


Figure 4 : Distribution par départements des foyers incidents de tuberculose bovine et circonstances de détection en 2019 (n = 45 au 19 mars 2019, source : DGAL)

Une autre particularité de l'évolution récente de la tuberculose bovine est la mise en évidence de l'émergence depuis 2001 de l'infection par *M. bovis* de la faune sauvage, à partir de bovins, avec des réservoirs actuellement constitués, impliquant plusieurs espèces, notamment des cervidés, sangliers, renards et blaireaux (Anses 2019).

3 Outils de dépistage et de diagnostic de la tuberculose bovine en France

La prophylaxie de la tuberculose bovine en France repose, d'une part, sur le dépistage de l'infection chez les animaux vivants en élevage et, d'autre part, sur la recherche de lésions évocatrices de tuberculose à l'abattoir (Figure 4). Dans le contexte de la présente saisine, ce dernier volet ne sera évoqué que dans la mesure où il s'intègre dans le dispositif de confirmation d'une suspicion après utilisation de l'IDT et/ou de l'IFNy. Il convient par ailleurs de préciser que dans le cas de l'IDT, les qualités des tests, sensibilité et spécificité, ne seront pas considérées uniquement sous leur stricte acception intrinsèque. En effet, s'agissant de tests de terrain, leur évaluation prendra aussi en compte les facteurs extrinsèques pouvant avoir un impact sur ces qualités, notamment ceux relevant de l'opérateur et d'autres facteurs d'environnement.

3.1 Dépistage en élevage chez les animaux vivants

Le principe du dépistage chez les animaux en élevage, que ce soit par intradermotuberculation (IDT) simple (IDS) ou comparative (IDC), repose sur la détection d'une réaction d'hypersensibilité retardée (HSR) ou hypersensibilité de type IV (HS IV, classification de Coombs) chez les bovins infectés. L'HSR se traduit par l'apparition d'un nodule inflammatoire au point d'injection de la tuberculine en cas de sensibilisation préexistante à des mycobactéries. L'inflammation locale est visible 48 à 72 h après l'injection et persiste quelques jours, ce qui conditionne les délais réglementaires de lecture (cf. *infra*).

3.1.1 Tests d'intradermotuberculation (IDT)

3.1.1.1 L'intradermotuberculation simple (IDS)

3.1.1.1.1 Principe et réalisation pratique

La tuberculine bovine issue de *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) est utilisée dans le cas d'une IDS. Il s'agit d'une substance extraite d'une culture de bacille tuberculeux bovin, capable de révéler l'état d'hypersensibilité retardée d'un organisme infecté et ce, à des doses supposées ne provoquer aucune réaction chez des sujets sains et à des doses réputées incapables de les sensibiliser. Il s'agit d'un allergo-haptène également appelé PPD (*Purified Protein Derivative*). La préparation et les doses injectées à chaque animal sont réglementées. Ainsi, en France, la PPD Bovine (PPD-B) est autorisée à un titre de 20 000 unité internationale (UI)/mL et elle doit être utilisée à la dose de 2 000 UI par bovin, soit 0,1 mL par dose.

L'injection doit se faire dans l'encolure (l'injection dans l'épaule ou dans le pli sous caudal est interdite en France). La zone d'injection doit être correctement repérée (tonte et/ou marqueur). L'utilisation de seringues homologuées est obligatoire, l'instruction technique DGAL/SDSPA/2019-581 du 31/07/2019 précisant que « la lecture doit se faire 72 h +/- 4 h après l'injection » et que « le respect de ce délai est très important ». La taille de la réaction inflammatoire (augmentation d'épaisseur du pli de peau) doit être mesurée à l'aide d'un cutimètre. La réaction est considérée positive si l'épaisseur du pli de peau est supérieure ou égale à 4 mm, négative si l'épaisseur est inférieure ou égale à 2 mm et douteuse quand la mesure est strictement comprise entre 2 et 4 mm.

3.1.1.1.2 Evaluation de la sensibilité et de la spécificité de l'IDS

Afin d'avoir un ordre de grandeur des valeurs de sensibilité et de spécificité de l'IDT retrouvées dans la littérature, les experts ont analysé cinq travaux (trois publications scientifiques, un rapport de l'EFSA de 2012 et un rapport de master), basés sur des études de méta-analyses. L'article publié par de la Rua-Domenech *et al.* (2006) est une revue de la littérature qui présente les données de travaux publiés entre 1975 et 2006. L'article de van Dijk (2013) est une compilation de données issues de treize articles. L'article de Nuñez-Garcia *et al.* (2018) est une méta-analyse sur des études conduites en Grande Bretagne et en Irlande : les données ont été ré-analysées en utilisant une approche bayésienne, afin de calculer une sensibilité et une spécificité moyenne pour chaque test. Le rapport de l'EFSA (2012) présente une méta-analyse des données de littérature disponible jusqu'en mars 2012 associée à une analyse bayésienne de structure latente de données de terrain. Les valeurs de sensibilité et de spécificité des tests IDT retrouvées dans ces travaux sont résumées dans le Tableau 1.

A- Sensibilité de l'IDS et facteurs interférant avec sa détermination

- *Analyse des travaux portant sur des infections naturelles :*

L'analyse de ces travaux montre que la sensibilité de l'IDS est variable d'une étude à une autre. Les valeurs médianes citées par ces auteurs varient de 76,0 % [47,6-95,2] (García-Sáenz 2010) à 94 % [49-100] (Nuñez-Garcia *et al.* 2018) (Tableau 1). En théorie, la faible sensibilité individuelle de l'IDS est compensée par le fait que l'ensemble du troupeau est testé. Ainsi, à l'échelle du cheptel (sensibilité troupeau), le nombre d'animaux infectés devrait permettre de compenser cette insuffisance. Il faut cependant noter que le nombre de bovins infectés dans les troupeaux foyers en France est faible, le plus souvent compris entre un et trois (Bénet et Dufour 2014). De nombreux facteurs peuvent expliquer les variations de sensibilité, parmi lesquels :

- ✓ Les facteurs physiologiques pouvant conduire à des résultats faussement négatifs :
 - Une contamination récente de l'animal : bien qu'aucune étude ne donne avec certitude le délai minimal entre la date de contamination et la mise en place de la réponse, plusieurs études indiquent que la majorité des animaux répondent dans un délai de trois à six semaines après la primo-infection (de la Rua-Domenech *et al.* 2006) (Figure 5) ;
 - Un état anergique dit « post-tuberculeux » : cet état correspond à une infection généralisée de l'animal. Dans ce cas, les lymphocytes T spécifiques de la PPD ne peuvent plus réagir à l'injection de la tuberculine. La réaction inflammatoire au point d'injection est indétectable. Cette situation est assez rare dans un contexte de programme de lutte, les animaux étant le plus souvent diagnostiqués tuberculeux avant d'entrer en anergie (Figure 5) ;
 - Une désensibilisation liée à la réalisation récente d'une première IDT (hypoergie post-tuberculique) : le risque de désensibilisation dure environ un mois. Pour limiter ce risque, l'intervalle réglementaire entre deux IDT est de 42 jours ;
 - Des causes inhérentes à l'utilisation d'un test basé sur la réponse immunitaire spécifique, à savoir toutes les causes d'immunodéficience : le stress (transport), la parturition, les traitements immunosuppresseurs, certaines co-infections, etc.

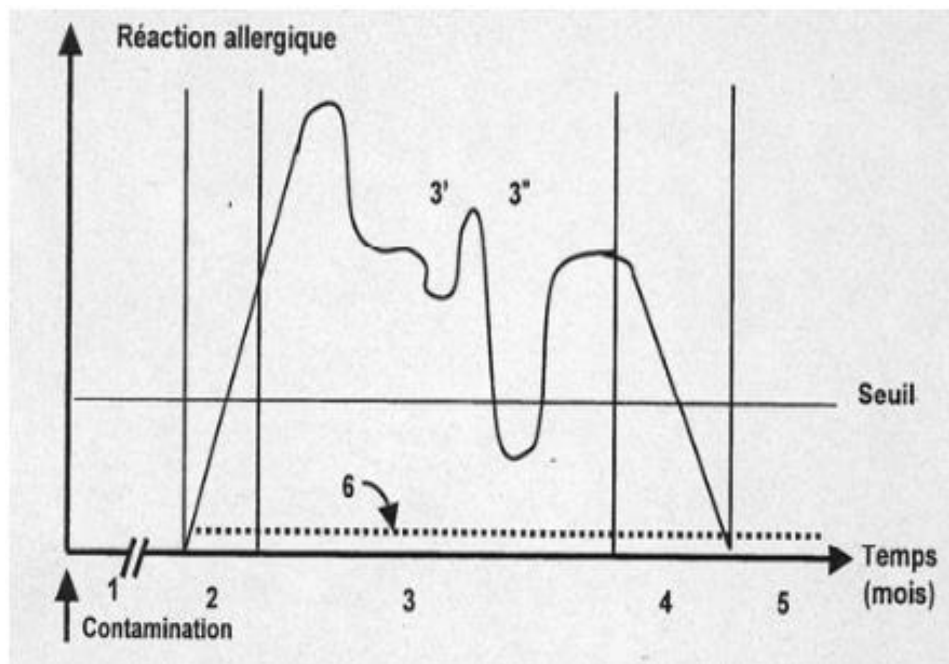


Figure 5 : Cinétique de l'expression de la réaction d'hypersensibilité retardée (HSR) suite à une infection (Crozet, Bénét et Praud 2019). Les chiffres en abscisses correspondent aux différents stades de l'HSR.

Stades de l'HSR :

- *Stade 1 (15 jours à 6 mois) : période de mise en place de la réponse immunitaire au cours de laquelle l'HSR n'est pas détectable ;*
 - *Stades 2, 3 et 4 (quelques semaines à quelques années) : périodes pendant lesquelles l'HSR est détectable ;*
 - ✓ *Stade 2: mise en place de l'HSR,*
 - ✓ *Stade 4: disparition de l'HSR,*
 - ✓ *Stade 3: l'intensité de l'HSR peut varier au cours du temps pour un même animal*
 - *Stade 5 (phase finale, pas de durée indiquée) : période d'anergie, au cours de laquelle l'HSR n'est plus détectable. Cette période concerne les animaux ayant une tuberculose avancée ;*
 - *Stade 6: certains animaux ne développent jamais d'HSR suite à l'infection.*
- ✓ Les facteurs techniques pouvant conduire à des résultats faussement négatifs : mauvaise réalisation et interprétation de l'IDS sur le terrain :
- Le repérage du lieu d'injection : il doit être réalisé en coupant les poils à l'aide de ciseaux ou à l'aide d'une tondeuse. Il faut éviter le rasage qui est irritant. Cette opération permet aussi de s'assurer plus aisément de l'absence de lésions au point d'inoculation, lesquelles pourraient fausser les résultats ;
 - La localisation du lieu d'injection : réglementairement, l'injection doit être réalisée à l'encolure, dans la zone réputée la plus propice à valoriser la sensibilité du test (limite du tiers postérieur et du tiers moyen et à égale distance des bords supérieurs et inférieurs). Contrairement à la pratique dans d'autres pays, l'injection au niveau du pli sous-caudal est proscrite dans l'UE, car cette localisation confère au test une sensibilité plus faible (80 à 95 % par rapport à l'encolure, selon Crozet, Bénét et Praud 2019). Par ailleurs, il est important que l'injection se fasse par voie intra-dermique et non par voie sous cutanée ;
 - La qualité et l'entretien des pistolets injecteurs : même si le pistolet est supposé permettre l'administration d'un volume de 0,1 mL de tuberculine, le vétérinaire sanitaire doit veiller à respecter le protocole d'administration, que ce soit lors de l'injection ou lors du retrait de

l'aiguille, ce dernier ne devant pas être trop brusque afin de ne pas induire l'évasion d'une partie du liquide injecté, auquel cas l'injection doit être répétée. Le vétérinaire sanitaire doit également vérifier que l'injection a induit la formation d'une petite vésicule. La pratique régulière des tuberculinations par le vétérinaire sanitaire contribue à la standardisation de son geste ;

- La lecture de la réaction : l'usage du cutimètre a été rendu obligatoire par la réglementation. En raison d'une variabilité de lecture entre les vétérinaires sanitaires, il est nécessaire que les deux mesures du pli de peau, à J_0 et à J_3 , soit réalisée par le même opérateur. Un délai minimal de 72 h (+/- 4 h) doit être respecté entre l'injection et la lecture, pour que la réponse inflammatoire, tardive et durable (s'agissant d'une réaction d'hypersensibilité de type IV), ait le temps de se mettre en place et soit quantifiable. Par ailleurs, afin de pallier l'absence très fréquente de lecture de l'épaisseur initiale du pli de peau à J_0 , (rendant *a priori* impossible une lecture objective en cas de réaction à la palpation à J_3), une évaluation de la pratique du terrain consistant à mesurer à J_3 le pli de peau « initial » sur un site « de référence alternatif », a été menée par certains auteurs (Duriez 2016, Lambert et Bénét 2015) : Il s'agit de mesurer à J_3 , soit en symétrique du site d'injection à J_0 sur l'autre face de l'encolure, soit sur une zone située en avant du site d'injection sur la même face, et d'utiliser la valeur de la mesure obtenue comme valeur de référence à « J_0 ». L'expérimentation réalisée par ces auteurs chez 475 bovins allaitants et 500 bovins laitiers **a montré qu'aucun site ne peut se substituer au site d'injection à J_0 pour la mesure initiale du pli de peau.**
- Smith *et al.* (2006) ont mis en avant le fait qu'en Grande-Bretagne tout au moins, le choix de la souche utilisée pour fabriquer la PPD, la souche AN5, pourrait avoir un impact sur la sensibilité du dépistage, étant donné que, bien que cette souche ait été isolée initialement au Royaume-Uni dans les années 1940, elle a un spoligotype très différent de celui de la souche dominante de *M. bovis* affectant les élevages bovins actuellement. Si cette hypothèse devait être retenue comme plausible, la question se poserait *a fortiori* en France, où ce spoligotype n'a pas été retrouvé (Haddad *et al.* 2001). Cependant, à la connaissance du GT, aucune corrélation entre spoligotype et spécificité de la réponse immunitaire cellulaire n'a été montrée et aucune étude n'est venue depuis étayer cette hypothèse, bien que Smith et ses collaborateurs (Smith *et al.* 2006) aient indiqué des études alors en cours dans leur publication.
- *Analyse des travaux portant sur des infections expérimentales :*

Il n'a pas été possible de trouver dans la littérature des données concernant la sensibilité de l'IDS réalisée au niveau de l'encolure, suite à des infections expérimentales. Dans une étude menée en 2006, 19 animaux infectés expérimentalement ont été testés par IDS, au niveau du pli sous-caudal. Cinquante-huit jours après l'infection, tous les animaux infectés ont présenté une réaction positive à l'IDS (Palmer *et al.* 2006). Si l'on tient compte du fait que l'IDS réalisée au niveau du pli sous-caudal est moins sensible que l'IDS réalisée au niveau de l'encolure, ces données pourraient suggérer *a priori* que pour des animaux ayant reçu une dose infectieuse élevée de *M. bovis*, la sensibilité de l'IDS est très probablement proche de 100 %. Cependant, ces données ne sauraient être extrapolées aux conditions d'utilisation de l'IDS sur le terrain, notamment du fait des doses élevées de souche d'épreuve utilisées dans la plupart des infections expérimentales⁴.

⁴ Il s'agissait dans cette étude de 10^4 UFC (unité formant colonie) d'une souche de *M. bovis* inoculée aux bovins directement par voie intratonsillaire.

B- Spécificité de l'IDS et facteurs interférant avec sa détermination

Comme pour la sensibilité, les valeurs obtenues dans la littérature montrent que la spécificité de l'IDS est rarement de 100 % sur le terrain et qu'il existe donc des animaux fournissant des résultats faussement positifs. Les valeurs de spécificité sont très variables selon les études (Tableau 1) : d'après Nuñez-García *et al.* (2018), la spécificité médiane de l'IDS serait de 91,0 % [70-100] et elle atteindrait 98,2 % [94,6-99] selon van Dijk (van Dijk 2013).

Parmi les facteurs physiopathologiques pouvant conduire à des résultats faussement positifs pour l'IDSA, les experts citent la présence de mycobactéries atypiques, en particulier les mycobactéries du complexe MAC (*Mycobacterium avium intracellulare*), responsables de réactions croisées. Dans certaines régions, la prévalence de la paratuberculose due à *M. avium* subsp. *paratuberculosis* doit être également prise en compte.

Un autre critère important concourant à la variabilité des valeurs de spécificité obtenues dans la littérature est la définition des populations de référence. En effet, pour définir les valeurs de sensibilité et de spécificité, il est nécessaire d'avoir des animaux dont le statut (infecté vs indemne) est connu avec certitude.

La majorité des études sont des études de terrain, pour lesquelles les populations d'étude se composaient d'animaux infectés ou suspects, et pour lesquelles on ne disposait pas de la population indemne pouvant servir de référence pour faire les calculs (Tableau 1). La définition des populations indemnes se fait donc par exclusion, les animaux étant déclarés indemnes dès lors qu'ils ne sont pas trouvés infectés avec les tests de référence. Or, les critères pour définir un animal infecté dans ces publications n'étaient pas toujours les mêmes : certaines publications considèrent qu'un animal est infecté si le résultat des tests PCR ou de la culture est positif alors que d'autres articles considèrent qu'un animal est infecté si les résultats sont positifs aux deux tests simultanément. De plus, il est maintenant acquis que la détection de lésions à l'abattoir ne peut pas être considérée comme le test *gold standard*. En effet, une proportion non négligeable d'animaux récemment infectés ne présente pas de lésion au moment de l'abattage (Bénet et Dufour 2014). Selon les études du Tableau 1, il demeure donc un certain niveau d'incertitude quant à l'absence réelle d'infection et donc quant aux chiffres de spécificité obtenus, probablement sous-évalués, pour les études ayant défini la population indemne par exclusion tout au moins.

Tableau 1 : Valeurs de sensibilité et de spécificité des tests IDS et IDC à partir de la bibliographie (articles de méta-analyses et rapports)⁵

Test utilisé (interprétation)	Nombre d'articles analysés	Sensibilité % (médiane)	Bornes	Nombre d'articles analysés	Spécificité % (médiane)	Bornes	Références
IDS	5	83,9	[80,2 - 100] ^a	4	96,8	[75,5 - 99,0] ^a	de la Rua Domenech <i>et al.</i> (2006)
IDS	19	76,0	[47,6 - 95,2]	19	92,0	[83,9 - 96,2]	García Sáenz (2010)
IDS	13	81,9	[60,1 - 94,9]	11	98,2	[94,6 - 100]	Van Dijk (2013)
IDS	7	94,0	[49 - 100]	4	91,0	[70 - 100]	Nuñez-García <i>et al.</i> (2018) ; EFSA (2012) ^b
IDC	11	80,0	[52 - 100]] ^a	10	99,5	[78,8 - 100] ^a	de la Rua Domenech <i>et al.</i> (2006)
IDC (standard) ^c	14	50,0	[26 - 78]	7	100	[99,0 - 100]	Nuñez-García <i>et al.</i> (2018)
IDC (sévère) ^d	14	63,0	[40 - 84]	ND	ND	ND	Nuñez-García <i>et al.</i> (2018)
IDC (standard)	25	49,0	[27 - 74]	7	100	[99,0 - 100]	EFSA (2012)
IDC (sévère)	25	61,0	[37 - 82]	ND	ND	ND	EFSA (2012)

ND : non disponible

^a : pour la référence de la Rua Domenech *et al.* (2006), les bornes représentent les valeurs minimales et maximales. Pour les autres articles, il s'agit de l'intervalle de confiance à 95 %

^b : il s'agit des mêmes articles analysés par l'EFSA en 2012 et Nuñez-García *et al.* 2018

^c : interprétation standard : DB-DA > 4 mm (cf. partie 3.1.2.1)

^d : interprétation sévère : DB-DA > 2 mm (cf. partie 3.1.2.2.1)

⁵ Seules les études portant sur le test réalisé à l'encolure ont été prises en compte (exclusion des tests au pli sous-caudal)

3.1.1.2 L'intradermotuberculation comparative (IDC)

3.1.1.2.1 Principe et réalisation pratique

Le principe de l'IDC consiste à comparer la réaction présentée par l'animal vis-à-vis d'une injection de tuberculine bovine (PPD-B), à celle présentée vis-à-vis d'une injection de tuberculine aviaire (PPD-A) pratiquée simultanément : la réaction la plus forte oriente le diagnostic. En raison d'une parenté plus grande de *M. avium* avec diverses mycobactéries atypiques (complexe *Mycobacterium avium intracellulare*, MAC) par rapport aux bacilles tuberculeux bovin et humain (complexe *M. tuberculosis*), les infections par des mycobactéries autres que celles appartenant à ce dernier complexe induisent une réaction plus intense vis-à-vis de la tuberculine aviaire. En théorie, l'IDC augmente donc la spécificité de la réponse en diminuant ainsi le nombre de résultats faussement positifs.

La réalisation de l'IDC est comparable à celle de l'IDS. Sur le même côté du premier tiers de l'encolure, les tuberculines bovine et aviaire sont injectées à 10-15 cm d'écart, en suivant les mêmes recommandations que pour l'IDS. La PPD-B doit être injectée en arrière de la PPD-A dans un but de privilégier la zone la plus sensible. Les plis de peau sont mesurés de manière systématique avant injection, aux points d'injection de la tuberculine aviaire (A_0) et bovine (B_0). La lecture doit être effectuée dans les heures qui suivent la 72^{ème} heure \pm 4 h, par mesure de l'épaisseur des plis de peau à chaque site d'injection : A_3 (aviaire) et B_3 (bovine). Un calcul des épaisissements des plis de peau est ensuite réalisé :

- ✓ $DB (= B_3 - B_0)$: épaisseur du pli cutané en mm au lieu d'injection de la tuberculine bovine ;
- ✓ $DA (= A_3 - A_0)$: épaisseur du pli cutané en mm au lieu d'injection de la tuberculine aviaire.

Les résultats du test sont donnés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 2 : Interprétation des résultats de l'IDC dans le cadre du dépistage de la tuberculose bovine en France

Tuberculine bovine	Différence d'épaissement entre les réactions aux PPD-B et PPD-A	Résultat
Si $DB > 2$ mm	$DB - DA > 4$ mm $DB - DA [1- 4$ mm] $DB - DA < 1$ mm	Positif Douteux Négatif
Si $DB \leq 2$ mm	Quel que soit $DB-DA$	Négatif

Parmi les réactions douteuses en IDC, sont distinguées :

- des réactions légèrement douteuses (résultat dit « petit douteux ») si l'épaissement cutané au point d'injection de la tuberculine bovine est compris entre 2 et 4 mm ;
- des réactions fortement douteuses (résultat dit « grand douteux ») si l'épaissement cutané au point d'injection de la tuberculine bovine est supérieur à 4 mm.

En théorie, ce test est destiné à être utilisé et interprété à l'échelle du troupeau et non pas à l'échelle individuelle. Du fait de la plus grande spécificité de l'IDC, son résultat permet, soit d'orienter l'hypothèse

diagnostique plus probablement vers l'infection du troupeau par une mycobactérie atypique, soit plus probablement vers son infection par une mycobactérie du complexe *M. tuberculosis*.

Pour chaque animal du troupeau, les résultats sont reportés sur un graphique avec, en abscisse, la valeur de l'épaississement du pli de peau obtenu au point d'injection avec la PPD-B et, en ordonnée, la valeur de l'épaississement du pli de peau obtenu avec la PPD-A. Dans le cas où la valeur obtenue pour la PPD-B est supérieure à 2 mm, trois grandes catégories de résultats peuvent être obtenus (Figure 6) :

- Dans le premier cas (rouge), la circulation d'une bactérie du complexe *M. tuberculosis* dans le troupeau est confortée ;
- Dans le deuxième cas (blanc), les résultats sont en faveur d'une réaction croisée (négatif pour *M. bovis*) ;
- Dans le troisième cas (jaune-orange), les résultats sont considérés comme douteux conduisant également à une suspicion (forte si grand douteux ou faible si petit douteux).

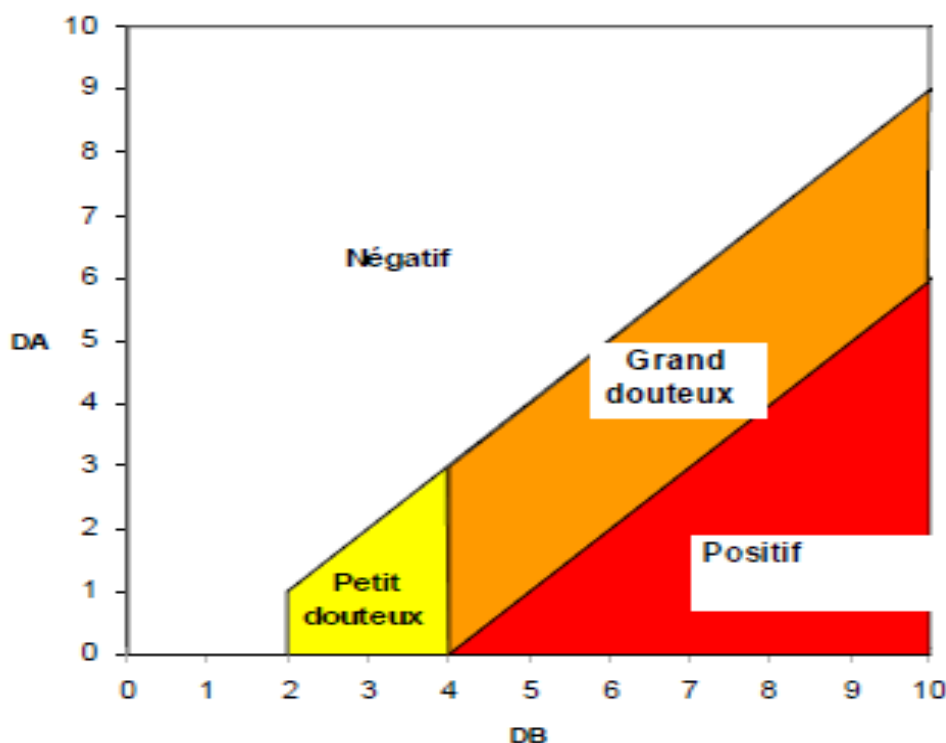


Figure 6 : Critères d'interprétation du test IDC à l'échelle du troupeau en fonction de la répartition des résultats de l'ensemble des bovins testés vis-à-vis des PPD (Crozet, Bénet et Praud 2019)

3.1.1.2.2 Evaluation de la sensibilité et de la spécificité de l'IDC

Les données de la littérature exploitées par le GT concordent sur le fait que la sensibilité de l'IDC est inférieure à celle de l'IDS (Tableau 1). Selon Nuñez-García *et al.* (2018), la valeur médiane de sensibilité de l'IDC (interprétation standard) serait de 50 % [26-78] alors que celle de l'IDS atteindrait 94 % [49-100]. Les facteurs concourant aux résultats faussement négatifs pour l'IDC sont similaires à ceux de l'IDS. Il faut cependant noter que la réalisation technique de l'IDC est plus contraignante que celle de l'IDS. En effet, la mesure des différentes épaisseurs de plis de peau peut favoriser un relâchement du respect des bonnes pratiques de la part des vétérinaires sanitaires. En revanche, la comparaison de la réaction entre les tuberculines bovine et aviaire permet d'augmenter la spécificité de l'IDC en comparaison avec l'IDS. Les valeurs de spécificité de l'IDC varieraient de 78,8 à 100 % selon de la Rua-Domenech *et al.* (2006),

voire de 99 à 100 % (EFSA 2012, Nuñez-Garcia *et al.* 2018). Comme pour l'IDS, se pose la question de la définition des animaux infectés et des animaux indemnes, très variable d'une étude à une autre.

Les études reposant sur des infections expérimentales sont supposées minimiser les facteurs extrinsèques susceptibles de fausser les valeurs de sensibilité et de spécificité, les populations de référence étant connues et les incertitudes liées au facteur humain fortement réduites. Cependant, il y a très peu d'études utilisant des infections expérimentales. Une première étude de Thom *et al.* (2004) réalisée sur six animaux donnait une sensibilité de l'IDC de 100 %. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans l'étude de Whelan *et al.* (2004), où les 10 bovins infectés expérimentalement ont présenté un test IDC positif 15 semaines après l'inoculation. Dans une deuxième étude de Thom *et al.* (2006) réalisée sur 35 animaux infectés et cinq animaux témoins, les valeurs de sensibilité et de spécificité de l'IDC trouvées étaient de 100 %. Dans cette étude, les bovins ont tous présenté un test IDC positif à partir de la 3^{ème} semaine post-inoculation. Il faut cependant noter que les doses infectantes utilisées pour ces infections expérimentales étaient beaucoup plus élevées que celles auxquelles sont exposés les bovins en conditions naturelles. Ces différences ont probablement un impact sur l'intensité et la cinétique de la réponse immunitaire induite. De plus, ces valeurs ne tiennent pas compte de la variabilité intrinsèque liée à l'utilisation à grande échelle de ces tests sur le terrain.

Par ailleurs, il ressort des auditions menées par le GT que la réalisation et la lecture des IDT sur le terrain en France ne sont pas de qualité suffisante. Une mise en pratique rigoureuse des tests IDT est nécessaire sur le terrain, notamment la mesure initiale du pli de peau avant injection (J_0) et lors de la lecture de la réaction (J_3) à l'aide d'un cutimètre. Cette observation est corroborée par plusieurs travaux qui ont soulevé le problème du non-respect des bonnes pratiques de réalisation des IDT en Belgique et en France (Humblet *et al.* 2011) avec comme conséquences, des erreurs au niveau de l'interprétation des résultats et une diminution des valeurs de sensibilité et de spécificité des tests IDT. D'ailleurs, pour l'IDS, la très grande majorité des vétérinaires sanitaires n'utilise pas de cutimètre pour évaluer l'inflammation : seule une inspection visuelle et éventuellement une palpation sont réalisées à ce stade.

3.1.2 Test de l'interféron gamma

3.1.2.1 Principe et réalisation pratique

Le test INF γ est un test *in vitro* alternatif à la tuberculination qui repose également sur la détection de la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Ce test a été développé au début des années 1990 en Australie (Wood *et al.* 1992) et il est actuellement utilisé dans plusieurs pays, dans le cadre des programmes de surveillance et de lutte (Royaume-Uni, Espagne, Australie et Etats-Unis). Au laboratoire, ce test se déroule en deux étapes :

- 1- La stimulation des lymphocytes T (LT) producteurs : le sang total de bovin récolté dans des tubes héparinés est distribué dans des plaques multi-puits contenant différents antigènes. Trois stimulations sont effectuées dans des puits séparés pendant 16 à 24 h à 37°C : une première stimulation avec des antigènes cibles de *M. bovis* (PPD-B), une deuxième stimulation avec des antigènes extraits de *M. avium* subsp. *avium* (PPD-A), permettant de mesurer la réponse immunitaire contre des mycobactéries générant potentiellement des réactions non-spécifiques. La troisième stimulation est effectuée avec un puissant mitogène, le PWM (*poke weed mitogen*), qui permet de mesurer la viabilité des cellules et sert ainsi de témoin positif (TP). Un puits supplémentaire contenant du sang non stimulé et du PBS (*phosphate buffered saline*) sert de témoin négatif (TN) ;
- 2- Le dosage de l'IFN γ : les plaques multipuits sont centrifugées, puis le plasma récupéré. Un test ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) en sandwich permet ensuite le dosage de l'INF γ grâce à

l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'IFN γ bovin. La révélation de ce test consiste à mesurer la densité optique (DO) dans les différents puits.

L'avantage du test IFN γ par rapport à la tuberculination est qu'un seul déplacement en élevage est requis pour le vétérinaire, afin de réaliser le prélèvement de sang. En outre, le test IFN γ est un test de laboratoire qui ne fait pas intervenir le vétérinaire dans l'interprétation des résultats. Cet aspect est important notamment en cas de résultat positif ou douteux. Par ailleurs, le caractère manuel de la réalisation de la tuberculination et de la lecture du pli de peau rend difficile la standardisation de la méthode. Cette standardisation tout au moins au niveau du dosage, est plus facilement maîtrisable dans le cadre d'un test de laboratoire réalisé sous assurance qualité tel que le test IFN γ .

L'inconvénient majeur du test IFN γ est d'ordre logistique. La première étape du test, la stimulation, doit se pratiquer sur des cellules vivantes des bovins soumis à dépistage. Le sang hépariné doit donc parvenir dans les 8 h au laboratoire et, il doit être conservé à une température de 22°C \pm 5°C avant d'être testé (Robbe-Austerman, Krull et Stabel 2006). Les meilleures DO ont été obtenues entre 15,6 et 21,1°C si le prélèvement est porté à une température de 37,8°C ou plus, les DO chutent considérablement.

Dans son avis de 2012, l'EFSA souligne deux points d'attention : la validation de la méthode dans chaque contexte épidémiologique ainsi que son harmonisation entre les laboratoires (EFSA 2012). Ces problématiques sont illustrées dans le Tableau 3 qui montre des méthodes de calcul variables d'un Etat membre à un autre. Dans certains cas, ces différences, souvent mal documentées, peuvent être expliquées en fonction de contextes épidémiologiques différents.

Par ailleurs, l'analyse des articles cités dans l'Annexe 3 a révélé le manque d'uniformité dans la standardisation des antigènes. L'absence d'échantillons standards et de lignes directrices pour la production des antigènes ne permet pas, à l'heure actuelle, une harmonisation entre les laboratoires utilisateurs.

L'étape de dosage de l'IFN γ est réalisée grâce à la technique ELISA. Les kits disponibles sur le marché étaient jusqu'à récemment, dominés par un seul fabricant (Thermo Fisher⁶). Celui-ci a depuis une vingtaine d'années, distribué plusieurs versions de son kit ELISA (BovigamTM). Un second kit commercialisé (ID Screen[®] Ruminant IFN γ) par un deuxième fabricant (ID-VET) est entré sur ce marché depuis quelques années. Les méthodologies utilisées par ces kits divergent, notamment pour l'interprétation des résultats. Ce dernier élément aura un important impact au niveau de l'harmonisation.

Le GT souligne qu'un effort d'homogénéisation est réalisé en France, en particulier, au niveau de la réalisation du test ELISA. L'étape de stimulation est quant à elle, la plus difficile à standardiser d'autant plus qu'elle se fait dans différents laboratoires. Ce travail d'harmonisation doit être poursuivi en France et à l'échelle européenne. Le manuel de l'OIE décrit les procédures de production et de contrôle de la qualité des tuberculines. A ce jour, au niveau international, aucune procédure n'existe pour les antigènes utilisés pour les tests IFN γ . De même la validation des kits ELISA utilisés pour le dosage de l'IFN γ ne fait pas l'objet de procédure harmonisée. Les méthodes de calcul utilisées pour l'interprétation des résultats sont également disparates et devraient être harmonisées.

3.1.2.2 Antigènes utilisés et critères d'interprétation

A la fin des années 1990, un des objectifs en matière de recherche en tuberculose visait l'identification d'antigènes spécifiques stimulant les lymphocytes T. L'utilisation de modèles murins et de filtrats de culture

⁶ Anciennement PrionicsTM

de mycobactéries a ainsi permis de mettre en évidence l'antigène ESAT-6 (6 kDa (kiloDalton) Early Secretory Antigenic Target). En 1998, des travaux portant sur l'opéron contenant le gène ESAT-6 chez *M. tuberculosis* ont également permis de mettre en évidence une autre protéine d'intérêt diagnostique, dénommée CFP-10 (10 kDa Culture Filtrate Protein) (Berthet *et al.* 1998).

Ces deux antigènes cotranscrits sont présents sur le locus RD1 chez *M. tuberculosis*, locus délété dans la souche vaccinale de *M. bovis* BCG (Bacille de Calmette et Guérin), d'où la possibilité d'utiliser ces antigènes pour différencier l'infection et la vaccination (Jones *et al.* 2017). En 2001, lors de l'infection expérimentale de 16 veaux vaccinés avec le BCG, Vordermeier et ses collaborateurs ont démontré que ces antigènes spécifiques présentaient un intérêt pour faire la distinction entre animaux infectés et vaccinés (Vordermeier, Gordon et Hewinson 2011). Par la suite, les programmes d'éradication étant plus avancés, sont apparus des problèmes de spécificité. Des études menées en 2014 ont conclu que l'utilisation des antigènes ESAT-6 et CFP-10 en combinaison avec les PPD, permettait d'obtenir un gain de spécificité (Bezoz *et al.* 2014).

Par ailleurs, une étude menée en France a démontré la pertinence de l'utilisation de ces antigènes, en adaptant la méthode au contexte épidémiologique et plus précisément au niveau de l'interprétation des résultats (Faye 2010, Faye *et al.* 2011). Ainsi, les travaux de Faye évoquent un « contexte défavorable » (ou zone à risque) qui selon les experts, peut être défini comme :

- un risque de résurgence,
- ou un troupeau actuellement infecté,
- ou un troupeau épidémiologiquement lié à un autre troupeau reconnu infecté.

L'instruction technique du 06/08/2018 (DGAL/SDSPA/2018-598) emploie le terme de ZPR (zone à prophylaxie renforcée) pour préconiser l'usage de l'IDC à J₀, cette zone étant définie comme étant une « zone à risque particulier où la prophylaxie est rendue annuelle sur tous les élevages ». L'instruction précise également qu'il y a deux situations dans lesquelles une ZPR est mise en place, à savoir, la proximité avec un foyer en élevage ou des cas dans la faune sauvage, ces deux situations occasionnant un risque particulier d'exposition des cheptels. Dans des départements où une augmentation de l'incidence a été mise en évidence, certains facteurs de risque particuliers sont également mentionnés, comme par exemple la pratique de la transhumance.

Selon le GT ces éléments confirment qu'il n'y a pas une définition univoque des cheptels et des zones à risque. L'instruction technique insiste d'ailleurs sur le fait que « la ZPR est définie par les épidémiologistes des Service Régionaux de l'Alimentation (SRAL) des régions concernées et doit être validée par le référent national tuberculose (notamment quand il n'y a pas d'épidémiologiste) ».

Concernant le « contexte favorable » (ou zone à faible risque) évoqué dans les travaux de Faye (Faye 2010, Faye *et al.* 2011), selon les experts, il est permis de conclure que ces termes désignent une zone qui ne remplit pas les critères évoqués ci-dessus la désignant comme la zone à risque (*i.e.* actuellement une ZPR).

Ainsi, dans un contexte épidémiologique favorable, un animal sera déclaré positif si des réponses sont observées avec les deux stimulations PPD et ESAT-6 / CFP-10. Par contre, dans un contexte défavorable, seule une réponse avec une des deux stimulations est suffisante pour déclarer un animal positif. Cette stratégie permet d'assurer la plus haute sensibilité du test dans les zones à risque et la plus forte spécificité dans les zones à faible risque (Faye 2010, Faye *et al.* 2011).

Tableau 3 : Exemples de seuils de positivité utilisés par le Laboratoire de Référence de l'Union Européenne (LRUE) et quelques Etats membres (EM) (M.L. Boschioli, communication personnelle)

	Seuils de positivité
LRUE	$PPD-B \geq PBS + 0,05$; $PPD-B > PPD-A$
EM 1	$PPD-B - PBS > 0,1$; $PPD-B - PPD-A > 0,1$
EM 2	$PPD-B/PBS > 2,0$ et $PBS < 0,15$
EM 3	$PPD-B \geq PBS + 0,1$; $PPD-B > PPD-A$
EM 4	$PPD-B \geq PBS + 0,1$; $PPD-B \geq PPD-A + 0,1$
EM 5	$PPD-B \geq PBS + 0,1$; $PPD-B > PPD-A + 0,1$
EM 6	$PPD-B \geq PBS + 0,05$; $PPD-B \geq PPD-A$; $PPD-B > 0,1$; $PPD-B > PPD-A$
EM 7	$PPD-B / PBS \geq 2$; $PPD-B \geq PPD-A + 0,05$
EM 8	$PPD-B \geq PBS + 0,05$; $PPD-B > PPD-A$
EM 9	$PPD-B \geq PBS + 0,05$; $PPD-B > PPD-A$
EM 10	$PPD-B \geq PBS + 0,05$ (assainissement par abattage partiel progressif) ; $PPD-B \geq PBS + 0,1$ (dépistage) ; $PPD-B > PPD-A + 0,1$
EM 11	$PPD-B \geq PBS + 0,05$; $PPD-B > PPD-A$
EM 12	Test en parallèle : $PPD-B - PPD-A > 0,1$; Test en série : $PPD-B - PPD-A > 0,1$ et $ESAT-6/CFP-10 - PBS > 0,1$
France	$(PPD-B - PPD-A)/(TP-TN) > 0,05$; $(ESAT-6/CFP-10 - PBS)/(TP - TN) > 0,3$

3.1.2.3 Evaluation de la sensibilité du test IFN γ

Comme pour la définition de la sensibilité des IDT, les populations de référence « infectées » sont, dans la littérature, variables d'un article à un autre. La majorité des données disponibles portent sur les tests utilisant les antigènes PPD. Il existe peu d'études utilisant simultanément les tests avec les antigènes PPD et les antigènes recombinants ESAT- 6 et CFP-10 (voir Annexe 3).

D'après les travaux de de la Rua-Domenech *et al.* (2006) (Tableau 4), la sensibilité du test IFN γ utilisant les peptides PPD (IFN γ PPD) varie de 73 à 100 % avec une médiane de 87,6 %. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Vordermeier *et al.* (2004) qui estimaient la sensibilité de 80,9 à 100 %, avec une médiane de 88,4 %, et de Wood *et al.* (2001) qui l'évaluaient de 55,4 à 100 %, avec une médiane de 88,8 % (de la Rua-Domenech *et al.* 2006, Vordermeier *et al.* 2004, Wood et Jones 2001).

Globalement, tous les articles ayant comparé la sensibilité du test IDS à celle du test IFN γ PPD montrent que la sensibilité du test IFN γ PPD est équivalente. D'après de la Rua-Domenech *et al.* (2006), la réponse au test IFN γ pourrait être plus précoce (1-5 semaines post-infection) que la réponse à la tuberculination (3-6 semaines post-infection). Cette réponse plus précoce au test IFN γ n'est pas retrouvée dans les études avec des infections expérimentales (Thom *et al.* 2004), les animaux présentant un résultat positif trois semaines après l'infection tant au test IDC qu'au test IFN γ .

Il est important de noter que les données de la littérature présentées ci-dessus sont dépendantes des kits et des antigènes utilisés. De plus, pour certains kits, il existe plusieurs versions disponibles qui n'ont pas forcément les mêmes caractéristiques. Enfin, il faut aussi souligner que les formules utilisées pour définir les seuils de positivité du test IFN γ ne sont pas toujours les mêmes d'une étude à une autre (Tableau 3). Les données présentées sont donc des valeurs très générales et elles ne peuvent pas être utilisées comme valeurs de référence. Pour cela, il faudrait utiliser des données obtenues avec les kits, les antigènes et les formules appliquées en France.

Les tests IFN γ utilisant un cocktail associant les antigènes recombinants (ESAT-6 et CFP-10) montrent globalement une sensibilité inférieure à celle des tests utilisant les PPD, et pouvant varier de 73 à 95,7 % selon les articles (Aagaard *et al.* 2006, Cockle *et al.* 2006). Cockle *et al.* (2006) insistent par ailleurs sur le fait que la sensibilité obtenue par ce cocktail est supérieure à celle de l'IDC.

En France, l'utilisation combinée des PPD et des antigènes recombinants ESAT-6 et CFP-10 a été choisie pour les tests IFN γ . La sensibilité du test IFN γ (PPD + ESAT-6/CFP-10) a été évaluée dans plusieurs études françaises. A titre d'exemple, dans la thèse vétérinaire de Boireau⁷ (Boireau 2015) où la population de référence était définie à partir des animaux ayant donné un résultat positif à la culture ou au test PCR, 29 animaux infectés ont été testés à l'IFN γ (PPD + ESAT-6/CFP-10)⁸. La sensibilité médiane du test IFN γ à J₃ était de 93 % [77 - 99] lorsque seuls les résultats positifs étaient pris en compte, et de 97 % [82-100] si les résultats non conclusifs étaient inclus dans les résultats positifs.

Dans l'étude de Praud *et al.* (2015) conduite sur une partie de l'échantillon d'animaux utilisé par Boireau (fraction d'animaux appartenant à des élevages de Côte-d'Or), les tests IFN γ utilisés étaient une combinaison PPD et ESAT-6 uniquement. Une analyse bayésienne a été utilisée pour calculer la sensibilité du test IFN γ . Les résultats indiquent des valeurs de sensibilité de 88,1 % [72,8 - 97,5].

Dans l'étude de Praud *et al.* (2016), visant à comparer la sensibilité des tests IDT à J₀ et J₄₂ et des tests IFN γ pratiqués à J₃ et J₄₂ sur 40 animaux infectés, la sensibilité du test IFN γ à J₃ a été estimée à 95 % [88-100]. Dans cette étude, s'ajoutent à l'échantillon testé dans la thèse de Boireau (Boireau 2015), les animaux du protocole pour la campagne de prophylaxie 2014-2015. Dans ces travaux, les antigènes recombinants utilisés seraient donc selon les animaux, soit ESAT-6, soit ESAT-6/CFP-10.

3.1.2.4 Evaluation de la spécificité du test IFN γ

Les données de la littérature analysées par le GT montrent que globalement, la spécificité du test IFN γ utilisant les PPD est proche de celle de l'IDT, avec une valeur médiane variant de 87,1 à 97 % selon les publications (Tableau 4).

Les travaux de méta-analyse menés par de la Rua-Domenech *et al.* (2006), à partir de 15 études de terrain réalisées entre 1991 et 2006, montrent que les valeurs de spécificité du test IFN γ utilisant les PPD varient de 85 (Buddle *et al.* 2001) à 99,6 % (Neill *et al.* 1994), avec une valeur médiane de 96,6 %.

Bezou *et al.* (2014), font la synthèse de résultats obtenus, entre 2000 et 2009, par divers auteurs utilisant le test IFN γ avec les antigènes PPD ainsi qu'une grande variété d'antigènes recombinants, de peptides ou de leur combinaison. Les valeurs les plus basses de spécificité sont observées avec le test IFN γ utilisant les antigènes PPD, et varient de 70 (Schiller *et al.* 2009)⁹ à 93 % (Cockle *et al.* 2006). Buddle et ses collaborateurs (Buddle *et al.* 2003) avaient observé une valeur de spécificité de 74 % proche de celle obtenue par Schiller *et al.* (2009), mais des travaux antérieurs menés par ces auteurs en 2001 (Buddle *et al.* 2001), toujours avec les PPD, situaient la spécificité du test IFN γ à 85 %, comme mentionné par de la Rua-Domenech *et al.* (2006). Quant aux travaux menés par Pollock et ses collaborateurs (Pollock *et al.* 2000) et Vordermeier et ses collaborateurs (Vordermeier, Gordon et Hewinson 2011), la valeur de

⁷ Les travaux de cette thèse vétérinaire ont porté sur des animaux issus de la base de données qui est présentée dans la partie 4 de ce rapport.

⁸ Campagne 2013-2014 : en Dordogne, PPD + ESAT-6/CFP-10, en Côte-d'Or, PPD + ESAT-6 (Boireau 2015, pages 126-127)

⁹ Expérimentation réalisée sur sept animaux

spécificité obtenue par ces auteurs est de 92 %, valeur très proche obtenue par García Sáenz (2010) (92,6 % - [88,9 - 95,2]). Ces résultats divergent de ceux publiés récemment par Nuñez-García *et al.* (2018), qui relèvent dans leur méta-analyse une valeur médiane de spécificité de 98 % [96-99]. Concernant les résultats du test IFN γ utilisant une grande variété d'antigènes recombinants, de peptides ou de leur combinaison, la spécificité obtenue est de 89 % lors de l'utilisation de l'antigène MPB70 seul (Aagaard *et al.* 2006) et peut atteindre 100 %. Cette dernière valeur de spécificité a été relevée par plusieurs auteurs, avec divers antigènes et combinaisons d'antigènes : d'une part, par Sidders et ses collaborateurs (Sidders *et al.* 2008) avec les antigènes RV3615c, ESAT-6/CFP-10 et la combinaison Rv3615c et ESAT6/CFP10 et, d'autre part, par Schiller et ses collaborateurs avec les antigènes Rv0899, ESAT6/CFP10 et la combinaison Rv0899 et ESAT-6/CFP-10 (Schiller *et al.* 2009).

Par ailleurs, le rapport de l'EFSA (2012) montre que les performances de spécificité du test IFN γ utilisant la combinaison ESAT-6/CFP-10 (99 % ; [98-100]) sont équivalentes à celles du test IDC (100 % ; [99-100]). En revanche, la spécificité médiane de l'IDS (91 %), est inférieure à celle du test IFN γ , mais avec un intervalle de confiance (IC) étendu variant de 70 à 100 %.

Tableau 4 : Valeurs de sensibilité et de spécificité des différents tests IFN γ décrits dans la bibliographie (articles de méta-analyses et rapports)

Test utilisé (peptides ^c ou antigènes)	Nombre d'articles analysés	Sensibilité % (médiane)	Bornes	Nombre d'articles analysés	Spécificité % (médiane)	Bornes	Références
IFN γ (PPD)	11	87,6	[73 - 100] ^a	13	96,6	[85 - 99,6] ^a	de la Rua Domenech <i>et al.</i> (2006)
IFN γ (PPD et ESAT-6/CFP-10)	16	82,8	[77,7 – 87,2]	21	92,6	[83,9 - 96,2]	García Sáenz (2010)
IFN γ (PPD et ESAT-6/CFP-10)	23	92,5	[85,3 - 99,7]	23	84,3	[70,5 - 92,8]	Bezós <i>et al.</i> (2014)
IFN γ (non précisé, probablement PPD)	12	87,5	[75,4 - 98,8]	11	93,7	[88,0 - 99,3]	van Dijk (2013)
IFN γ (PPD)	12	81,3	[76,1 - 85,7]	14	87,1	[78,6 - 92,5]	García Sáenz (2010)
IFN γ (PPD)	27	87,0	[72,0 - 95,0]	19	97,0	[94,0-98,0]	Nuñez-García <i>et al.</i> (2018) ; EFSA (2012) ^b
IFN γ (PPD)	6	73,6	[36,5 - 96,5]	6	96,0	[90,1-100]	Bezós <i>et al.</i> (2014)
IFN γ (ESAT-6/CFP-10)	17	83,9	[78,4 - 88,4]	17	96,5	[94,1 - 98,1]	García Sáenz (2010)
IFN γ (ESAT-6/CFP-10)	27	78,0	[60 - 90]	19	99,0	[98,0 - 100]	Nuñez-García <i>et al.</i> (2018) ; EFSA (2012) ^b
IFN γ (ESAT-6/CFP-10)	17	82,2	[68,4 - 96,6]	17	95,9	[91,4 - 100]	Bezós <i>et al.</i> (2014)

^a : pour la référence de la Rua Domenech *et al.* (2006), les bornes représentent les valeurs minimales et maximales. Pour les autres articles, il s'agit de l'intervalle de confiance à 95 %.

^b : il s'agit des mêmes articles analysés par l'EFSA (2012) et Nuñez-García *et al.* (2018)

^c : il existe des différences méthodologiques dans la production des antigènes ESAT-6 et CFP-10

Enfin, il ressort de l'étude de Praud *et al.* (2019) réalisée sur 1 825 bovins déclarés indemnes de tuberculose, que la spécificité du test IFN γ à J₃ (PPD et ESAT-6/CFP-10) est de 46,08 % [43,80- 48,37], si les résultats négatifs sont uniquement pris en compte, alors qu'elle est de 82,47 % [80,72 -84,2], si les résultats non conclusifs sont inclus dans les résultats négatifs. Cette faible valeur de spécificité pourrait s'expliquer par l'existence d'un biais dans la population suivie, puisque les animaux sélectionnés avaient donné un résultat non négatif à l'IDT initiale.

3.1.2.5 Autres facteurs impactant les résultats du test IFN γ et / ou leur interprétation

A- Facteurs en amont de la réalisation du test de laboratoire :

Il s'agit des facteurs « terrain » susceptibles d'interférer avec les résultats du test IFN γ , indépendamment de ses qualités intrinsèques. Parmi ces facteurs, il est possible de relever :

- Facteurs pouvant interférer avec la réactivité des lymphocytes T (LT) producteurs d'IFN γ avant la réalisation du prélèvement :

Il s'agit essentiellement des facteurs agissant *in vivo* sur la réactivité de ces lymphocytes. Le GT n'a considéré que le facteur pouvant interférer avec la réactivité des LT producteurs d'IFN γ de façon spécifique, en l'occurrence l'IDT initiale réalisée à J₀, cette tuberculation étant inévitablement effectuée dans le contexte du protocole en série. Les principales données de la littérature sont résumées dans le Tableau 5. Les éventuels facteurs non spécifiques, susceptibles d'interférer entre J₀ et J₃ avec la compétence immunitaire du bovin tuberculiné à J₀, ne seront pas abordés dans ce rapport. En effet, de tels facteurs ne sont pas documentés dans la bibliographie.

Si la question d'une influence possible du test initial IDT sur la réponse au test à l'IFN γ a été posée précocement, peu d'auteurs semblent l'avoir explorée.

- *Utilisation initiale d'un test d'IDS (IDS à J₀) :*

L'étude de Rothel *et al.* (1992), fait état d'une augmentation nette de la réponse moyenne à l'IFN γ vis-à-vis de la PPD-B chez quatre bovins infectés expérimentalement par *M. bovis*, ayant reçu une injection de PPD au pli sous-caudal (PSC), et ce, jusqu'à 59 jours après l'injection. Une diminution de la réponse IFN γ est cependant observée chez deux des quatre bovins durant les sept premiers jours.

Toujours dans des conditions d'infection expérimentale, les résultats publiés par Whipple *et al.* (2001) après une injection de PPD au PSC vont dans le même sens puisqu'ils indiquent une stimulation durable de la réponse IFN γ obtenue trois jours après la réalisation du test au PSC et jusqu'à 63 jours après la réalisation du test IDS. Par ailleurs, Rangen *et al.* (2009) qui indiquent une sensibilité de l'IDS de 80 à 84,4 % en fonction de la méthode d'interprétation et une spécificité de 96 % du test au PSC en se référant à l'étude de Whipple et ses collaborateurs (Whipple *et al.* 1995), mentionnent que l'utilisation du test IFN γ (kit Bovigam™) en série après une IDT au niveau du PSC augmente la sensibilité de la détection, y compris par rapport à une IDC en 2^{de} intention. De même, selon d'autres auteurs (Doherty *et al.* 1995, Whelan *et al.* 2004), ce protocole permet une meilleure spécificité en cas d'infection par des mycobactéries atypiques.

En revanche, les travaux de Schiller *et al.* (2010) concluent que l'IDS réalisée au niveau du PSC n'induit pas d'augmentation significative de la réponse IFN γ , car l'augmentation de la réponse à la PPD-B est assortie d'une augmentation de la réponse à la PPD-A. Cette synthèse remet donc en cause les conclusions des travaux de Rothel *et al.* (1992) et de Whipple *et al.*, (2001), qui indiquent une augmentation de la réponse IFN γ , sachant que ces travaux avaient servi à la mise en place du protocole de dépistage de la tuberculose bovine aux Etats-Unis, basé sur l'utilisation du test IFN γ entre 3 et 30 jours après le test au PSC (Schiller *et al.* 2010).

Cependant, les travaux de Coad et ses collaborateurs (Coad *et al.* 2010) sur des bovins infectés naturellement montrent également une augmentation sélective de la production d'IFN γ vis-à-vis de la PPD-B (pas d'augmentation avec la PPD-A) trois jours après la réalisation d'une IDS au niveau du PSC. Cette réponse est d'autant plus notable, que dans le même temps, Coad *et al.* (2010) ont testé l'effet sur d'autres bovins d'une IDC sur la réponse IFN γ avec le constat, selon ces auteurs, d'une absence d'effet sur la réponse IFN γ dans ce cas.

Enfin, des travaux menés par de Lisle *et al.* (2017) portant sur des bovins infectés expérimentalement ou naturellement ou non infectés, ne montrent pas d'effet significatif d'une IDS au niveau du PSC sur la réponse IFN γ réalisée trois jours après, par rapport à la réponse IFN γ réalisée à J₀.

- *Utilisation initiale d'un test d'IDC (IDC à J₀) :*

Dans leur revue, Schiller *et al.* (2010) font une synthèse des travaux ayant porté sur l'effet d'une IDC initiale sur la réponse au test à l'IFN γ . Les travaux cités sont partagés entre un contexte d'infection expérimentale (quatre études) et un contexte d'infection naturelle (quatre études). Les résultats montrent essentiellement une absence de modification significative de la réponse IFN γ , notamment pour les quatre études après infection naturelle et pour deux des quatre études après infection expérimentale. Pour les deux études restantes, les résultats suivants ont été obtenus :

- Thorn *et al.* (2006) : augmentation transitoire des réponses PPD-A et PPD-B, (en particulier la réponse PPD-A), induisant des risques de réponse faussement négative. Les auteurs mentionnent cependant que l'injection d'anatoxine tétanique avant l'infection expérimentale aurait pu avoir un impact sur la réponse *in vitro* des LT ;
- Whelan *et al.* (2004) : diminution de la réponse aux deux PPD (PPD-A et PPD-B) ainsi qu'à l'ESAT-6 et le CFP-10, sans qu'il y ait un impact sur l'interprétation du résultat (réduction de la réponse aux deux allergènes, assortie d'une réduction de sensibilité du test dans le cas d'ESAT-6 et CFP-10) ;

Dans le contexte du dépistage dans les conditions naturelles, Rangen et ses collaborateurs (Rangen *et al.* 2009) font état d'une absence d'impact d'un test IDC réalisé trois à dix jours après un test au PSC¹⁰ sur la production d'IFN γ , mesurée avant la réalisation du test IDC (en l'occurrence le jour de la lecture au PSC et de la réalisation de l'IDC) ou trois jours après la réalisation du test IDC, en l'occurrence le jour de la lecture de l'IDC.

Par ailleurs, les travaux de Coad *et al.* (2010) portant à la fois sur l'impact de la répétition des IDC sur la réponse IDC *in vivo* et sur la réponse IFN γ , ont confirmé l'effet d'hyposensibilisation classiquement décrit vis-à-vis des IDC, tout en montrant une absence d'effet sur la réponse IFN γ (et inversement un effet de stimulation de la réponse Interleukine-10).

¹⁰ En application du protocole officiel de dépistage de la tuberculose bovine au Canada, l'IDC devant y être réalisée dans un délai de moins de 10 jours ou de plus de 60 jours suivant le test au PSC.

Les résultats de Lopes *et al.* (2012), obtenus au Brésil dans des conditions d'infection naturelle, vont également dans le sens d'une absence d'interférence entre les résultats à J₀ et J₃ du test INF γ réalisé trois jours après une IDC. Les résultats ont été obtenus dans deux troupeaux reconnus infectés après un résultat positif à une IDC de dépistage (résultats bactériologiques positifs), et dans deux troupeaux reconnus indemnes après un résultat négatif à l'IDC.

Quant aux travaux de Jones *et al.* (2017), ils se situent dans le cadre de la problématique de l'évaluation d'un test INF γ -DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals), développé vis-à-vis d'un cocktail peptidique ESAT-6/CFP-10 et Rv3615c, en vue de différencier les bovins vaccinés avec le BCG de ceux non vaccinés mais infectés. Par rapport à la réponse au test INF γ -DIVA réalisé sur les animaux vaccinés avant une IDC, la sensibilité du test INF γ -DIVA réalisé sur les mêmes animaux une semaine après l'IDC était significativement augmentée, passant de 72,6 à 91,8 %, un niveau similaire à celui observé chez les animaux non vaccinés et infectés par *M. bovis*. Les animaux infectés ont présenté une augmentation significative des taux d'INF γ induits par la PPD-A et la PPD-B une semaine après l'IDC, suggérant que les antigènes présents dans les PPD ont réactivé les LT spécifiques de *Mycobacterium* stimulés par l'infection antérieure par *M. bovis*. Etant donné que cet effet de rappel a également été observé chez des animaux infectés par *M. bovis* vaccinés par le BCG, il est également possible que le test cutané réactive les LT sensibilisés par la vaccination initiale au BCG. Cependant, cela semble peu probable car les auteurs n'ont observé aucun effet de rappel significatif chez les animaux vaccinés par le BCG et non infectés. De plus, de fortes réponses INF γ aux cocktails peptidiques ESAT-6/CFP-10 et Rv3615c ont été observées chez des animaux infectés par *M. bovis*. La vaccination par le BCG n'amorçant pas une réponse INF γ à ces réactifs (puisque ces antigènes sont absents de la souche vaccinale), ces résultats appuient, selon les auteurs, l'hypothèse selon laquelle l'IDC réactiverait des LT activés par l'infection à *M. bovis*. A partir de ces éléments et selon Jones *et al.* (2017), l'IDC pourrait également induire un état « d'hyperréactivité » à la stimulation chez ces animaux. Cependant, l'IDC n'a pas induit de réponse significative au test INF γ -DIVA chez les animaux non infectés, démontrant que la spécificité de ce test serait conservée s'il était utilisé après l'IDC.

Enfin, Jones *et al.* (2017) rappellent qu'il a été démontré que la production d'INF γ induite par ESAT-6 chez des bovins infectés à titre expérimental est en corrélation positive avec la gravité de la maladie, ce qui suggère que les facteurs qui limitent la progression de la maladie peuvent avoir un impact sur les résultats des tests de diagnostic utilisant cet antigène (c'est à dire une plus faible réponse chez les bovins faiblement atteints). Ceci est important car l'antigène ESAT-6 est un composant non seulement du test INF γ -DIVA mais également des tests utilisant des antigènes recombinants.

Tableau 5 : Récapitulatif des résultats de l'évaluation de l'effet d'une IDT sur la réponse IFN γ

Auteurs	Pays	Test IDT (localisation)	Test IFN γ	Contexte	Description du protocole	Résultats et interprétation
Rothel <i>et al.</i> 1992	Australie	IDS (PSC)	PPD-B et PPD-A	Expérimental	4 bovins infectés avec <i>M. bovis</i> et 4 avec <i>M. avium</i> IDS (PSC) + IFN γ testé 2 fois par semaine pendant 59 j	- Bovins infectés par <i>M. bovis</i> : augmentation nette de la réponse moyenne pour PPD-B et PPD-A, jusqu'à J 59 - Bovins infectés par <i>M. avium</i> : pas d'effet
Rangen <i>et al.</i> 2009	Canada	IDS (PSC)	PPD-B	Terrain	1/ IDS (PSC) + IFN γ J ₃ 2/ IDS (PSC) + IDC < J ₁₀ ou > J ₆₀ + IFN γ	Pas de différence significative de la réponse IFN γ avant et après IDC réalisée moins de 10 jours ou plus de 60 jours après IDS (PSC)
Thom <i>et al.</i> , 2004 (cité par Rangen <i>et al.</i> 2009)	Royaume-Uni	IDC	PPD-B	Expérimental	5 IDC à 8 semaines d'intervalle chez bovins infectés par voie intratrachéale par <i>M. bovis</i> peu virulent	Pas de différence de réponse IFN γ entre les veaux tuberculins ou pas (témoins)
Schiller <i>et al.</i> 2010	Irlande, Nouvelle-Zélande, Royaume-Uni, Suisse, Etats-Unis	IDS (PSC)	PPD-B et PPD-A	Expérimental	Analyse synthétique de différents essais, après infection par <i>M. bovis</i> virulent ou inactivé ou sur bovins non sensibilisés	- Pas d'augmentation significative de la réponse IFN γ car augmentation de la réponse à la PPD-B mais aussi à PPD-A et calcul de $\Delta B - \Delta A$. - Pas besoin de « boost » par IDT pour que la réponse IFN γ atteigne le seuil requis si les bovins sont infectés
				Terrain	IDS (PSC) + IFN γ J ₀ , J ₃ et J ₁₀ en conditions d'infection naturelle	Augmentation sélective de la réponse IFN γ à la PPD-B (pas à la PPD-A)
		IDC	PPD-B et PPD-A ESAT-6 et CFP-10		4 études expérimentales et 4 études de terrain	Aucune différence dans la réponse IFN γ avant et après IDC pour les 4 études terrain et études expérimentales Exceptions pour 2 études expérimentales : - Thom <i>et al.</i> 2006 : augmentation transitoire de la réponse aux PPD-A et B, <u>surtout A</u> (mais injection anatoxine tétanique avant infection expérimentale) - Whelan <i>et al.</i> 2004 : diminution de la sensibilité des réponses aux PPD-A et B, ESAT-6 et CFP-10 mais sans impact sur l'interprétation des résultats

Auteurs	Pays	Test IDT ou localisation	Test INF γ	Contexte	Description du protocole	Résultats et interprétation
Coad <i>et al.</i> 2010	Royaume-Uni	IDS (PSC)	PPD-B et PPD-A	Terrain	IDS (PSC) + INF γ J ₀ , J ₃ et J ₁₀ en conditions d'infection naturelle	Augmentation sélective de la INF γ réponse à la PPD-B (pas à la PPD-A)
Lopes <i>et al.</i> 2012	Brésil	IDC	PPD-B	Terrain	2 troupeaux infectés et 2 « indemnes » (après IDC positif) testés par IDC + INF γ à J ₀ et J ₃	Pas de différence significative entre la réponse INF γ à J ₀ et J ₃
Jones <i>et al.</i> 2017	Royaume-Uni	IDC	INF γ -DIVA, avec ESAT-6/CFP-10 et Rv3615c	Expérimental	Scénario 1 : 89 bovins vaccinés puis infectés Scénario 2 : -73 bovins vaccinés puis infectés soumis au INF γ -DIVA pour confirmation de l'infection - 3 autres groupes testés : 35 bovins non vaccinés et infectés ; 30 bovins vaccinés et non infectés ; 11 bovins non vaccinés et non infectés	Scénario 1 : IDC positif = 89/89 ; INF γ -DIVA positif = 86/89 ; IFN γ PP D positif = 83/89 Scénario 2 : -augmentation significative de la réponse INF γ -DIVA 1 semaine après IDC (de 72,6 à 91,8%) : idem pour les bovins non vaccinés et infectés -augmentation significative des réponses PPD-A et PPD-B, une semaine après IDC chez les bovins infectés

PSC : pli sous caudal

➤ Facteurs pouvant interférer avec la réactivité des LT producteurs d'IFN γ après la réalisation du prélèvement :

Il s'agit essentiellement des facteurs agissant *in vitro* sur la conservation de la viabilité et de la réactivité des LT, entre le moment où le prélèvement est effectué et celui où le test est réalisé. Le test IFN γ reposant sur l'aptitude des LT à restituer leur niveau d'activation *in vivo*, les conditions de prélèvement, d'acheminement et de conservation des prélèvements, ainsi que les délais à respecter avant la réalisation du test sont critiques. Elles sont résumées par les préconisations suivantes, qui figurent sur la notice des tests de dosage de l'IFN γ , à savoir :

- la conservation des tubes de sang hépariné à température ambiante (22°C \pm 5°C) ;
- un délai entre la prise de sang et la stimulation des LT inférieur à 8 h.

Différents travaux ont ainsi mis en exergue la réduction de sensibilité du test résultant de l'allongement du délai maximal au-delà de 8 h, (Schiller *et al.* 2009, Whipple *et al.* 2001, Robbe-Austerman, Krull et Stabel 2006). Cependant, certains auteurs ont mis en doute la nécessité du respect d'un tel délai. Ainsi, selon Rothel *et al.* (1992), le délai maximum peut être repoussé à 30 h si l'IDT initiale a été réalisée dans les trois à 30 jours avant le prélèvement de sang. Lopes *et al.* (2012) concluent que la réalisation du test IFN γ 24 h et non 8 h maximum après le prélèvement du sang n'a pas d'impact sur les résultats. Quant à Waters et ses collaborateurs (Waters *et al.* 2007), après avoir testé différents délais et températures, ils concluent que la différence de réponse au test est minime lorsque l'échantillon a été maintenu à 4°C ou 2°C pendant 8 h ou 24 h avant la stimulation. En revanche, des différences sont perceptibles dans deux cas : si l'échantillon est testé immédiatement après prélèvement, la réponse est meilleure alors qu'inversement, s'il est conservé pendant 2 h à 37°C juste après la réalisation du prélèvement, la réponse IFN γ subit une nette diminution. Par ailleurs, des travaux récemment publiés en 2017 vont dans le sens du respect d'un délai de 8 h entre la réalisation du prélèvement et le démarrage du test, avec une tolérance pouvant aller jusqu'à 30 h (de Lisle, Green et Buddle 2017).

B- Facteurs en lien avec la réalisation du test de laboratoire

S'agissant de réactivité des lymphocytes *sensu stricto*, le facteur essentiel d'interférence est leur degré d'intégrité lors de leur stimulation par les antigènes au laboratoire. Cette intégrité résulte avant tout du temps d'acheminement (cf. ci-dessus) mais également du maintien de l'échantillon de sang à température ambiante ainsi que d'un court délai de traitement de cet échantillon après sa réception par le laboratoire. Comme précisé plus haut, de nombreux autres facteurs peuvent interférer avec le résultat final et sa fiabilité : les échantillons ne sont pas standardisés, la nature des antigènes utilisés peut être très variable (PPD et/ou ESAT-6/CFP-10), la méthodologie varie en fonction des fournisseurs, mais aussi la version du kit pour un fournisseur donné ; quant aux critères d'interprétation, ils diffèrent en fonction des pays et peuvent être évolutifs pour un même pays en fonction du temps, comme c'est le cas pour la France.

3.1.3 Modalités d'utilisation du test IFN γ en France et cadre réglementaire

3.1.3.1 Modalités d'utilisation

Le développement de tests *in vitro* capables de mesurer la production d'IFN γ par les LT sensibilisés issus de bovins infectés, a été considéré comme un progrès significatif en enrichissant l'arsenal des tests, et de surcroît en proposant des tests permettant une lecture objective, automatisée et standardisable. Le test IFN γ peut être utilisé en série ou en parallèle, en complément des tests d'IDT (sauf par dérogation, en Camargue, où l'utilisation de ce test est autorisée en première intention), et ce, dans deux situations (Tableau 6) :

- Utilisation en parallèle au test d'IDT afin d'augmenter la sensibilité de la détection des bovins infectés en cas d'abattage partiel progressif. Les animaux sont considérés comme réagissants dès lors qu'ils fournissent une réponse non négative à au moins l'un des deux tests. Ce protocole permet de proposer une alternative à l'abattage total, tout en assurant une plus grande garantie de détection des bovins infectés dans le contexte de l'abattage partiel progressif ;
- Utilisation en série au test d'IDT afin d'augmenter la spécificité du dépistage de la tuberculose, en cas de suspicion liée à une réponse non négative à un test d'IDT utilisé en première intention. Dans ce protocole, le test IFN γ est habituellement pratiqué trois jours après l'IDT, c'est-à-dire le jour de la lecture de cette dernière. Le recours à ce protocole a été préconisé notamment en France, en vue de conforter l'hypothèse de la non-spécificité de la réponse IDT non négative, dans un contexte de forte réduction de sa valeur prédictive positive (VPP). Cette dernière est liée à la fois à la diminution marquée de la prévalence de l'infection des cheptels, ainsi qu'à la diminution de la spécificité cheptel en lien avec l'augmentation de la taille des troupeaux.

Tableau 6 : Modalités d'utilisation du test IFNy en France

	Utilisation en parallèle avec l'IDT	Utilisation en série après l'IDT
Réalisation du test IFNy par rapport à l'IDT	Simultanément	Si réaction non négative à IDT (seulement si réaction douteuse à l'IDC en Côte-d'Or) ¹¹ → Lecture du résultat du test IFNy 3 jours après la réalisation de l'IDT
Plus-value test IFNy	Augmentation de la sensibilité	Augmentation de la spécificité
Indications	- Foyer confirmé : dépistage des bovins infectés lors d'assainissement par abattage partiel progressif ; - Élevage suspect : dépistage des bovins infectés si contexte de suspicion forte (facteurs de risque élevés).	- Dépistage dans les zones où des réactions non spécifiques sont nombreuses ; - Réduction du délai entre deux tests et tolérance de la circulation des autres bovins du troupeau
Quelle prise en compte du test	Résultat positif pour l'animal si réponse positive à au moins l'un des tests	- <u>Réponse IFNy positive</u> de l'animal suspect : abattage diagnostique - <u>Réponse IFNy négative</u> : autorisation de la circulation des bovins du troupeau ayant fourni une réponse négative à l'IDT à J ₃ , dans l'attente des résultats des tests IDC et IFNy à J ₄₂
Autorisation par la réglementation européenne (cf. <i>infra</i>)	Oui	Non

3.1.3.2 Cadre réglementaire

- Utilisation du test IFNy en parallèle au test IDT

Cette utilisation mise en œuvre dans le cadre d'assainissement de troupeaux infectés, est autorisée par la réglementation européenne (Directive 64/432/CEE) et elle est appliquée en France ainsi que dans de nombreux pays européens, dans le cadre de procédures d'abattage partiel progressif sélectif (lors de dérogation à l'abattage total) ou dans des cheptels en suivi renforcé (DGAL/SDSPA/2014-541).

- Utilisation en série du test IFNy dans le cadre du protocole expérimental en Côte-d'Or et Dordogne

Cette deuxième modalité d'utilisation, mise en œuvre dans le cadre du maintien de qualification indemne de cheptels, pourtant la plus utile *a priori* pour un pays avec une prévalence aussi faible que celle de la France et dans un contexte de lassitude marquée des acteurs, en particulier les éleveurs, n'est pas autorisée dans l'UE. Le recours à ce test constitue donc un écart majeur par rapport à la directive 64/432/CEE de l'UE qui ne reconnaît que l'IDT comme test de maintien de qualification. Pour les raisons explicitées ci-dessus, la France a obtenu de l'UE de pouvoir le tester en Côte-d'Or et en Dordogne, en

¹¹ L'IDC utilisée en 1^{ère} intention lors du dépistage

tant que protocole expérimental, durant deux saisons successives de prophylaxie (2013-2014 et 2014-2015) (DGAL/SDSPA/N2013-8162 et DGAL/SDSPA/2014-864).

Ce protocole, présenté dans l'Annexe 4, consiste à retester (entre J₃ et J₈ après IDT initiale), tous les bovins ayant fourni une réponse non négative à une IDS ou une réponse douteuse à une IDC. A noter que, compte tenu de la spécificité plus élevée de l'IDC, une réponse positive à une IDC initiale disqualifie ce protocole, la suspicion étant alors d'emblée considérée comme forte, ce qui entraîne alors la mise en place d'un APMS et le blocage de l'ensemble du troupeau (sauf dérogação).

Il est important de noter que, selon ce protocole, ne sont retestés à J₄₂ (en IDC et IFN γ) que les bovins ayant fourni une réponse non négative à une IDS initiale ou douteuse à une IDC initiale, alors que l'interprétation des tests IDC est supposée être réalisée à l'échelle du troupeau.

Le protocole en série a donc l'avantage de permettre, en cas de réponse négative au test IFN γ à J₃, de ne bloquer que les bovins ayant réagi en IDS à J₀, le temps de les retester par IDC à J₄₂ et/ou IFN γ à J₄₂. Une telle approche a l'avantage de ne pas bloquer tout un troupeau durant au moins six semaines supplémentaires. Elle a donc permis de renouer avec l'adhésion de nombreux éleveurs, parmi ceux concernés, au processus de dépistage de la tuberculose, comme le montrent les résultats favorables obtenus en Côte-d'Or depuis deux ans (Figure 3). En revanche, la mise en œuvre de ce même protocole en Dordogne, n'a pas permis d'obtenir une réduction significative du nombre de foyers déclarés. Les raisons susceptibles d'expliquer une telle divergence dans les résultats pourraient être imputables à divers facteurs liés aux élevages (structure et conduite des élevages, environnement des exploitations, etc.) ou à des facteurs humains (par exemple acceptabilité et pratique du dépistage) (Boireau 2015; F. Chevalier, communication personnelle).

- Utilisation du test IFN γ dans le cadre du protocole national

Depuis 2016, un protocole en série a été maintenu (DGAL/SDSPA/2016-1001) mais, compte tenu de sa non-autorisation actuelle par l'UE, les bovins non réagissants des troupeaux dans lesquels ce protocole est utilisé (mise en œuvre de la voie conservatoire en cas de suspicion faible) et dans lesquels ce protocole a conduit à la mise en évidence de bovins positifs à l'IDT et négatifs à l'IFN γ à J₃, ne peuvent circuler qu'à l'intérieur du territoire français tant qu'une IDC à J₄₂¹² n'a pas fourni de réponse négative sur les bovins ayant réagi à l'IDT à J₀. Cependant, ce protocole pourrait être autorisé prochainement dans toute l'UE.

- Cas particulier de la Camargue

La Camargue constitue un écosystème particulier, avec les races bovines de combat (Camargue et Espagnole), qui ne sont pas enclines à se laisser manipuler deux fois à trois jours d'intervalle, les lectures étant supposées être réalisées sur une base objective, donc au cutimètre. Le protocole national a constitué pendant des décennies un obstacle quasi-insurmontable au dépistage, ce qui explique une prévalence annuelle particulièrement élevée de cheptels infectés, avoisinant les 5 %. Pour cette raison, l'UE a exceptionnellement autorisé l'utilisation en première intention du test IFN γ en Camargue. Les effets en ont été très positifs : la fréquence a baissé, un seul foyer ayant été déclaré en 2018 (Figure 3).

¹² Délai minimal après une 1^{ère} IDT

3.1.4 Bilan des données bibliographiques de sensibilités et spécificités des tests IDT et IFN γ

Au bilan, les tests IDS et IDC permettant le dépistage *in vivo* des animaux infectés, reposent sur la détection de la réponse immunitaire à médiation cellulaire, spécifique de *M. bovis*. L'IDS ne permet pas de distinguer la réaction vis-à-vis des mycobactéries du complexe tuberculosis de celle vis-à-vis des antigènes communs présents chez les mycobactéries atypiques, alors que l'IDC basée sur la comparaison du niveau d'immunisation des animaux vis à vis de *M. bovis* et de *M. avium*, est plus à même de détecter des réactions croisées avec des mycobactéries atypiques.

Les données de la littérature (articles de méta-analyses et rapports) exploitées par le GT montrent une sensibilité médiane de l'IDS comprise entre 76,0 et 94,0 % et une spécificité médiane comprise entre 91,0 et 98,2 %. La sensibilité médiane de l'IDC est comprise entre 49,0 et 80,0 % alors que la spécificité médiane de ce test est élevée et peut atteindre 100 %, en fonction des études.

Par ailleurs, il ressort des auditions menées par le GT que la réalisation et la lecture des IDT sur le terrain en France ne sont pas de qualité suffisante. Une mise en pratique rigoureuse des tests IDT est nécessaire sur le terrain, notamment la mesure initiale du pli de peau avant injection (J_0) et lors de la lecture de la réaction (J_3) à l'aide d'un cutimètre. Cette observation est corroborée par plusieurs travaux qui ont soulevé le problème du non-respect des bonnes pratiques de réalisation des IDT en Belgique et en France (Humblet *et al.* 2011) avec comme conséquences, des erreurs au niveau de l'interprétation des résultats et une diminution des valeurs de sensibilité et de spécificité des tests IDT. D'ailleurs, pour l'IDS, la très grande majorité des vétérinaires sanitaires n'utilise pas de cutimètre pour évaluer l'inflammation : seule une inspection visuelle et éventuellement une palpation sont réalisées à ce stade.

Concernant les tests IFN γ , la mesure de la réponse immunitaire se fait *in vitro*, ce qui limite les biais liés au facteur terrain. Les données de la littérature (revues, méta-analyses et rapports) exploitées par le GT montrent que les valeurs médianes de sensibilité du test IFN γ sont comprises entre 73,6 et 92,5 %, et celles de la spécificité entre 84,3 et 97 %. Selon les experts, il est difficile de généraliser ces données et de les extrapoler au contexte d'utilisation du test IFN γ en France. Les deux principales raisons sont :

- les antigènes utilisés, sachant que la majorité des études utilisent les PPD A et B ou les antigènes recombinants ESAT-6 et CFP-10, mais n'utilisent pas les quatre de façon combinée ;
- les seuils de positivité, qui ne sont pas harmonisés et qui sont différents d'un pays à un autre.

En France, les travaux de Boireau (2015) ont montré que la sensibilité du test IFN γ avec une combinaison PPD + ESAT-6/CFP-10 variait de 93,0 à 97,0 % selon la prise en compte ou non des résultats non conclusifs comme positifs. Quant à la spécificité, elle variait de 46,0 à 82,4 % seulement, selon la prise en compte ou non des résultats non conclusifs comme résultats négatifs (Praud *et al.* 2019).

Il ressort des données de la littérature que :

- la sensibilité du test IFN γ utilisant les PPD est équivalente à celle du test utilisant les antigènes recombinants ESAT-6/CFP-10 ainsi qu'à celle du test IDS (et donc supérieure à celle de l'IDC).
- la spécificité du test IFN γ utilisant les PPD est proche de celle de l'IDT,
- la spécificité du test IFN γ utilisant les antigènes recombinants (ESAT-6 et CFP-10) est meilleure que celle des tests utilisant les PPD, mais elle reste plus faible que celle de l'IDC, selon les données fournies par la récente méta-analyse réalisée par Nuñez-García *et al.* (2018).

Cependant, les populations de référence supposées infectés (au sens réglementaire du terme) pour les essais de sensibilité et supposées indemnes (au sens réglementaire du terme) pour les essais de spécificité, ne sont pas caractérisés comme tels sans ambiguïté dans un certain nombre d'études. Par

ailleurs, s'ajoute à la variation des kits et antigènes utilisés selon les études, le fait que les méthodes de calcul et d'interprétation des résultats des tests IFN γ diffèrent selon les pays.

Le GT souligne qu'un effort d'homogénéisation est mené en France, en particulier au niveau de la réalisation du test ELISA. Ce travail d'harmonisation doit être poursuivi en France et à l'échelle européenne.

En ce qui concerne l'impact possible de facteurs en lien avec la réalisation du test IFN γ , la plupart des auteurs soulignent l'importance du facteur temps dans la préservation de l'intégrité des lymphocytes (acheminement de l'échantillon, délai entre la réception de l'échantillon et son traitement) et du facteur température (maintien de l'échantillon à température ambiante). S'y ajoutent tous les facteurs de laboratoire déjà développés plus haut, qui influent sur la sensibilité et la spécificité du test. Par ailleurs, les données bibliographiques relatives à l'impact d'une IDS au pli sous-caudal (PSC) ou d'une IDC initiale sur la réponse au test IFN γ réalisé, ne permettent pas de tirer de conclusion(s) convergente(s). Ceci est notamment lié à la disparité des conditions d'étude. Certains auteurs préconisent notamment de réaliser davantage d'études en conditions naturelles ou proches des conditions du terrain.

3.2 Analyses post-mortem

Les analyses *post mortem* débutent par l'inspection de la carcasse à l'abattoir qui est dans tous les cas un préalable aux analyses de laboratoire visant à confirmer ou à infirmer toute suspicion de tuberculose.

3.2.1 Inspection de la carcasse à l'abattoir

Elle est réalisée dans deux circonstances :

- de façon systématique, pour tout bovin abattu : elle peut alors aboutir à la mise en évidence de lésions évocatrices. Cette circonstance ne sera pas évoquée ici car elle sort du champ de la saisine. En revanche, les experts soulignent que le nombre de déclarations de lésions à l'abattoir est un indicateur pertinent pour évaluer la performance d'un système de surveillance. Les valeurs de sensibilité et de spécificité de cette inspection ont été évaluées par l'EFSA (2012) (sensibilité de 71 % [38-92] ; spécificité de 100 % [99-100]). Les experts considèrent que cette valeur de spécificité est fortement surestimée, les lésions macroscopiques n'étant pas pathognomoniques de la tuberculose, différentes autres étiologies, infectieuses ou non (notamment tumorales) pouvant induire des lésions similaires. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle la réglementation impose que les lésions macroscopiques rencontrées à l'abattoir et susceptibles d'être imputables à la tuberculose ne soient qualifiées que « d'évocatrices de tuberculose » et exige une confirmation par le laboratoire de diagnostic. Ces valeurs permettent d'évaluer des seuils de déclaration minimale, en fonction du nombre d'animaux abattus et de la prévalence supposée ;
- en cas de suspicion de tuberculose en élevage, chez des animaux ayant fourni un résultat non négatif à un test de tuberculination et/ou à un test IFN γ : l'inspection se situe alors dans le cadre d'un abattage dit diagnostique, beaucoup plus approfondie que les inspections systématiques. Les bovins sont marqués, envoyés à l'abattoir sous couvert d'un laissez-passer sanitaire et examinés soit un jour particulier, soit en fin de chaîne. La demande d'abattage diagnostique conduit à la recherche de lésions macroscopiques sur des organes susceptibles d'en présenter, ainsi que des nœuds lymphatiques satellites des principales portes d'entrée (« ganglions de l'inspecteur »). L'inspection réalisée dans ce cadre particulier donne lieu à des prélèvements pour analyse au laboratoire, que les bovins aient ou non présenté des lésions macroscopiques évocatrices. Dans

le second cas (absence de lésions), seuls les nœuds lymphatiques des principales portes d'entrée sont prélevés. D'après la note de service de la DGAL (DGAL/SDSPA/N2013-8202), doivent alors être « prélevés systématiquement les paires de nœuds lymphatiques rétropharyngiens, trachéobronchiques, médiastinaux et, dans la mesure du possible, un nœud lymphatique mésentérique ». Les prélèvements réalisés sont adressés au laboratoire agréé le plus proche. Celui-ci est tenu de réaliser « une dissection minutieuse des prélèvements » avant d'effectuer la prise d'essai requise pour pouvoir réaliser les recherches bactériologiques par PCR et culture. Ainsi, si des lésions sont mises en évidence, le laboratoire agréé enverra une partie du prélèvement porteur de lésions, après fixation, à un autre laboratoire agréé pour les analyses histologiques. Lorsque le résultat de la culture est positif, la qualification de « mycobactérie présomptive » est portée et l'isolat est adressé par le laboratoire agréé au LNR Tuberculose de l'Anses de Maisons-Alfort pour confirmation, identification et typage moléculaire.

3.2.2 Analyses de laboratoire

Deux types d'analyses peuvent être réalisés :

- Analyses anatomo-pathologiques :

Elles consistent en la recherche de lésions granulomateuses évocatrices de tuberculose et à la recherche de bacilles acido-alcool-résistants (BAAR). Associées à une IDC positive chez le même animal, elles permettent de confirmer une suspicion de tuberculose. Dans tous les autres cas, elles ne permettent que de conforter une suspicion.

- Analyses bactériologiques :

En cas de positivité, ces tests permettent de confirmer de façon incontestable une suspicion de tuberculose. Il s'agit :

- d'une part, de l'isolement et de l'identification de *M. bovis*, *M. caprae* ou *M. tuberculosis* après mise en culture de l'échantillon. Cette méthode classique de confirmation, dont la spécificité est de 100 %, a l'inconvénient d'être chronophage (plusieurs semaines) et d'une faible sensibilité ;
- d'autre part, de l'amplification par PCR de séquences spécifiques du complexe tuberculosis voire de séquences spécifiques de l'une des espèces de ce complexe citées ci-dessus. La PCR peut être réalisée directement à partir du prélèvement, sous réserve de l'absence d'inhibiteurs (dans ce cas, la dilution du prélèvement peut dans certains cas résoudre le problème).

L'identification de l'espèce en cause peut être complétée par le typage par spoligotypage et MLVA (Multiple Loci VNTR Analysis).

4 Analyse des données IDT et IFN γ dans le cadre du protocole expérimental pour la période 2013-2015

4.1 Description de la base de données

Les données transmises au GT sous format d'un fichier Excel[®] comportaient au total 18 267 lignes correspondant à 14 270 bovins (jusqu'à trois lignes par bovins) provenant de 1 395 élevages, pour les deux campagnes de prophylaxie 2013-2014 et 2014-2015. Ces données ont été recueillies sur une période allant de février 2013 à décembre 2015, pour 11 départements : Ardennes (08), Ariège (09), Charente (16), Côte-d'Or (21), Dordogne (24), Gers (32), Lot-et-Garonne (47), Pyrénées-Atlantiques (64), Hautes-Pyrénées (65), Tarn (81) et Haute-Vienne (87). Les rythmes de prophylaxie, tels que communiqués par la DGAL pour la période 2013-2015, sont ceux indiqués dans le Tableau 7. Il est à noter également que cette base de données a été exploitée sous différents aspects analytiques et a fait l'objet de plusieurs études publiées (Boireau 2015, Praud, Boireau et Dufour 2016, Praud *et al.* 2015, Praud *et al.* 2019) (cf. paragraphe 3.1.3.2).

Tableau 7 : Rythmes de prophylaxie pour les 11 départements de la base de données, pour la période 2013-2015

Zonage ¹³	Annuel	Biennal	Triennal	Arrêt
Ardennes (08) Charente (16) Dordogne (24) Pyrénées-Atlantiques (64) Haute-Vienne (87)	Côte-d'Or (21)	Lot-et-Garonne (47)	Ariège (09) Gers (32) Hautes-Pyrénées (65)	Tarn (81)

La base de données comportait les résultats des tests IDT avec une distinction IDS et IDC, et des tests IFN γ . Concernant les tests réalisés au premier contrôle :

- le résultat de l'IDT initiale ou IDT J₀ désigne l'IDT réalisée à J₀ et lue à J₃ ;
- le résultat IFN γ J₃ désigne le test IFN γ réalisé en série le jour de la lecture (J₃) de l'IDT initiale.

Les résultats de ces deux tests étaient inscrits à la même date pour la majorité des données transmises (F. Chevalier, communication personnelle).

Concernant les tests réalisés au deuxième contrôle soit après l'IDT initiale, les délais de réalisation des tests IDT, tels que renseignés dans la base de données, pouvaient varier entre 35 et 68 jours. Dans la suite du rapport, les tests IDT et IFN γ réalisés au deuxième contrôle seront intitulés respectivement « IDT J₄₂ » et « IFN γ J₄₂ ».

¹³ Zonage : périodicité des tuberculinations selon la zone concernée.

Les animaux de la base de données étaient répartis en trois groupes :

- « Protocole » : il s'agit d'animaux testés en prophylaxie et qui ont intégré le protocole expérimental suite à l'obtention d'un résultat non négatif à l'IDT à J₀ ;
- « Suivi renforcé » (SR) : cette dénomination est propre au département de la Dordogne¹⁴ et correspond aux animaux appartenant à des élevages en lien épidémiologique avec un foyer de tuberculose, où les bovins pouvaient avoir des contacts fréquents sur des parcelles mitoyennes ;
- « Issu » : il s'agit des animaux issus de foyers en assainissement par abattage partiel progressif.

Afin de pouvoir analyser les résultats, un important travail de « nettoyage » (suppression des doublons, des données erronées ou incomplètes, correction de dates) a été effectué et chaque bovin a été attribué à une ligne du fichier. De plus, certaines données incomplètes et relatives, en particulier, au type d'IDT ont été renseignées ou corrigées après échange avec la DGAL.

4.2 Mise à jour des seuils d'interprétation du test IFN γ

Au cours de l'audition de Maria-Laura Boschioli (Responsable LNR Tuberculose - Anses), il a été signalé au GT que les seuils d'interprétation des résultats du test IFN γ pour le Kit Bovigam™, ont subi des évolutions depuis 2013. En effet, ces seuils avaient d'abord été présentés dans une note de service de la DGAL (DGAL/SDSPA/2013-8162). Toutefois, afin d'améliorer la spécificité du protocole expérimental sans en détériorer la sensibilité, une première analyse menée par la Cellule Inter-Régionale d'Epidémiologie Vétérinaire (CIREV) de Bourgogne avait permis d'ajuster ces seuils. Ces derniers ont été finalement validés par le LNR Tuberculose de l'Anses Maisons-Alfort et sont présentés dans le Tableau 8. L'interprétation finale du test IFN γ résulte de la combinaison des résultats de trois ratios pour conclure sur la base de trois catégories (positif, négatif ou non conclusif). Ces ratios sont calculés à partir des DO obtenues par stimulation avec les PPD (PPD-B et PPD-A) et les antigènes recombinants ESAT-6/CFP-10, d'après les formules suivantes (Praud *et al.*, 2019 ; note de service DGAL/SDSPA/2014-864)¹⁵.

Ratio PPD = (DO PPD-B – DO PPD-A) / [3 x (DO TP – DO TN)];

Ratio PPD-B = (DO PPD-B – DO PBS) / [3 x (DO TP – DO TN)];

Ratio (ESAT-6/CFP-10) = [DO (ESAT-6/CFP-10) – DO PBS] / [3 x (DO TP – DO TN)];

Tableau 8: Grilles d'interprétations des résultats du test IFN γ (kit Bovigam™) élaborées en 2014. Le tableau de gauche porte sur l'interprétation des calculs des trois ratios et le tableau de droite porte sur l'interprétation finale des résultats combinés de ces ratios (DGAL/SDSPA/2014-864)

Interprétation	Ratio PPD	Ratio MIX-EC	Ratio PPD B	Ratio PPDs			
				< 0,05	≥ 0,05	≥ 0,3	
Négatif	PPD < 0,05	MIX-EC < 0,03	PPD B ≤ 0,7	< 0,03	Négatif	Non conclusif	Positif
Positif	0,05 ≤ PPD < 0,3	0,03 ≤ MIX-EC < 0,1	PPD B > 0,7		≥ 0,03	Non conclusif	Positif
Positif fort	PPD ≥ 0,3	MIX-EC ≥ 0,1	sans objet	≥ 0,1	Positif si PPDB > 0,7	Positif	

¹⁴ Ainsi qu'au département de la Charente. Cependant la base de données ne comportait pas d'animaux « SR » en provenance de la Charente

¹⁵ Le détail de la formule normalisée pour le dosage de l'IFN γ par le kit Bovigam™ est disponible dans l'Annexe 6

C'est en fonction de ces seuils établis en 2014, que les analyses des résultats du test IFN γ pour le kit Bovigam™ ont été conduites par le GT. Etant donné que pour la campagne de prophylaxie 2013-2014, l'interprétation des résultats avait été faite en utilisant les anciens seuils, une mise à jour de l'interprétation des résultats sur la base de ces nouveaux seuils a été effectuée dans la base de données, avec réinterprétation des résultats pour les bovins concernés¹⁶.

Le GT souligne que certains résultats de la base de données étaient initialement déterminés comme « ininterprétables ». En effet :

- en cas de production d'IFN γ dans le puits contenant le témoin négatif (TN), on considère que cette production n'est pas spécifique. Les résultats du test sont alors considérés comme « ininterprétables » ;
- l'absence de production d'IFN γ dans le puits contenant le témoin positif (TP) est considérée comme reflétant une altération de la viabilité des cellules. Les résultats du test sont alors considérés comme « ininterprétables ». Néanmoins, une exception est faite lorsque les antigènes spécifiques (PPD-A, PPD-B et ESAT-6/CFP-10) induisent la production d'IFN γ . Dans ce cas, la viabilité des cellules ne peut être mise en cause et les résultats sont alors considérés comme « interprétables ».

Il est à noter que tous les résultats de la base de données initialement déterminés comme « ininterprétables » ont finalement pu être interprétés sur la base des critères précisés ci-dessus.

4.3 Sélection des individus infectés

La base de données a permis d'identifier 114 animaux infectés provenant de 75 élevages, qui ont fourni des résultats positifs pour *M. bovis* en culture et / ou par PCR sur lésions et / ou nœuds lymphatiques. Ces animaux reconnus infectés selon la réglementation, ont servi de population de référence pour l'estimation des valeurs de sensibilité à partir des données de terrain. La répartition finale de ces animaux infectés est présentée dans le Tableau 9.

Tableau 9: Répartition des 114 animaux infectés (et de leurs élevages) selon leur département d'origine pour la période 2013-2015

Département	Nombre d'animaux infectés « protocole » (nombre d'élevages)	Nombre d'animaux infectés « SR » (nombre d'élevages)
Charentes (16)	10 (8 élevages)	-
Côte-d'or (21)	24 (19 élevages)	-
Dordogne (24)	34 (23 élevages)	38 (17 élevages)
Lot-et-Garonne (47)	4 (4 élevages)	-
Hautes-Pyrénées (64)	2 (1 élevage)	-
Pyrénées-Atlantiques (65)	3 (1 élevage)	-
Total	77 (56 élevages)	38 (17 élevages)

- : non concerné

¹⁶ Pour les animaux infectés (cf. *infra*), le changement de seuil n'a pas modifié l'interprétation des résultats. En revanche, pour les animaux « indemnes » (cf. *infra*), 7 % des résultats du test ont été modifiés. Cette modification a principalement concerné les résultats non conclusifs : ainsi, 6 % et 10 % des résultats qui étaient considérés comme non conclusifs avec les anciens seuils sont devenus négatifs et positifs respectivement avec les nouveaux seuils.

Au final, 77 animaux ont été inclus dans le cadre du protocole, 36 dans le cadre du suivi renforcé et deux en tant qu'issus de foyers. Bien que la somme de ces nombres soit égale à 115, le total à prendre en compte est bien de 114 animaux. En effet, un bovin inclus en « SR » au cours de la campagne 2013-2014 a été intégré en « protocole » à la campagne 2014-2015, en raison du changement du statut de l'élevage auquel il appartenait.

4.4 Sélection des individus « indemnes »

La base de données a permis d'identifier au départ 3 411 animaux reconnus indemnes selon la réglementation car provenant de 789 élevages officiellement indemnes. Ces animaux, qui avaient donc tous fourni un résultat négatif en IDT ont servi de population de référence pour l'estimation des valeurs de spécificité à partir des données de terrain. Les experts soulignent toutefois que la majorité de ces animaux proviennent de départements à risque, que la valeur prédictive négative (VPN) des tests IDT n'est pas de 100 % dans un tel contexte, avec des tests dont la sensibilité n'est pas de 100 %.

Dans la suite du rapport, sur la base des informations disponibles, les experts ont considéré qu'*a minima*, il convenait de s'assurer que les élevages inclus dans la catégorie des élevages indemnes dans la base de données n'avaient pas été déclarés infectés ultérieurement, soit jusqu'à 2018. Il s'est avéré que deux élevages ont été reconnus infectés entre 2015 et 2018, ils ont donc été exclus de la base de données des élevages indemnes.

Après suppression des doublons, de données erronées ou incomplètes et correction de certaines dates, 1 520 animaux « protocole » et 666 animaux « SR », reconnus indemnes, ont été retenus dans la base de données pour la suite des travaux.

4.5 Analyse des données de sensibilité apparente

En préambule, il convient de préciser que la sensibilité déterminée ci-après ne représente pas la sensibilité intrinsèque des tests. En effet, les experts n'ont eu accès qu'à un effectif de 114 animaux infectés. En outre, pour les tests IDT, la sensibilité intègre l'ensemble des facteurs de terrain (modalités de réalisation et effet opérateur notamment) pouvant influencer sur les résultats du test. Pour le test IFN γ , les antigènes utilisés, les seuils utilisés et les modalités d'interprétation peuvent aussi avoir une influence sur les résultats. De ce fait, dans la suite du rapport, le terme sensibilité sera à comprendre au sens de sensibilité apparente.

La sensibilité des tests IDT et IFN γ a été déterminée à partir des données issues des 114 animaux infectés¹⁷. Le critère d'entrée des animaux « protocole » et des animaux « SR » n'étant pas le même, les calculs ont été faits séparément pour chaque groupe. Les animaux provenant du groupe « Issu » (pour rappel, il s'agit des animaux issus de foyers en assainissement par abattage partiel progressif), n'ont pas été exploités, seuls deux animaux ayant été enregistrés dans la base de données pour cette catégorie. Par ailleurs, pour deux animaux « SR », la nature du test IDT n'était pas indiquée à J₄₂. Le GT a donc considéré qu'il s'agissait d'une IDC, conformément à la réglementation. De plus, concernant les tests réalisés au deuxième contrôle soit après l'IDT initiale, 18 animaux infectés avaient été soumis au test IDC

¹⁷ Calcul de la sensibilité : nombre d'animaux ayant fourni un résultat positif au test / nombre total d'animaux infectés

avec un délai compris entre 35 et 41 jours. Le Tableau 10 montre le nombre d'animaux ayant donné un résultat non négatif à l'IDC en fonction du délai entre les deux IDT. Les animaux « SR » et « protocole » ont été regroupés pour cette analyse. Le test Chi 2 (chi 2 observé = 2,42, 1 degré de liberté) réalisé ne permet pas de montrer de différence significative ($p = 0,12$) entre les deux groupes (premier groupe avec des délais IDT entre 35 et 41 jours et deuxième groupe avec des délais IDT de 42 jours et plus). Un effet de la date de réalisation ne peut pas être exclu, cependant la sensibilité reste relativement faible (50 %) pour les tests réalisés après 42 jours. La faible sensibilité apparente observée pour l'IDC J₄₂ ne semble donc pas s'expliquer entièrement par un non respect du délai réglementaire d'au moins 42 jours entre les deux IDT.

Tableau 10 : Résultats des tests IDC en fonction de l'intervalle entre la première et la deuxième IDT

IDC \ Nombre d'animaux	Nombre d'animaux ayant été testés à l'IDC avec un délai inférieur à 42 jours (35-41 jours)	Nombre d'animaux ayant été testés à l'IDC avec un délai supérieur à 42 jours (42-68 jours)	Total
Résultat négatif à l'IDC J42	13	18	31
Résultat non-négatif à l'IDC J42	5	18	23
Total	18	36	54

Concernant les tests IFN γ , les données utilisant de manière combinée les PPD et les antigènes recombinants ESAT-6/CFP-10, ont été exploitées par le GT, en se basant sur la grille d'interprétation (Tableau 8). Le calcul de la sensibilité a été fait au niveau individuel et au niveau troupeau.

Il convient de noter que les animaux inclus dans le protocole l'ont été sur la base d'une réponse non négative à l'IDT à J₀. Les animaux ayant fourni un résultat négatif à J₀ et qui auraient fourni un résultat positif (voire non conclusif) au test IFN γ à J₃, ne sont donc pas renseignés dans la base de données. Il en résulte que la sensibilité individuelle et la sensibilité troupeau du test IFN γ pourraient être sous-estimées dans le cadre du protocole. A l'appui de cette remarque, il est à noter que parmi les 36 animaux « SR » de la base de données déclarés infectés, 17 avaient fourni un résultat négatif à l'IDT réalisée à J₀ mais un résultat positif à J₃ au test IFN γ . Inversement, un effet de sur-estimation pourrait être à l'œuvre, dans la mesure où la base de données ne donne pas accès aux bovins ayant fourni une réponse initiale négative en IDT et qui auraient été soumis au test IFN γ à J₃ et auraient fourni une réponse également négative. Cependant, deux éléments ne plaident pas dans ce sens : d'une part le fait que le test IFN γ est réputé aussi sensible et plus précoce que l'IDS (et *a fortiori* plus sensible que l'IDC), et d'autre part, pour autant que ces résultats puissent être pris en compte, la sensibilité du test IFN γ à J₃ est nettement plus élevée par rapport à l'IDS à J₀, dans le groupe des animaux « SR ».

4.5.1 Calcul de la sensibilité individuelle apparente

4.5.1.1 Animaux « protocole »

Le critère d'entrée étant un résultat IDT à J₀ non négatif, il n'a pas été possible de calculer la sensibilité du test IDT à J₀ pour les animaux « protocole ». En revanche, pour l'IFN γ à J₃, la sensibilité du test est de 93,5 % [84,9-98] si uniquement les résultats positifs sont pris en compte, ou de 97,4 % [90,1-100] si les résultats non conclusifs sont inclus dans les résultats positifs (Tableau 11). Concernant les tests réalisés à J₄₂, la sensibilité de l'IDC est de 38,9 % [23,6-56,3] et celle de l'IFN γ de 80,5 % [64,6-91,1] si uniquement les résultats positifs sont pris en compte, ou de 95,1 % [82,2-100] si les résultats non conclusifs sont inclus dans les résultats positifs (Tableau 11).

Tableau 11: Valeurs de sensibilité apparente des tests IDC (J₄₂) et IFN γ (J₃ et J₄₂) pour les animaux « protocole »

Test utilisé	Nombre total de bovins infectés testés	Nombre de bovins ayant fourni un résultat non négatif en IDC	Nombre de bovins ayant fourni un résultat positif et/ou NC en IFN γ		Sensibilité [IC à 95 %]
IDC J ₄₂	36	14	-		38,9 % [23,6-56,3]
IFN γ J ₃	77	-	positif	72	93,5 % [84,9-98,0]
			positif ou NC	75	97,4 % [90,1-100]
IFN γ J ₄₂	41	-	positif	33	80,5 % [64,6-91,1]
			positif ou NC	39	95,1 % [82,2-100]

NC : non conclusif ; IC : intervalle de confiance ; - : non concerné

4.5.1.2 Animaux « SR »

Il ressort du Tableau 12 que la sensibilité du test IDT à J₀ est de 30,6 % [29,2-31,9] et celle de l'IFN γ à J₃ de 75,0 % [73,6-76,4] si uniquement les résultats positifs sont pris en compte, ou de 86,1 % [84,7-87,5] si les résultats non conclusifs sont inclus dans les résultats positifs.

Concernant les tests réalisés à J₄₂, la sensibilité de l'IDC est de 50,0 % [47,7-52,3] et celle de l'IFN γ de 89,7 % [87,9-91,4] si uniquement les résultats positifs sont pris en compte, ou de 96,5 % [94,8-98,2] si les résultats non conclusifs sont inclus dans les résultats positifs.

Tableau 12 : Valeurs de sensibilité apparente des tests IDT (J₀ et J₄₂) et IFN γ (J₃ et J₄₂) pour les animaux « SR »

Test utilisé	Nombre total de bovins infectés testés	Nombre de bovins ayant fourni un résultat non négatif en IDT	Nombre de bovins ayant fourni un résultat positif et/ou NC en IFN γ		Sensibilité [IC à 95 %]
IDT J ₀	36	11	-		30,6 % [29,2-31,9]
IDC J ₄₂	22	11	-		50,0 % [47,7-52,3]
IFN γ J ₃	36	-	positif	27	75,0 % [73,6-76,4]
			positif ou NC	31	86,1 % [84,7-87,5]
IFN γ J ₄₂	29	-	positif	26	89,7 % [87,9-91,4]
			positif ou NC	28	96,5 % [94,8-98,2]

NC : non conclusif ; IC : intervalle de confiance ; - : non concerné

Tableau 13 : Résultats des tests IDS à J₀ et IDT à J₄₂ des 22 animaux testés à ces deux périodes

IDS J ₀ \ IDC J ₄₂	IDC positif	IDC négatif	IDC douteux	Total
IDS positif	3	3	1	7
IDS négatif	2	8	5	15
IDS douteux	0	0	0	0
Total	5	11	6	22

Il est important de noter que huit animaux ayant donné un résultat positif en IDS à J₀ ont été abattus avant d'être testés à J₄₂. Ils ne sont donc pas intégrés dans ce tableau. La sensibilité à J₀ de l'IDS ne peut donc pas être calculée à partir des valeurs présentées.

4.5.2 Calcul de la sensibilité collective apparente

Dans la suite du rapport, le terme de sensibilité collective sera employé pour qualifier la sensibilité apparente à l'échelle du troupeau. Afin de calculer la sensibilité des tests IDT et IFN γ à l'échelle du troupeau, il a d'abord été nécessaire de calculer le nombre moyen d'animaux confirmés infectés par élevage. Il ressort des figures 7 et 8 que 78 % des élevages « protocole » (total de 57 élevages) et 50 % des élevages « SR » (total 18 élevages) n'avaient qu'un seul animal reconnu comme infecté. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Bénét et Dufour (2014) qui indique que dans 66 % des élevages déclarés infectés, seuls un à trois animaux avaient été trouvés réagissants à l'IDT, pour la période 2005-2007. Les valeurs de sensibilité des tests IFN γ à J₃ et IDC à J₄₂ ont été calculées au niveau du troupeau en appliquant la formule : $Se(T) = 1 - (1 - Se\ Ind)^n$ avec n = nombre d'animaux infectés par élevage, $Se(T)$ = sensibilité troupeau et $Se\ Ind$ = sensibilité individuelle. Les résultats obtenus sont présentés dans les Figures 7 et 8.

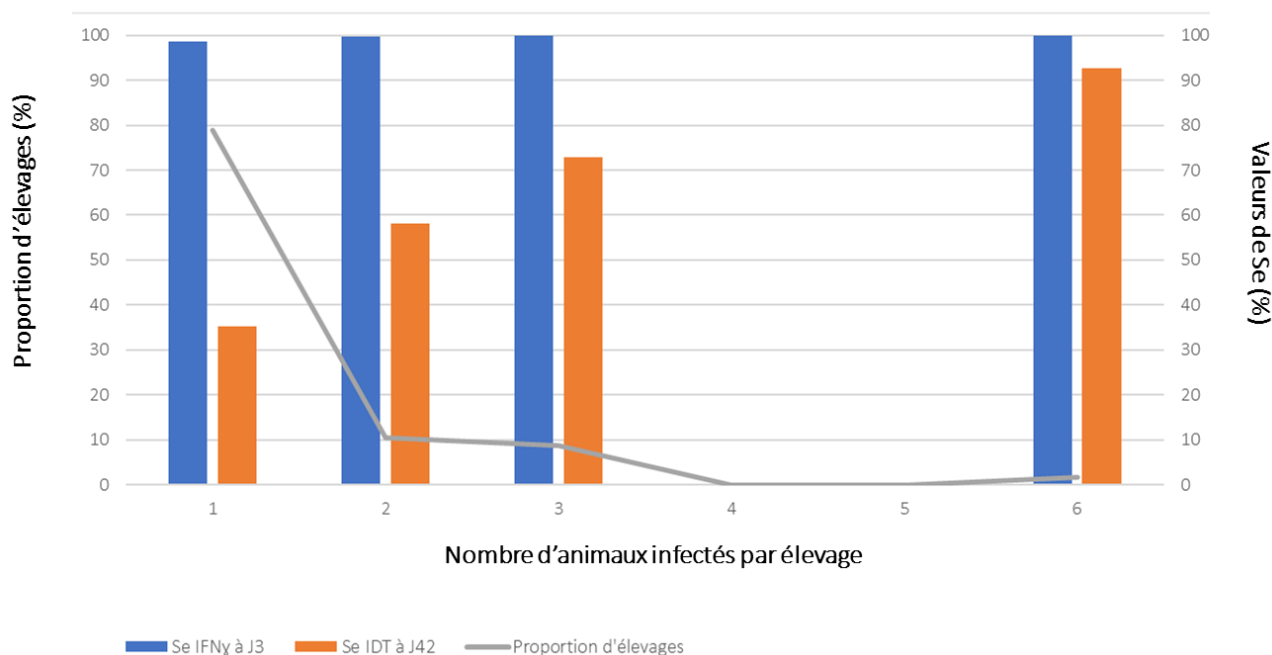


Figure 7 : Valeur de la sensibilité troupeau des tests IDT à J₄₂ et IFN γ à J₃ pour les animaux « protocole »

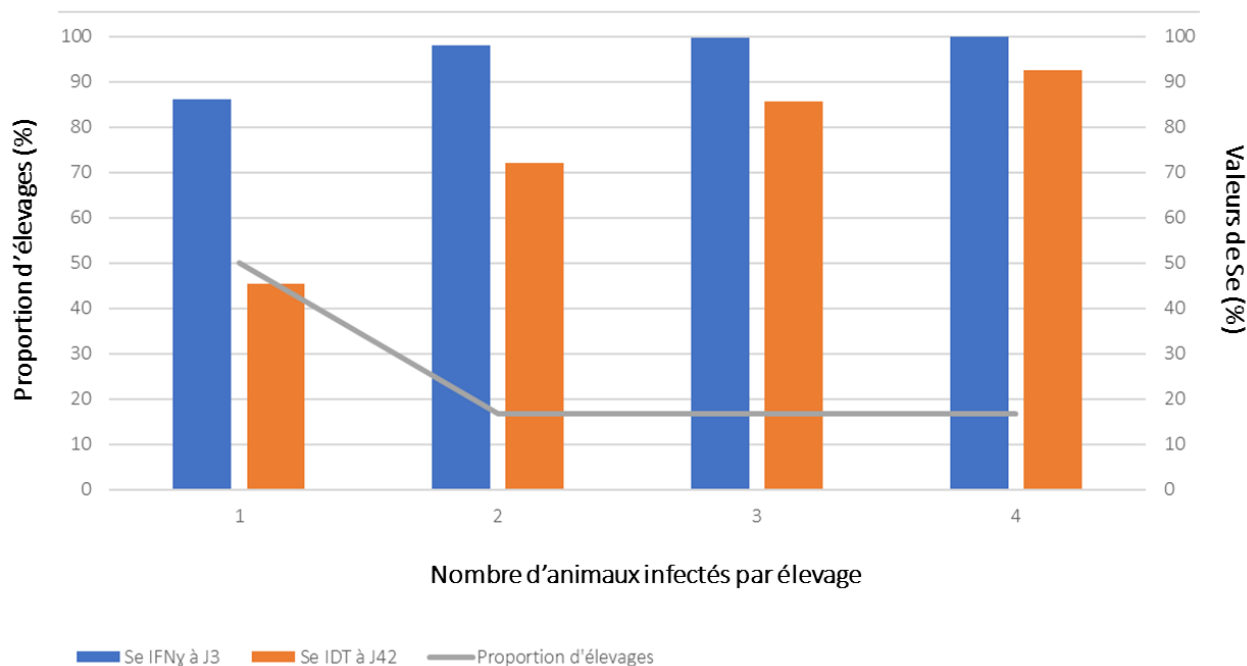


Figure 8 : Valeurs de la sensibilité troupeau des tests IDT à J₄₂ et IFN γ à J₃ pour les animaux « SR »

Ces résultats montrent que, même en prenant en compte la sensibilité troupeau, la sensibilité du test IFN γ réalisé à J₃ est systématiquement supérieure à celle du test IDC réalisé à J₄₂ pour les campagnes de prophylaxie 2013-2014 et 2014-2015.

En résumé, concernant la sensibilité individuelle apparente, il n'a pas été possible de calculer à partir de la base de données la sensibilité du test IDT à J₀ pour les animaux « protocole », le critère d'entrée dans le protocole étant un résultat IDT à J₀ non négatif. En revanche, pour l'IFN γ à J₃, la sensibilité du test est de 93,5 % si uniquement les résultats positifs sont pris en compte, ou de 97,4 % si les résultats non conclusifs sont inclus dans les résultats positifs. Concernant les tests réalisés à J₄₂, la sensibilité de l'IDC est de 38,9 % et celle de l'IFN γ de 80,5 % si uniquement les résultats positifs sont pris en compte, ou de 95,1 % si les résultats non conclusifs sont inclus dans les résultats positifs.

Pour les animaux en suivi renforcé (« SR »), la sensibilité du test IDT à J₀ est de 30,6 % et celle de l'IFN γ à J₃ de 75,0 % si uniquement les résultats positifs sont pris en compte, ou de 86,1 % si les résultats non conclusifs sont inclus dans les résultats positifs. Concernant les tests réalisés à J₄₂, la sensibilité de l'IDC est de 50,0 % et celle de l'IFN γ de 89,7 % si uniquement les résultats positifs sont pris en compte, ou de 96,5 % si les résultats non conclusifs sont inclus dans les résultats positifs. Le GT souligne que dans tous les cas, la sensibilité du test IFN γ est supérieure à celle du test IDT.

Concernant la sensibilité collective apparente, il ressort de la base de données que 78 % des élevages « protocole » et 50 % des élevages « SR » n'avaient qu'un seul animal reconnu comme infecté. Ces résultats sont en accord avec des données françaises antérieures selon lesquelles, dans 66 % des élevages déclarés infectés, seuls un à trois animaux avaient été trouvés réagissants à l'IDT. Ces résultats montrent que, même en prenant en compte la sensibilité troupeau, la sensibilité du test IFN γ réalisé à J₃ est systématiquement supérieure à celle du test IDC réalisé à J₄₂, pour les campagnes de prophylaxie 2013-2014 et 2014-2015.

4.6 Analyse des données de spécificité apparente

En préambule, il convient de préciser que la spécificité déterminée ci-après ne représente pas la spécificité intrinsèque des tests. En effet, pour les tests IDT, la spécificité intègre l'ensemble des facteurs de terrain (modalités de réalisation et effet opérateur notamment) pouvant influencer sur les résultats du test. Pour le test IFN γ , les antigènes utilisés, les seuils utilisés et les modalités d'interprétation peuvent aussi avoir une influence sur les résultats. En outre, la spécificité individuelle des tests IDT et IFN γ a été déterminée à partir des données issues des animaux « indemnes » pour les animaux « protocole » et « SR ». Ces résultats doivent donc être considérés avec prudence, compte tenu des incertitudes sur la réalité du statut indemne des animaux pour des raisons techniques et épidémiologiques, particulièrement dans les zones à risque.

Pour toutes les raisons énoncées ci-dessus, le terme spécificité sera à comprendre au sens de spécificité apparente, dans la suite du rapport.

La spécificité collective n'a pas été calculée pour les animaux « protocole » dans la mesure où les données analysées par le GT ne sont pas représentatives de la population générale mais uniquement des animaux ayant fourni un résultat non négatif à l'IDT J₀. De plus, le test IFN γ n'est pas utilisé en première intention, mais seulement sur les animaux ayant présenté une réponse non négative en IDT à J₀. Son usage est donc limité à un contexte particulier. Ce test n'est donc pas utilisé comme un test collectif et n'est ainsi pas susceptible de fournir des réponses faussement positives accrues par le nombre d'animaux testés à une telle échelle et ce, d'autant plus que le test IFN γ n'est autorisé à J₃ qu'en cas de suspicion faible.

La spécificité collective n'a pas été calculée non plus pour les animaux « SR », étant donné qu'il s'agit d'animaux appartenant à des élevages à risque élevé d'être infectés et qui, outre le fait que l'échantillonnage est faible quantitativement, n'est surtout pas représentatif d'une population d'animaux indemnes.

Dans la base de données, le taux de troupeaux « indemnes » dans lesquels un seul animal a été trouvé réagissant à J₀ est de 40 % pour le groupe « protocole » et de 10 % pour le groupe « SR ». Cependant, il convient de tenir compte pour l'interprétation de ces valeurs, de la qualité de la mise en œuvre des tests sur le terrain.

Concernant les tests IFN γ , les données utilisant de manière combinée les PPD et les antigènes recombinants ESAT-6/CFP-10 ont été exploitées par le GT, en utilisant la grille d'interprétation (Tableau 8). L'interprétation de la spécificité des tests variant en fonction du contexte épidémiologique, le GT a décidé de distinguer les résultats de Dordogne et Côte-d'Or et ceux des autres départements¹⁸. Concernant les résultats douteux de l'IDT et ceux non conclusifs pour l'IFN γ , ils ont été inclus dans les résultats positifs pour la Dordogne et la Côte-d'Or, et dans les résultats négatifs pour les autres départements.

¹⁸ Ardennes (08), Ariège (09), Charente (16), Gers (32), Lot-et-Garonne (47), Pyrénées-Atlantiques (64), Hautes-Pyrénées (65), Tarn (81) et Haute-Vienne (87)

4.6.1 Spécificité individuelle apparente des animaux « protocole »

L'estimation de la spécificité des animaux « protocole » s'est faite à partir de 1 520 animaux : 572 animaux provenaient de la Côte d'Or, 676 de Dordogne et 272 des autres départements.

Dans la mesure où les animaux ont été sélectionnés sur la base d'un résultat non négatif au test IDT initial, la spécificité de ce test à J₀ ne peut être calculée¹⁹. Pour les départements de la Dordogne et de la Côte-d'Or, la spécificité du test IFN γ à J₃ est de 43,9 % [41,1 - 46,7]. Selon les experts, ces faibles valeurs de spécificité seraient dues à la sélection des animaux, faite précisément en raison d'un résultat non négatif à l'IDT initiale. Pour les tests réalisés à J₄₂, la spécificité de l'IDT est plus élevée que celle de l'IFN γ (88,5 vs 60,6 %) malgré l'utilisation d'antigènes dits « spécifiques ».

Tableau 14 : Valeurs de spécificité apparente des tests IDT et IFN γ pour les animaux « protocole » issus d'élevages « indemnes » de la Côte-d'Or et de Dordogne

Test utilisé	Nombre total de bovins "indemnes"	Nombre de bovins ayant fourni un résultat négatif	Spécificité	IC à 95 %
IDC J ₄₂	1 150	1 018	88,5 %	[79,3-93,72]
IFN γ J ₃	1 248	548	43,9 %	[41,1-46,7]
IFN γ J ₄₂ ^{a,b}	1 240	752	60,6 %	[57,5-62,9]

IC : intervalle de confiance ; ^a différence de spécificité significative entre les tests IFN γ J₃ et IFN γ J₄₂ (chi 2 observé = 69,8, 1 degré de liberté, p < 2,2.10⁻¹⁶); ^b différence de spécificité significative entre les test IFN γ J₄₂ et IDC J₄₂ (chi 2 observé = 241,3, 1 degré de liberté, p = 7,2.10⁻⁹⁵)

Les valeurs de spécificité obtenues dans les autres départements sont équivalentes à celles obtenues en Dordogne et en Côte-d'Or. Il ressort du Tableau 14 et du Tableau 15 que les valeurs de spécificité du test IFN γ à J₃ sont plus faibles que celles du test IDT à J₄₂. En Côte-d'Or, en Dordogne ainsi que dans les autres départements, la spécificité du test IFN γ semble statistiquement plus faible à J₃ qu'à J₄₂.

Tableau 15 : Valeurs de spécificité apparente des tests IDT et IFN γ pour les animaux « protocole » issus d'élevages « indemnes » des autres départements

Test utilisé	Nombre total de bovins "indemnes"	Nombre de bovins ayant fourni un résultat négatif	Spécificité	IC à 95 %
IDT J ₄₂	272	225	82,7 %	[79,5-87,0]
IFN γ J ₃	238	108	45,4 %	[39,9-54,5]
IFN γ J ₄₂ ^a	202	130	64,4 %	[59,5-72,2]

IC : intervalle de confiance ; ^a différence de spécificité significative entre les tests IFN γ J₃ et IFN γ J₄₂ (chi 2 observé = 15,8, 1 degré de liberté, p = 6,8.10⁻⁵)

¹⁹ Calcul de la spécificité : nombre d'animaux ayant fourni un résultat négatif au test / nombre total d'animaux indemnes

4.6.2 Spécificité individuelle apparente des animaux « SR »

L'estimation de la spécificité des animaux « SR » tous issus de la Dordogne a été faite à partir de 665 bovins « indemnes » : 423 et 466 animaux ont été testés par IDT à J₀ et J₄₂ respectivement, 646 avec le test IFN γ à J₃ et 665 avec le test IFN γ à J₄₂. Tous ces animaux provenant de Dordogne, les résultats douteux de l'IDT et non conclusifs du test IFN γ ont été classés comme positifs.

Il ressort du Tableau 16 que la spécificité du test IDT à J₄₂ est plus élevée que celle du test IFN γ à J₃.

Tableau 16 : Spécificité des tests IDT et IFN γ pour les animaux « SR » issus de la Dordogne

Test utilisé	Nombre total de bovins "indemnes"	Nombre de bovins ayant fourni un résultat négatif	Spécificité	IC à 95 %
IDT J ₄₂	163	153	93,9 %	[88,7-97,0]
IFN γ J ₃	289	64	22,1 %	[17,6-27,4]
IFN γ J ₄₂ ^a	308	208	67,5 %	[62,0-72,7]

IC : intervalle de confiance ; ^a différence de spécificité significative entre les tests IFN γ J₃ et IFN γ J₄₂ (chi 2 observé = 124,5, 1 degré de liberté, $p < 2,2 \cdot 10^{-16}$)

4.6.3 Concordance entre les résultats des différents tests

L'analyse de la concordance a été faite en calculant le coefficient « kappa » (Thrusfield 2007). Ce coefficient évalue le degré d'accord (concordance) entre deux variables en éliminant l'effet du hasard. Une valeur « kappa » supérieure à 0,8 indique une très bonne concordance, alors qu'une valeur « kappa » inférieure à 0,4 indique une mauvaise concordance. L'analyse de la concordance des résultats des tests IDT et IFN γ pour les animaux « protocole » et « SR » est résumée dans le Tableau 17. Les valeurs « kappa » ont été classées selon que les résultats douteux (IDT) ou non conclusifs (IFN γ) ont été inclus dans les résultats positifs ou négatifs.

Les valeurs du coefficient « kappa » présentées dans le Tableau 17 sont très faibles : aucune concordance entre les résultats des tests IDT et IFN γ ne peut donc être mise en évidence.

Tableau 17 : Concordance des tests IDT et IFN γ pour les animaux « SR » et « protocole » pour les animaux « indemnes »

Tests utilisés	Animaux « Protocole »		Animaux « SR »	
	Résultats douteux ou NC inclus dans les négatifs	Résultats douteux ou NC inclus dans les positifs	Résultats douteux ou NC inclus dans les négatifs	Résultats douteux ou NC inclus dans les positifs
IDT J ₀ / IDT J ₄₂	-	-	0,108	0,008
IDT J ₀ / IFN γ J ₃	-	-	0,028	-0,079
IDT J ₀ / IFN γ J ₄₂	-	-	0,143	0,169
IFN γ J ₃ / IFN γ J ₄₂	0,264	0,286	0,221	0,293
IFN γ J ₃ / IDT J ₄₂	0,006	0,090	0,039	-0,018
IDT J ₄₂ / IFN γ J ₄₂	-0,005	0,070	0,034	0,049

NC : non conclusifs ; - : non concerné

En résumé, le GT rappelle que le terme de spécificité a été employé avec une acception large intégrant des paramètres de terrain et que cette notion a été utilisée avec beaucoup de précautions, compte tenu de la population de « référence ». Il est donc difficile d'émettre des conclusions définitives quant à la spécificité apparente des tests et quant à leurs performances relatives. Il faut en particulier noter que la concordance entre les tests IDT et IFN γ estimée dans cette étude à partir des échantillons disponibles est très faible, que ces tests soient réalisés à une même date (IDC J₄₂ et IFN γ J₄₂) ou dans un intervalle de temps réduit (IDT J₀ et IFN γ J₃) ou bien qu'ils soient réalisés à six semaines d'intervalle (IFN γ J₃ vs IDC J₄₂ et/ou IFN γ J₄₂). Il convient en outre de rappeler que ces estimations sont potentiellement biaisées car elles sont basées sur des effectifs d'animaux qui diffèrent selon le test et la période considérés.

La spécificité du test IFN γ J₃ apparaît comme particulièrement faible dans le cas des animaux « SR ». Cela n'est qu'en partie imputable au critère d'inclusion des bovins (réaction non négative au test IDT à J₀), de façon à se positionner dans le contexte d'un test en série. En effet, si tous les bovins « indemnes » testés en SR sont pris en compte, quel que soit le résultat à l'IDT J₀, la spécificité du test IFN γ J₃ est encore très faible, avec une valeur moyenne de 22,1 %. L'amélioration significative de la spécificité à J₄₂ du test IFN γ conduit à émettre au moins trois hypothèses non exclusives : d'une part un défaut de spécificité du test IFN γ à J₃ par rapport au test IDC, conduisant à un certain nombre de faux positifs (lesquels se négativeraient lors de la maturation de la réponse immunitaire de certains animaux entre J₃ et J₄₂), d'autre part, un effet de stimulation de la réponse IFN γ J₃ par l'IDT J₀ (hypothèse discutée dans la réponse à la question 2.iii) et enfin, surtout s'agissant d'animaux « SR », la plus grande sensibilité du test IFN γ par rapport au test IDC, qui permettrait de détecter à l'aide du test IFN γ J₄₂ des animaux non détectés à cette même date par IDC J₄₂. La/les raison(s) du différentiel entre le taux de réponses négatives observé avec les tests IFN γ J₃ et IFN γ J₄₂ reste(nt) à explorer (en y incluant la possibilité d'un effet « amplificateur » du test IDT J₃ sur la réponse IFN γ J₃). La compréhension de cette différence et de la signification à lui accorder est cruciale pour permettre de préconiser un protocole approprié en situation de lien épidémiologique avec des foyers confirmés, comme c'est le cas des élevages « SR ».

L'accentuation des différences de spécificité entre les trois tests dans le cas des animaux SR par rapport aux animaux « protocole », pourrait être imputable à plusieurs facteurs : opérateurs différents lors de la réalisation des IDT J₄₂, réalisation plus soignée des IDT J₄₂ dans le cas des animaux « SR » par rapport aux animaux « protocole », proportion plus élevée d'animaux réellement infectés mais non détectés comme tels dans le cas des animaux « SR », et/ou plus grande proportion de bovins testés à J₀ avec un test IDC dans le cas des animaux « protocole », avec un impact moindre sur la réponse IFN γ J₃ que l'IDS (seul test utilisé à J₀ *a priori* dans le cas des animaux « SR »). Là encore, une analyse approfondie de ces distorsions apparentes s'impose, nécessitant la mise en œuvre d'études rigoureuses, dans des unités expérimentales et sur le terrain.

5 Réponses aux questions de la saisine

A- Rappel de la question 1 : Suite à un résultat non négatif en IDT à J₃, quel est le risque de perte de sensibilité si l'on substitue l'IDC réalisée à J₄₂, par un test IFN γ à J₃ ? Cette éventualité ayant notamment comme prérequis l'évaluation de la sensibilité du test IFN γ à l'échelle individuelle et collective.

1- Sensibilité individuelle

- Sensibilité des tests IDT

L'exploitation de la littérature (articles de méta-analyses et rapports, cf. Tableau 1) ainsi que l'analyse de la base de données par le GT montre qu'il existe, dans la majorité des cas, une grande différence entre les valeurs de sensibilité des tests IDT relevées dans la littérature et celles obtenues sur le terrain en France. Ainsi, il ressort des données bibliographiques (Tableau 1, page 22) que la sensibilité de l'IDS varie entre 76,0 % [47,6-95,2] (García Sáenz 2010) et 94 % [49-100] (Nuñez-García *et al.* 2018 ; EFSA 2012) alors que celle de l'IDC varie entre 49 % [27-74] (EFSA 2012) et 80 % [52-100] (de la Rua Domenech *et al.* 2006).

L'analyse de la base de données ne permet pas de calculer la sensibilité des tests IDT réalisés à J₀ dans la population « protocole », l'effectif total testé n'étant pas connu. Pour les animaux « SR », le pourcentage de résultats positifs en IDT initiale (parmi 36 animaux identifiés comme infectés) est inférieur au pourcentage de résultats positifs en IDC à J₄₂ (parmi 22 animaux identifiés comme infectés), avec cependant une valeur très basse dans les deux cas (Tableau 12). Selon les experts, il est *a priori* surprenant que cette valeur obtenue soit aussi basse puisque ces données ont été obtenues dans le cadre d'un suivi renforcé. Les biais liés à une mauvaise réalisation ou à une mauvaise lecture du test IDT auraient dû être limités. Il faut par ailleurs noter une différence des effectifs à J₀ et J₄₂, certains animaux ayant été abattus avant J₄₂. La meilleure sensibilité de l'IDC à J₄₂ dans cette population « SR » pourrait s'expliquer par le fait que certains animaux récemment infectés auraient pu ne devenir réagissants qu'après l'IDT initiale, ce qui aurait permis de les détecter à J₄₂ en IDC (et pour certains d'entre eux dès J₃ avec le test IFN γ , ce test étant réputé plus précoce que l'IDT). Cependant, cette hypothèse ne peut pas être validée compte tenu du faible effectif d'animaux de la base de données. Un effet opérateur pourrait également être intervenu entre les deux IDT, dans l'hypothèse où l'opérateur était différent à J₀ et J₄₂. Il n'est pas possible d'exclure non plus l'hypothèse qu'un plus grand soin ait été apporté à la réalisation du deuxième test (IDC J₄₂), du fait du statut suspect des animaux concernés, qui plus est dans un contexte épidémiologique défavorable (animaux « SR »).

- Sensibilité des tests IFN γ

Il ressort des données bibliographiques (articles de méta-analyses et rapports) exploitées par le GT que les valeurs de sensibilité du test IFN γ se situent dans le même ordre de grandeur que celles calculées à partir de la base de données. Ainsi, pour les tests IFN γ utilisant les PPD, la sensibilité varie entre 73,6 % [36,5-96,5] (Bezós *et al.* 2014) et 87 % [72-95] (Nuñez-García *et al.* 2018 ; EFSA 2012), alors qu'elle varie entre 78 % [60-90] (Nuñez-García *et al.* 2018 ; EFSA 2012) et 83,9 % [78,4-88,4] (Bezós *et al.* 2014) pour les tests IFN γ utilisant les antigènes ESAT-6 et CFP-10 (Tableau 4)

L'analyse de la base de données montre que la sensibilité du test IFN γ à J₃ pour les animaux « protocole » est de 93,5 % [84,9-98,0] si uniquement les résultats positifs sont pris en compte, ou de 97,4 % [90,1-100] si les résultats non conclusifs sont inclus dans les résultats positifs (Tableau 11). Pour les animaux « SR »,

la sensibilité du test IFN γ est de 75 % [73,6-76,4] si uniquement les résultats positifs sont pris en compte, ou de 86,1 % [84,7-87,5] si les résultats non conclusifs sont inclus dans les résultats positifs (Tableau 12).

- Comparaison de la sensibilité de l'IDT à J₀ et de l'IFN γ à J₃

Les données bibliographiques exploitées par le GT montrent que la sensibilité du test IFN γ à J₃ est équivalente à celle du test IDS à J₀ (Tableau 1 et Tableau 4). Cependant, pour les animaux « SR », l'analyse de la base de données révèle des résultats complètement opposés, liés aux faibles valeurs de sensibilité obtenues pour les tests IDT (Tableau 12). Ainsi, en comparant les résultats de la littérature et ceux issus de la base de données, il ressort que la sensibilité des tests IDT en France, obtenus par analyse de la base de données, est largement inférieure à celle obtenue dans la littérature. Cette observation est cependant à nuancer dans la mesure où elle porte sur un très faible nombre d'animaux infectés (36 animaux). En revanche, le test IFN γ donne des résultats plus conformes à ceux trouvés dans la bibliographie.

- Comparaison de la sensibilité de l'IDC à J₄₂ et de l'IFN γ à J₃

Afin de répondre à la question, il était nécessaire, en plus d'avoir les valeurs de sensibilité des différents tests, de pouvoir comparer les valeurs de sensibilité des tests IFN γ à J₃ et IDC à J₄₂. Cette comparaison a été faite uniquement à partir des résultats de la base de données, en l'absence d'études comparables disponibles dans la littérature. Il faut par ailleurs noter une différence des effectifs à J₃ et J₄₂, certains animaux ayant été abattus avant J₄₂.

Pour les animaux « protocole », la sensibilité du test IDC réalisé à J₄₂ est de 38,9 % [23,6-56,3], alors que pour le test IFN γ à J₃, elle est de 93,5 % [84,9-98,0] si seuls les résultats positifs sont pris en compte ou 97,4 % [90,1-100] si les résultats non conclusifs sont inclus dans les résultats positifs (Tableau 11).

Pour les animaux « SR », la sensibilité du test IDC réalisé à J₄₂ est de 50 % [47,7-52,3], alors que pour le test IFN γ à J₃ elle est de 75 % [73,6-76,4] si les résultats positifs sont uniquement pris en compte ou 86,1 % [84,7-87,5] si les résultats non conclusifs sont inclus dans les résultats positifs (Tableau 12).

En résumé, en se basant sur les résultats issus de l'analyse de la base de données, la substitution du test IDC réalisé à J₄₂ par un test IFN γ réalisé à J₃ combinant les antigènes PPD et ESAT-6/CFP-10, ne semble pas induire un risque de perte de sensibilité au niveau individuel. Les experts rappellent à ce propos, que la réponse IFN γ qu'auraient fournie certains des animaux « protocole » non réagissants en IDT à J₀ s'ils avaient été soumis à ce test, ne peut être connue. Or, si ces animaux non réagissants à l'IDT à J₀ avaient été soumis au test IFN γ à J₃, certains auraient pu fournir un résultat positif et s'avérer infectés *in fine*. Il existe donc un risque de sous-estimation de la sensibilité individuelle du test IFN γ . Un risque de surestimation ne peut être exclu totalement, même si la probabilité en est beaucoup plus faible, compte tenu de la sensibilité et de la précocité du test IFN γ .

2- Sensibilité collective

L'analyse de la base de données a montré que la majorité des élevages testés avaient, au moment du dépistage, un seul animal détecté comme infecté (Figure 7 et 8). Pour ces élevages, la sensibilité troupeau est donc égale à la sensibilité individuelle. Comme précisé dans le paragraphe 4.5.2 du rapport, les résultats de l'analyse de la base de données suggèrent que la sensibilité troupeau du test IFN γ réalisé à J₃ est supérieure à celle du test IDC réalisé à J₄₂, quel que soit le nombre de bovins infectés dans l'élevage.

En résumé, en se basant sur le nombre d'animaux infectés par troupeau, la substitution du test IDC réalisé à J₄₂ par un test IFN γ réalisé à J₃ combinant les antigènes PPD et ESAT-6/CFP-10, ne semble pas induire un risque de perte de sensibilité au niveau collectif. Les experts rappellent à ce propos, qu'il existe un risque de sous-estimation de la sensibilité collective du test IFN γ , comme cela a été développé précédemment pour la sensibilité individuelle.

B- Rappel de la question 2 i) : Pouvez-vous comparer le risque de lever à tort la suspension de qualification suite d'une part à un résultat IFN γ négatif suite à la lecture du dépistage initial et suite d'autre part à un contrôle IDC négatif réalisé 6 semaines plus tard ?

Cette question est en lien direct avec la question précédente. En effet, l'analyse de la base de données montre que la sensibilité du test IFN γ à J₃ utilisant les PPD et les antigènes ESAT-6/CFP-10 de manière combinée, apparaît plus élevée que la sensibilité de l'IDT réalisée à J₀ ou à J₄₂.

Pour comparer le risque de lever à tort la suspension de qualification, les experts se sont intéressés aux résultats du test IFN γ réalisé à J₃ et du test IDC réalisé à J₄₂ de la base de données, pour les animaux ayant fourni un résultat non négatif à l'IDT réalisée à J₀ et qui ont été reconnus infectés.

1- Animaux « protocole »

Parmi les 77 animaux « protocole » ayant fourni un résultat non négatif à l'IDT initiale, 41 animaux ont été soumis uniquement au test IFN γ à J₃, et 36 animaux ont été soumis à la fois au test IFN γ à J₃ et à l'IDC à J₄₂ (Figure 9). Pour les 41 animaux soumis uniquement au test IFN γ à J₃, un animal a fourni un résultat négatif (2,44 % ; [1,22-3,66]), et un autre animal a fourni un résultat non conclusif (2,44 % ; [1,22-3,66]). Les 39 autres animaux ont fourni un résultat positif (95,12 % ; [82,2-100]).

Parmi les 36 animaux soumis à la fois au test IFN γ à J₃ et au test IDC à J₄₂, deux animaux ont fourni un résultat non conclusif au test IFN γ à J₃ (5,56 % ; [4,17-6,94]) et un résultat négatif au test IDC à J₄₂. Un seul animal a fourni un résultat négatif au test IFN γ à J₃ (2,78 % ; [1,39-4,17]) et un résultat positif au test IDC à J₄₂. Les 33 autres animaux ont fourni un résultat positif au test IFN γ à J₃. Il faut noter que 22 de ces 36 animaux testés ont fourni un résultat négatif au test IDC à J₄₂ (61,11 % ; [59,72-62,5]).

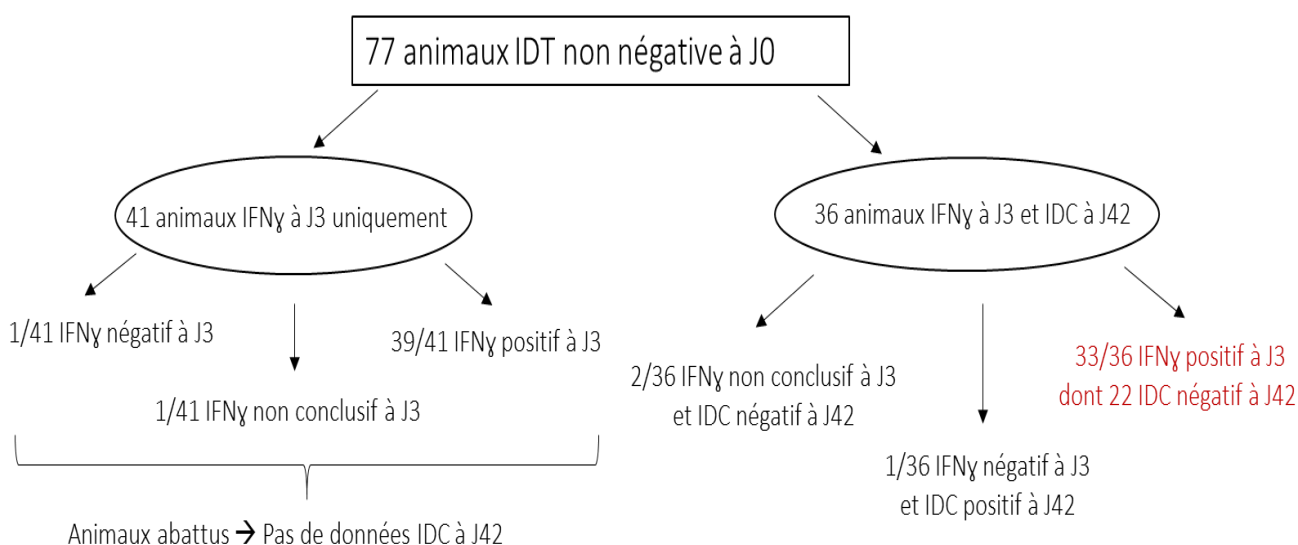


Figure 9 : Résultats obtenus au test IFN γ à J₃ et au test IDC à J₄₂ chez les animaux « protocole » ayant fourni un résultat non négatif en IDT à J₀ et reconnus *in fine* infectés

2- Animaux « SR »

Pour les 36 animaux « SR » testés, 11 ont fourni un résultat non négatif en IDS à J₀. Quatre animaux ont été soumis uniquement au test IFN γ à J₃ et ont tous fourni un résultat positif [39,6-100] (Figure 10).

Pour les sept animaux soumis à la fois au test IFN γ à J₃ et au test IDC à J₄₂, aucun animal n'a fourni un résultat négatif au test IFN γ à J₃ (0 % ; [0-7,14]). Un seul animal a fourni un résultat non conclusif au test IFN γ à J₃ (14,29% ; [7,14-21,43]), sachant que cet animal a fourni un résultat positif au test IDC à J₄₂. Les six autres animaux ont fourni un résultat positif au test IFN γ à J₃ (85,71 % ; [78,57-92,86]). D'ailleurs, il faut noter que trois des sept animaux testés ont fourni un résultat négatif au test IDC à J₄₂ (42,86 % ; [35,71-50]).

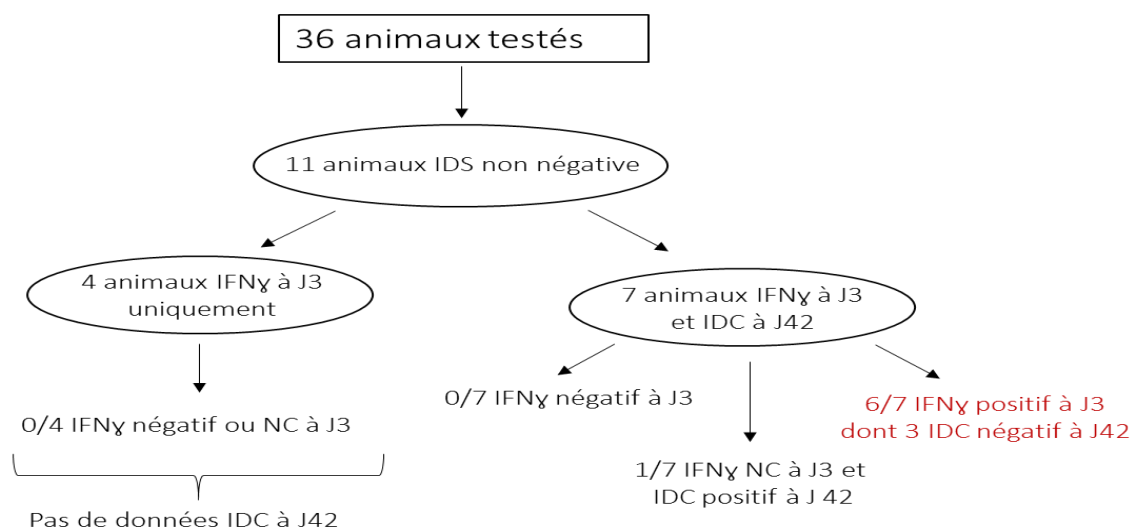


Figure 10 : Résultats obtenus au test IFN γ à J₃ et au test IDC à J₄₂ chez les animaux « SR » ayant fourni un résultat non négatif en IDS à J₀ et reconnus *in fine* infectés

En résumé, à partir des résultats de l'analyse de la base de données, le risque de lever à tort la suspension de qualification suite à un résultat IFN γ négatif après un dépistage initial en IDT non négatif, paraît moins élevé par rapport à celui associé à un résultat négatif à une IDC réalisée six semaines après l'IDT initiale. Il faut noter que compte tenu du faible nombre d'animaux analysés, il n'est pas possible de quantifier ce risque. A partir de l'analyse de la base de données et compte tenu des incertitudes, les experts considèrent que l'utilisation du test IFN γ à J₃ pourrait cependant améliorer la sensibilité du dispositif.

C- Rappel de la question 2 ii) : A partir de données de comparaison des tests IFN γ réalisés sur les mêmes échantillons avec des antigènes différents et de la comparaison avec des résultats bactériologiques, quels critères d'interprétation et quels antigènes seraient à adopter en fonction du contexte, selon qu'il s'agit d'un dépistage (suspicion faible ou forte) ou d'un assainissement par abattage partiel progressif, afin de viser une sensibilité maximale ?

La base de données a été également analysée par le GT afin de répondre à cette question. Cependant, les experts n'ayant pas pu avoir accès à des données dans le cadre des abattages partiels progressifs, la réponse ciblera uniquement le contexte de dépistage.

1- Concernant les antigènes à adopter

Comme mentionné dans l'Annexe 3 du rapport, l'utilisation d'antigènes autres que les PPD a fait l'objet de 20 publications. Il s'agit des antigènes ESAT-6 et CFP-10 qui sont les plus étudiés dans ces articles. D'importantes différences sont constatées dans ces publications notamment : la définition des populations infectées, le choix des mélanges antigéniques, leur méthode de production (protéines recombinantes, peptides de synthèse), les méthodes de calcul des résultats, etc.

Ces différences méthodologiques s'observent également dans les études réalisées en France. Ainsi, comme précisé dans le paragraphe 3.1.2.2, le test IFN γ utilisé dans les travaux de Boireau (2015) était une combinaison des PPD + ESAT-6/CFP-10²⁰. Dans l'étude de Praud *et al.* (2015), le test IFN γ utilisait une combinaison des PPD et d'ESAT-6 uniquement, alors que dans les travaux de Praud *et al.*, publiés en 2016 et 2019, ce test était basé sur un mélange PPD + ESAT-6 / CFP-10.

Les extrapolations qui pourraient être faites à partir de ces publications ne permettent pas d'apporter une réponse définitive aux questions posées. Les experts ont donc exploité la base de données qui comporte des résultats des tests IFN γ générés par des stimulations avec d'une part les PPD, et d'autre part, un mélange des antigènes ESAT-6 et CFP-10. Au vu des données dont dispose le GT, l'évaluation des antigènes ESAT-6 et CFP-10 de façon individuelle, ne paraît donc pas possible à partir de cette base.

2- Concernant les critères d'interprétation

Les critères d'interprétation du test IFN γ appliqués dans le contexte épidémiologique français ont été définis dans les travaux de Faye *et al.* (2010). Les données utilisées dans ces travaux proviennent de tests IFN γ réalisés en 2008 sur une population réglementairement indemne de 492 animaux²¹ et sur une population infectée de 73 animaux²². Deux tests IFN γ ont été pratiqués sur ces bovins : une stimulation avec les PPD et une autre avec un mélange des antigènes ESAT-6 et CFP-10. Cette étude a permis d'établir la spécificité et la sensibilité des stimulations réalisées avec ces différents antigènes dans le contexte français. Par ailleurs, la combinaison de la sensibilité et de la spécificité dans des courbes ROC (*receiver-operating characteristic*) a permis d'optimiser les seuils utilisés pour l'interprétation du test. Les auteurs ont ainsi suggéré d'utiliser un seuil de 0,01 pour les stimulations avec les antigènes ESAT-6 et CFP-10, et un seuil de 0,02 pour les stimulation avec les PPD dans les zones à risque (cf. *infra*) , où le test IDS était alors utilisé en parallèle au test IFN γ en première intention, dans le contexte du dépistage²³. De même, ces auteurs ont proposé d'utiliser des seuils de positivité de 0,03 (ESAT-6/CFP-10) et de 0,05 (PPD) dans les zones à faible risque où un premier résultat positif en IDS était obtenu lors du dépistage, ainsi que dans les zones où l'IDC était utilisée en première intention²⁴.

²⁰ Campagne 2013-2014 : En Dordogne, PPD + ESAT-6/CFP-10, en Côte-d'Or, PPD + ESAT-6 (Boireau 2015, pages 126-127)

²¹ Bovins appartenant à des troupeaux indemnes de tuberculose, eux-mêmes situés en région indemne

²² Bovins considérés comme tuberculeux car issus de troupeaux reconnus infectés et présentant eux-mêmes des lésions évocatrices de tuberculose à l'abattoir. En outre 40 d'entre eux ont été ultérieurement analysés et confirmés infectés, 26 au moins par culture et 14 au moins par PCR.

²³ En Dordogne à l'époque de l'étude

²⁴ Du fait de réactions croisées avec des mycobactéries atypiques

Par ailleurs, les travaux de Faye (Faye 2010, Faye *et al.* 2011) ont conclu à la nécessité d'adapter l'interprétation de résultats de stimulation en fonction du contexte épidémiologique :

- en « contexte défavorable » (ou zone à risque), la positivité d'une seule des deux stimulations (soit PPD, soit ESAT-6/CFP-10) doit être prise en compte pour considérer un résultat comme positif ;
- tandis qu'en « contexte favorable » (ou zone à faible risque), c'est la positivité des deux stimulations (PPD et ESAT-6/CFP-10) qui est requise pour considérer un test comme positif.

Ces combinaisons permettent d'obtenir des valeurs de spécificité et de sensibilité de 94,3 et 77,0 % respectivement dans un contexte favorable et de 71 et 93 % respectivement dans un contexte défavorable (Faye *et al.* 2011). Comme précisé dans le paragraphe 4.1 du rapport, une réévaluation des seuils a été faite suite une étude menée par la CIREV de Bourgogne, validée par le LNR Tuberculose. Le seuil utilisé pour la stimulation avec des PPD n'a pas été réévalué et il est resté à 0,05. En revanche, celui pour la stimulation avec ESAT-6/CFP-10 a été fixé à 0,03. Contrairement à l'étude de Faye *et al.* (2011), l'étude de la CIREV n'a pas bénéficié d'une population indemne pour le calcul de la spécificité. Les valeurs de spécificité fournies doivent donc être interprétées avec précaution. Comme mentionné dans la partie 4.2 de ce rapport, la valeur-seuil établie pour ESAT- 6/CFP-10 a été par la suite entérinée par une note de service de la DGAL (DGAL SDPA/2014-864).

- Calcul de la sensibilité du test IFN γ en utilisant les PPD seuls et ESAT-6/CFP-10 seul

L'analyse réalisée par le GT des données issues des 114 animaux infectés (ayant fourni un résultat positif en culture et / ou PCR) montre que la sensibilité du test IFN γ utilisant les PPD seuls est de 82,0 % et celle du test IFN γ utilisant ESAT-6/CFP-10 seul, de 81 %.

Par ailleurs, si l'on considère qu'une réponse à la stimulation par un seul de ces deux types d'antigènes (PPD ou ESAT-6/CFP-10) suffit à considérer un animal comme ayant fourni un résultat positif, cette sensibilité est de 92 %. Dans le cas où on ne prend en compte que la réponse positive aux deux stimulations, en suivant les seuils d'interprétation actuels (Tableau 8), cette sensibilité chute à 78,0 %. La sensibilité a également été évaluée pour les animaux « protocole » et « SR ». Les différentes valeurs sont reprises dans le Tableau 18 ci-dessous :

Tableau 18: Calcul de la sensibilité du test IFN γ en fonction des antigènes utilisés pour les animaux « protocole » et « SR »

Antigène(s) utilisé(s)	Animaux « protocole » [IC à 95 %]	Animaux « SR » [IC à 95 %]	Total 114 animaux infectés [IC à 95 %]
PPD seuls	86,0 % [75 - 93]	78,0 % [61 - 90]	82,0 % [73 - 88]
ESAT-6/CFP-10 seul	90,0 % [80 - 95]	73,0 % [56 - 86]	81,0 % [72 - 88]
PPD ou ESAT-6/CFP-10	97,0 % [90 - 100]	84,0 % [67 - 94]	92,0 % [85 - 96]
PPD et ESAT-6/CFP-10 (NC considérés comme positifs)	79,0 % [68 - 87]	65,0 % [47 - 80]	78,0 % [70 - 85]
PPD et ESAT-6/CFP-10 (NC considérés comme négatifs)	74,0 % [63 - 83]	54,0 % [37 - 70]	72,0 % [63 - 80]

IC : intervalle de confiance, NC : non conclusif

Ces résultats concordent avec ceux de Faye *et al.* (2011). Par ailleurs, l'étude de la base de données a révélé une sensibilité du test IDT à J₀ très basse dans le contexte français actuel (Tableau 12). Il y a donc

un risque important de conserver une sensibilité très basse des tests de dépistage de la tuberculose, même en associant un test IFN γ à J₃ suite à un résultat non-négatif à l'IDT à J₀, qu'il s'agisse d'un test IDS ou IDC, avec le risque que le taux de réponses négatives soit encore plus élevé en utilisant une IDC à J₀.

Par ailleurs, les experts soulignent certains aspects paradoxaux quant à l'utilisation actuelle des tests IFN γ à J₃ et IDC à J₄₂ dans le cadre du protocole national. En effet, un test IDC à J₄₂ n'est réalisé que sur les animaux ayant réagi au test IDT à J₃. Par vocation, le test IDC est un test collectif qui doit être réalisé et interprété à l'échelle du cheptel, étant donné sa sensibilité individuelle limitée. L'interprétation du test met à profit l'augmentation de la sensibilité troupeau par rapport à la sensibilité individuelle dès lors que plus d'un bovin est infecté dans le troupeau testé (voir réponse à la question 2i). En ne pratiquant les tests IDC à J₄₂ que sur les animaux ayant donné un résultat non négatif à J₀, la sensibilité du dispositif est probablement diminuée. Cette perte de sensibilité est probablement aggravée dans le cas où des animaux récemment infectés ne seraient pas encore devenus réagissants en IDT à J₃. Si l'on se base sur ce qui est attendu théoriquement en terme d'intensité de la réponse anti-PPD-B lors de l'utilisation de l'IDS *versus* l'IDC, et sur les confirmations apportées par les publications quant à la plus forte sensibilité de l'IDS par rapport à l'IDC, l'utilisation de l'IDC à J₀ à la place de l'IDS accroît ce risque, étant donné sa plus faible sensibilité.

Concernant le test IFN γ à J₃, il est à noter que son utilisation actuelle uniquement en série sur les animaux ayant fourni un résultat non négatif en IDT J₀ peut conduire au même défaut de sensibilité que celui évoqué ci-dessus.

- Calcul de la spécificité du test IFN γ en utilisant les PPD seuls et ESAT-6/CFP-10 seul

La base de données fournie au GT donne également accès à une population considérée indemne réglementairement, mais provenant de zones à risque. Le GT a vérifié que les troupeaux identifiés comme indemnes dans la base de données avaient conservé ce statut jusqu'à fin 2018 inclus (cf. partie 4.4 du rapport). Ces données consolident fortement les résultats de Faye *et al.* (2011) issus de 492 bovins provenant de 25 élevages indemnes sur une période de dix ans. Par ailleurs, Il est à noter que le GT n'a pris en compte que les animaux ayant fourni un résultat non négatif en IDT, la présente saisine ne concernant que l'utilisation du test IFN γ en série.

Tableau 19 : Calcul de la spécificité du test IFN γ à J₃ et J₄₂ en fonction des antigènes utilisés pour les animaux « protocole » à partir de 2 928 résultats obtenus sur des bovins "indemnes" avec une IDT non négative

Antigène(s) et/ou réponses pris(es) en compte	Nombre de bovins "indemnes" ayant fourni un résultat négatif lors du dosage de l'IFN γ *	Spécificité	IC à 95 %
ESAT-6/CFP-10 seul	2 664	91,0 %	[90,1- 91,6]
PPD seul	1 669	57,0 %	[55,6 - 58,2]
PPD et ESAT-6/CFP-10 (NC considérés comme positifs)	1 538	52,5 %	[51,2 - 53,8]
PPD et ESAT-6/CFP-10 (NC considérés comme négatifs)	2 597	88,7 %	[87,8 - 89,4]

IC : intervalle de confiance, NC : non conclusif ; * : chaque bovin ayant pu être testé à J₃ et/ou J₄₂

Tableau 20 : Calcul de la spécificité du test IFN γ en fonction des antigènes utilisés pour les animaux « SR » à partir de 1 260 résultats obtenus sur des bovins “indemnes” avec une IDT non négative

Antigène(s) et/ou réponses pris(es) en compte	Nombre de bovins ayant fourni un résultat négatif lors du dosage de l'IFN γ *	Spécificité	IC à 95 %
ESAT-6/CFP-10 seul	1 027	81,5 %	[79,8 - 82,9]
PPD seul	801	63,6 %	[61,5- 65,4]
PPD et ESAT-6/CFP-10 (NC considérés comme positifs)	612	48,6 %	[45,7 - 51,5]
PPD et ESAT-6/CFP-10 (NC considérés comme négatifs)	1 216	96,5 %	[95,6 - 97,1]

IC : intervalle de confiance, NC : non conclusif ; * : chaque bovin ayant pu être testé à J₃ et/ou J₄₂

Les experts ont pris en compte pour les calculs, les résultats des tests IFN γ à J₃ et à J₄₂ et ont fait abstraction d'une possible interférence entre une IDT à J₀ et la réponse IFN γ à J₃. En effet, il s'agissait ici de comparer chez un même bovin et pour une même date, les réponses PPD, ESAT-6/CFP-10 et leur combinaison.

Pour les animaux « protocole », une différence de « spécificité » des réponses est observée :

- selon que la réponse aux PPD est prise en compte ou pas (spécificité significativement plus faible quand c'est le cas) et,
- selon l'interprétation des réponses non conclusifs (spécificité significativement plus faible quand elles sont considérées comme positives).

Pour les animaux « SR », une meilleure spécificité est observée pour ESAT-6/CFP-10 seul en comparaison au PPD seul. Dans le cas d'une utilisation combinée ESAT-6/CFP-10 et PPD, une grande différence des valeurs de spécificité est observée, compte tenu du nombre important des résultats non conclusifs obtenus (non conclusifs considérés comme positifs : faible spécificité, non conclusifs considérés comme négatifs : forte spécificité).

Le mode d'interprétation des résultats associant PPD et ESAT-6/CFP-10 affecte donc considérablement la spécificité du test IFN γ . D'après l'analyse de la base de données, la conclusion est de considérer, dans un contexte de dépistage, les résultats positifs avec les PPD seuls avec prudence, et de tenir compte du contexte épidémiologique pour l'interprétation des résultats non conclusifs.

En résumé, l'analyse de la bibliographie et de la base de données n'a pas permis aux experts de recommander des antigènes autres que ESAT-6 et CFP-10, en plus des PPD. Les experts soulignent que l'utilisation combinée des PPD et d'ESAT-6/CFP-10 est pertinente. Cette combinaison permet, comme déjà signalé par l'étude de Faye *et al.* (2011) en France, d'adapter le test IFN γ en fonction des contextes épidémiologiques. Les experts soulignent l'importance de la prise en compte du contexte épidémiologique (contexte défavorable ou favorable), compte tenu du nombre important des résultats non conclusifs, et du fait que la majorité des animaux de la base de données proviennent de zones à risque. Il apparaît donc nécessaire de statuer sur le devenir de cette catégorie d'animaux ayant fourni un résultat non conclusif. Pour ce faire, mais aussi plus largement pour poursuivre l'utilisation optimale du test IFN γ dans le processus national de dépistage, il conviendrait d'actualiser les seuils de positivité d'ESAT-6/CFP-10 seul et PPD seul, et de ré-évaluer l'interprétation des résultats des combinaisons, en fonction du contexte épidémiologique. Ce travail nécessite des études complémentaires.

D- Rappel de la question 2 iii) : Est-ce que cette évaluation dépend du type d'IDT réalisée en première intention ?

Le GT s'est penché sur cette question, bien que les préconisations actuelles en France aillent dans le sens de l'utilisation de l'IDC en première intention, particulièrement dans les zones où la surveillance est renforcée et qui sont principalement visées par cette saisine. En effet, l'IDS reste néanmoins le test de référence dans les autres départements (lorsque le dépistage y est encore réalisé), et pour le contrôle à l'introduction.

Cette question comporte deux volets :

- un premier volet portant sur la comparaison de la sensibilité de la combinaison IDS J₀/IFN γ J₃ versus celle de la combinaison IDC J₀ / IFN γ J₃ ;
- un deuxième volet portant sur l'interférence possible des tests IDS et/ou IDC à J₀ avec la réponse au test IFN γ réalisé à J₃, interférence qui pourrait d'ailleurs expliquer partiellement la plus-value éventuellement conférée par l'une ou l'autre combinaison.

1- Premier volet : comparaison de la sensibilité de la combinaison IDS J₀/ IFN γ J₃ versus celle de la combinaison IDC J₀ / IFN γ J₃

D'emblée, il s'est avéré que cette comparaison entre IDS J₀ / IFN γ J₃ et IDC J₀ / IFN γ J₃ ne pouvait se baser sur le groupe « SR », ce groupe étant propre à la Dordogne (ainsi qu'à la Charente), département dans lequel les tests IDT à J₀ étaient toujours des IDS à l'époque où les données ont été collectées. En outre, dans le groupe « protocole » de la base de données, les animaux reconnus ultérieurement infectés n'avaient été testés avec le test IFN γ à J₃ que s'ils avaient fourni un résultat non négatif en IDT à J₀. Il n'a donc pas été possible d'avoir accès à des animaux qui auraient pu avoir fourni un résultat positif (voire non conclusif) en IFN γ après avoir donné un résultat négatif en IDT. En d'autres termes, la détermination de la plus-value susceptible d'être apportée par le test IFN γ respectivement à l'IDS et à l'IDC n'a pas été possible.

La réponse à cette question ne pouvait donc se baser que sur les données bibliographiques, avec un problème majeur en terme d'incertitude, lié en particulier au fait que la mise en oeuvre et l'interprétation des résultats aux tests IFN γ en France est très différente de celle des autres pays, combinant les résultats du test IFN γ (PPD) et IFN γ (ESAT-6/CFP-10) (Tableau 3). Ainsi, deux approches successives ont été envisagées :

- Première approche : comparaison de la sensibilité de la combinaison IDS J_0 / IFN γ J_3 *versus* celle de la combinaison IDC J_0 / IFN γ J_3 (tests en série):

Aucune donnée bibliographique n'a pu être trouvée, ce qui n'est pas surprenant dans la mesure où le test en série actuellement utilisé en France n'est pas reconnu par l'UE et où la porte d'entrée de l'utilisation du test IFN γ dans le cadre des tests en série est une réponse non négative au test IDT. Il restait donc la possibilité de chercher des informations sur le gain (ou pas) de sensibilité apporté :

- d'une part, par le test IFN γ J_3 au dépistage par IDS J_0 utilisée seule ;
- d'autre part, par le test IFN γ J_3 au dépistage par IDC J_0 utilisée seule ;
- puis de comparer ces résultats entre eux, pour déterminer si l'une et/ou l'autre des combinaisons (IDS J_0 / IFN γ J_3 *versus* IDC J_0 / IFN γ J_3) peut être considérée comme plus avantageuse.

Cette approche était a priori critiquable, dans la mesure où on pouvait s'attendre à ce que les résultats aient été obtenus dans des conditions différentes par des équipes différentes, et n'aient donc pas légitimité à être comparés. En outre, il s'est avéré que seule une publication basée sur une approche expérimentale (Jones *et al.*, 2017), et s'appuyant sur l'association IDC J_0 et IFN γ J_3 (et dont l'objectif n'était pas de déterminer l'existence d'une plus-value apportée par ce test en série mais de déterminer la sensibilité, par rapport aux résultats de la bactériologie, du test IFN γ utilisant ESAT-6/CFP-10 plutôt que les PPD) a pu être trouvée, rendant caduque cette comparaison entre les deux combinaisons de tests.

- Deuxième approche : comparaison de la sensibilité de la combinaison IDS J_0 / IFN γ J_0 *versus* celle de la combinaison IDC J_0 / IFN γ J_0 (tests en parallèle) :

Compte tenu de l'impossibilité actuelle de comparer les deux combinaisons possibles de tests en série, les experts ont tenté d'obtenir des informations à partir des tests réalisés en parallèle.

Outre le fait qu'aucun article comparant la sensibilité respective de la combinaison IDS J_0 / IFN γ J_0 *versus* celle de la combinaison IDC J_0 / IFN γ J_0 n'a été trouvé, il est à noter que cette approche ne permet pas de tenir compte de l'effet éventuel (stimulant ou inhibant) d'une IDS et/ou d'une IDC sur la réponse IFN γ à J_3 , ce qui pourrait ne pas autoriser l'extrapolation des résultats des combinaisons IDT J_0 / IFN γ J_0 aux combinaisons IDT J_0 / IFN γ J_3 .

En l'absence d'article comparant IDS J_0 / IFN γ J_0 et IDC J_0 / IFN γ J_0 , la recherche a porté sur les articles permettant de déterminer le gain (ou pas) de sensibilité apporté :

- d'une part, par le test IFN γ J_0 au dépistage par IDS J_0 utilisée seule ;
- d'autre part, par le test IFN γ J_0 au dépistage par IDC J_0 utilisée seule ;
- afin de comparer ensuite ces résultats entre eux, pour déterminer l'une et/ou l'autre des combinaisons (IDS J_0 / IFN γ J_0 *versus* IDC J_0 / IFN γ J_0) peut être considérée comme plus avantageuse.

Une seule étude (Rangen *et al.* 2009) a comparé l'IDS (PSC), l'IDC et l'IFN γ . L'IDC ayant été réalisée trois jours après l'IDS, il est impossible d'utiliser les résultats compte tenu de l'interférence possible de l'IDS sur les résultats de l'IDC à J_3 . Cette étude ne fournit pas de comparaison entre IDS J_0 / IFN J_0 et IDC J_3 / IFN γ J_3 .

A noter qu'il aurait été possible d'utiliser ici les bases de données relatives à l'utilisation en France des tests en parallèle, notamment dans le cadre de l'assainissement des troupeaux. Pour des raisons d'accès aux données et de délais impartis pour l'expertise, le GT n'a pas pu réaliser l'étude qui aurait été nécessaire à une telle analyse. En outre, elle aurait fait abstraction d'un éventuel impact des tests IDS et/ou IDC sur la réponse IFN γ lorsque celui-ci est réalisé à J_3 .

Au bilan, quelle que soit l'approche, aucune donnée disponible ni à partir de la base de données ni à partir de la littérature, n'a permis de comparer la sensibilité de la combinaison IDS J₀ / IFN γ J₃ versus celle de la combinaison IDC J₀ / IFN γ J₃ (tests en série ou en parallèle).

2- Deuxième volet portant sur l'interférence possible des tests IDS et/ou IDC à J₀ avec la réponse au test IFN γ réalisé à J₃ :

Il est à noter en préambule qu'un tel questionnement remet en partie en cause le dogme selon lequel, les PPD utilisées pour la tuberculination étant des haptènes, elles ne seraient pas sensibilisantes même à court terme.

Afin de répondre à cette question, les experts se sont appuyés sur les données bibliographiques, la base de données n'étant pas exploitable à ce niveau, étant donné qu'aucun test IFN γ n'a été réalisé préalablement à l'IDT initiale.

La majorité des publications analysées par le GT s'appuient sur des données très disparates méthodologiquement concernant:

- le statut des animaux : non infectés, infectés expérimentalement, infectés naturellement, vaccinés avec du BCG, inoculés avec une bactérie inactive mais sans intention vaccinale, etc.
- l'hétérogénéité des animaux testés : âge, race, sexe, mode d'élevage, etc. ;
- le type de tuberculination : IDS ou IDC ;
- la nature du ou des antigènes utilisés pour stimuler la production d'IFN γ ;
- le moment où la réponse IFN γ était mesurée par rapport à l'IDT initiale.

Il ressort des études analysées les éléments suivants :

1- En ce qui concerne l'IDS :

Les premières études publiées sur la problématique de l'interférence entre l'IDS à J₀ et le test IFN γ réalisé ensuite (entre J₀ et J₈ en général) ont porté sur l'administration de PPD-B au pli sous-caudal (PSC), localisation interdite en France car réputée moins sensible que l'injection à l'encolure. Cette modalité d'administration est cependant à même de permettre de visualiser un effet de cette injection de PPD sur la réponse au test à l'IFN γ , s'il est pratiqué. Les données disponibles ont donc été prises en compte. Certains auteurs (Rothel *et al.* 1992, Whipple *et al.* 2001) ont abouti à la conclusion que l'IDT avait un effet stimulant sur la réponse IFN γ .

Cependant, dans une synthèse portant sur des travaux antérieurs, assortie d'une relecture des résultats qui avaient conduit à l'interprétation faite par Rothel *et al.* (1992) et Whipple *et al.* (2001), les travaux de Schiller *et al.* (2010) ont conclu que si l'on prend en compte à la fois la réponse vis-à-vis des PPD-B et PPD-A lors de la réalisation du test à l'IFN γ , le test IDS (PSC) n'induit pas d'augmentation significative de réponse, car, s'il y a une augmentation de la réponse à la PPD-B, la réponse à la PPD-A sera également augmentée. La synthèse de Schiller *et al.* (2010) tend donc à remettre en cause le fait jusqu'alors acquis par certains auteurs (Rothel *et al.* 1992, Whipple *et al.* 2001) que l'IDS (PSC) stimulerait la réponse IFN γ , les auteurs des études de 1992 et 2001 n'ayant considéré pour l'interprétation du résultat que la réponse à la PPD-B.

Il convient de noter que tous les travaux cités par Schiller *et al.* (2010) et qui ne montrent aucune différence significative après IDS concernent :

- des IDS au PSC et non à l'encolure ;
- des études réalisées après inoculation expérimentale de *M. bovis* virulentes (trois études) ou après injection d'une souche inactivée de *M. bovis* (une étude, dont les résultats sont considérés comme non

interprétables par Schiller et ses collaborateurs) ou après injection de PPD à des bovins non sensibilisés.

Cependant, dans une étude publiée la même année, Coad *et al.* (2010) aboutissent à une conclusion inverse qui rejoint les études de Rothel *et al.* (1992) et Whipple *et al.* (2001) : un effet de stimulation de la réponse INF γ après une IDS (PSC), dans un contexte d'infection naturelle de 23 animaux.

2- En ce qui concerne l'IDC :

Il ressort également des travaux analysés par Schiller *et al.* (2010), ainsi que de travaux antérieurs (Thom *et al.* 2006, Whelan *et al.* 2004) et postérieurs (Lopes *et al.* 2012), que quel que soit le mode d'infection des bovins (naturelle ou expérimentale), l'IDC n'interfère pas avec les résultats du test INF γ . Coad *et al.* (2010) aboutissent à la même conclusion après la répétition de test IDC alors qu'ils observent que cette répétition conduit, selon leurs résultats, à une décroissance de la réactivité des bovins pour l'IDC.

Cependant, l'étude plus récente de Jones *et al.* (2017) (dans un contexte de vaccination ou non par du BCG et d'infection ou non des bovins par *M. bovis*), tend à montrer un effet de stimulation de la réponse INF γ avec les cocktails peptidiques ESAT-6/CFP-10 et Rv3615c) par le test IDC lorsque celui-ci est réalisé une semaine plus tôt, alors que l'administration de BCG n'a aucun effet sur cette réponse, avec ces mêmes cocktails peptidiques, conformément à ce que l'on pouvait anticiper. Selon ces auteurs, cela conforte l'hypothèse d'une stimulation spécifique des lymphocytes T activés par l'infection par *M. bovis*.

En résumé, sur la base des données bibliographiques actuellement disponibles, il est difficile de conclure quant à un effet d'une tuberculination initiale préalable (IDS ou IDC) sur la réponse au test à l'INF γ , *a posteriori*, notamment dans des conditions d'infection naturelle. Ceci est imputable à la fois au faible nombre d'études et à la disparité des approches (même si une étude récente a utilisé à la fois des bovins infectés naturellement et expérimentalement). Nombre d'auteurs préconisent, dans leur conclusion, la réalisation d'études supplémentaires en conditions naturelles (d'autant plus que la majorité des études expérimentales utilisent de fortes doses de *M. bovis*, qui ne sont pas celles de la majorité des infections naturelles). Ces préconisations visent en particulier les bovins présentant une faible réponse INF γ et les bovins non infectés. Pour les tests utilisant les PPD, certains auteurs insistent également sur la nécessité de prendre en compte le possible impact de l'infection des bovins par des mycobactéries de l'environnement sur les réponses INF γ , les tests basés sur certains cocktails peptidiques comme ESAT-6/CFP-10 et Rv3615c ne présentant pas de tels inconvénients.

6 Incertitudes

Classe/sous classe	Source	Prise en compte (choix effectués,...)	Amplitude de l'impact sur le résultat (Faible, fort ou non qualifiable)	Direction (sur/ sous estimation ou non qualifiable)
CONTEXTE				
Cadrage Ce qui est induit par le contexte/ périmètre	Aspects réglementaires : la réglementation sur la tuberculose en France est assez complexe avec des arrêtés ministériels et des arrêtés préfectoraux, des cas particuliers et des dérogations, cela a sans doute un impact sur le terrain (complique les saisies de données, manque d'harmonisation dans SIGAL, etc.)	Sans objet	Fort	Sous ou sur estimation
Formulation des questions Ce qui entre dans le champ de l'expertise	La formulation des questions a été rediscutée avec le demandeur	Clarifications apportées par la DGAL	Faible	Non qualifiable

CORPUS DE CONNAISSANCES				
<p>Etat des connaissances bibliographiques</p> <p>Absence, incomplétude, inadéquation</p>	<p>Dans toutes les études, il existe une incertitude sur la définition des populations indemnes/infectées, les critères n'étant pas les mêmes pour tous les auteurs</p> <p>Incertitudes sur le statut des animaux (non infectés, infectés expérimentalement, infectés naturellement, inoculés avec une souche inactivée sans intention vaccinale, vaccinés avec du BCG)</p> <p>La réalisation pratique des IDT et leur interprétation varient également en fonction des études (ex. : absence de mesure de l'épaisseur initiale du pli de peau (J_0) en cas d'IDS alors qu'elle est réglementaire ; injection au pli sous-caudal parfois utilisée alors qu'elle est interdite en France)</p>	<p>Utilisation des fourchettes de valeurs issue de méta-analyses publiées</p>	<p>Fort</p>	<p>Non qualifiable</p>
	<p>Conclusions contradictoires en ce qui concerne la stimulation de la réponse au test IFNγ suite à une IDS ou une IDC</p>	<p>Prise en compte dans la conclusion</p>	<p>Forte</p>	<p>Sur et sous-estimation</p>

	<p>Pour les tests IFNγ : les antigènes utilisés ne sont pas les mêmes d'une étude à l'autre.</p> <p>Pas d'étude publiée qui utilise la combinaison des résultats des tests PPD et des tests avec les antigènes ESAT-6 et CFP-10.</p> <p>Les seuils de positivité des tests et les critères d'interprétation des résultats ne sont pas les mêmes selon les études</p>	Prise en compte dans la conclusion	Forte	Non qualifiable
<p>Méthode de collecte des données</p> <p>Représentativité, protocole, puissance, méthode de mesure</p>	<p>Faible nombre d'animaux ayant fourni des résultats positifs (ou infectés)</p> <p>La cohorte des animaux infectés n'inclut pas tous les bovins des élevages déclarés infectés. Une fois l'infection déclarée dans un troupeau, les bovins sont considérés comme contaminés et ne sont pas toujours testés pour confirmation bactériologique de l'infection.</p>	<p>Les éleveurs et vétérinaires ayant intégré le protocole étaient volontaires</p> <p>Bovins non inclus dans le protocole</p>	<p>Faible</p> <p>Non qualifiable</p>	<p>Non qualifiable</p> <p>Non qualifiable</p>
	Qualification des cheptels déclarés indemnes	Les experts ont considéré qu'une partie au moins des cheptels sur lesquels ils ont travaillé était à risque	Fort	Non qualifiable

	Les données des cheptels en assainissement par abattage partiel progressif et ayant fait l'objet de tests en parallèle manquaient pour la question 2	Sans objet	Fort	Non qualifiable
	Mauvaise qualité de la collecte de données	Sans objet	Fort	Non qualifiable
	La sensibilité troupeau du test IFN γ pourrait être sous-estimée : la porte d'entrée dans le protocole est que l'animal ait fourni un résultat positif ou douteux en IDT	Interprétation utile pour l'utilisation de l'IFN γ uniquement comme test complémentaire aux IDT mais non comme test utilisé en première intention	Faible	Sous-estimation ²⁵
Modèles mathématiques existants Adéquation, validité, paramètres....	Sans objet			
METHODE D'EVALUATION				
Données sélectionnées Critères de sélections, jugement d'experts, extrapolation	Mauvaise qualité de la base de données utilisée pour répertorier les résultats.	Elimination et correction de certaines données	Faible	Non qualifiable

²⁵ Un risque de surestimation ne peut être exclu totalement, même si la probabilité en est beaucoup plus faible, compte tenu de la sensibilité et de la précocité du test IFN γ

	Données sélectionnées dans la base de données pour le calcul de la sensibilité des tests (animaux infectés)	Nombre réduit de bovins mais ils sont réellement infectés (confirmation bactériologique). Intervalle de confiance plus grand que s'il y avait plus d'animaux.	Faible	Sur ou sous-estimation
	Données sélectionnées dans la base de données pour le calcul de la spécificité des tests (animaux indemnes)	Les experts ont considéré qu'à <i>minima</i> , il convenait de s'assurer que les élevages inclus dans la catégorie des élevages indemnes dans la base de données n'avaient pas été déclarés infectés ultérieurement à la constitution de la base de données, soit jusqu'à 2018. Pas de « gold standard » pour affirmer le statut indemne d'un animal.	Non qualifiable	Sous-estimation

<p>Méthodes d'intégration des données</p> <p>En lien avec le schéma conceptuel : choix des paramètres, extrapolation, logiciels utilisés, nombre de simulations</p>	Sans objet			
<p>Interprétation des résultats</p> <p>Peut générer des incertitudes en raison de biais cognitif des experts, d'extrapolation d'un champ à l'autre ou de perception dans un contexte de forts enjeux économiques et politiques</p>	<p>Au vu de la qualité des données et du faible effectif d'animaux, le gain de sensibilité du test IFNγ à J₃ par rapport au test IDC à J₄₂ ne peut pas être quantifié</p>	<p>L'observation des intervalles de confiance permet l'obtention des conclusions acceptables</p>	Faible	Sous-estimation et surestimation
	<p>Problème des animaux ayant fourni des résultats non conclusifs</p>	<p>Analyse de deux options, en fonction du contexte épidémiologique</p>	Fort	Sous-estimation et surestimation
COMMUNICATION DES RESULTATS				
Présentation des résultats	Sans objet			
Expression des résultats	Sans objet			

7 Conclusions et recommandations du groupe de travail

7.1 Conclusions du GT

Il convient de rappeler que la sensibilité et la spécificité discutées dans ce rapport, ne représentent pas la sensibilité et la spécificité intrinsèques des tests. Pour toutes les raisons énoncées dans le rapport, les termes de sensibilité et de spécificité sont à comprendre au sens de sensibilité et spécificité apparentes.

7.1.1 Concernant la sensibilité des tests IDT

L'exploitation de la littérature (articles de méta-analyses et rapports) ainsi que l'analyse de la base de données par le GT montre qu'il existe, dans la majorité des cas, une grande différence entre les valeurs de sensibilité des tests IDT. Cependant, les données de la bibliographie exploitées par le GT concordent sur le fait que la sensibilité de l'IDC est inférieure à celle de l'IDS. En effet, d'après la littérature analysée par le GT, la valeur médiane de la sensibilité de l'IDS varie entre 76,0 et 94,0 % alors que celle de l'IDC varie entre 49 % et 80 %. Ces variations de sensibilité de l'IDS sont probablement liées à des différences dans la mise en oeuvre et l'interprétation de ce test, ainsi qu'à des facteurs physiologiques pouvant conduire à des résultats faussement négatifs. Les facteurs concourant aux résultats faussement négatifs pour l'IDS, peuvent également être invoqués dans le cas de l'IDC. Pour cette dernière, s'y ajoutent d'autres facteurs techniques et immunologiques liés à l'utilisation combinée de la PPD-A et de la PPD-B. Il faut également noter que la réalisation technique de l'IDC est plus contraignante que celle de l'IDS.

L'analyse de la base de données ne permet pas de calculer la sensibilité des tests IDT à J_0 pour les animaux « protocole », le critère d'entrée étant un résultat IDT à J_0 non négatif. Pour ces animaux, la sensibilité de l'IDC calculée à J_{42} est de 38,9 %.

Pour les animaux « SR », la sensibilité du test IDS à J_0 est de 30,6 % et celle du test IDC à J_{42} de 50 %. Selon le GT, il est surprenant que ces valeurs soient aussi basses puisque ces données ont été obtenues dans le cadre d'un suivi renforcé : les biais liés à une mauvaise réalisation ou à une mauvaise lecture du test IDT auraient dû être limités. D'après le GT, la meilleure sensibilité de l'IDC à J_{42} dans cette population « SR » pourrait s'expliquer par le fait que certains animaux récemment infectés, n'auraient pu devenir réagissants qu'après l'IDT initiale, ce qui aurait permis de les détecter à J_{42} en IDC. Cependant, cette hypothèse ne peut pas être validée compte tenu du faible effectif d'animaux de la base de données. Un effet opérateur pourrait également être intervenu entre les deux IDT, dans l'hypothèse où les opérateurs étaient différents à J_0 et J_{42} . Il n'est pas possible d'exclure non plus l'hypothèse qu'un plus grand soin ait été apporté à la réalisation du 2^{ème} test (IDC J_{42}), du fait du statut suspect des animaux concernés, qui plus est dans un contexte épidémiologique défavorable (animaux « SR »). En outre, les experts n'excluent pas des erreurs de saisie dans la base de données.

7.1.2 Concernant la spécificité des tests IDT

Comme la sensibilité, les valeurs de spécificité de l'IDS obtenues dans la littérature sont très variables, avec des valeurs médianes de 91 % à 98,2 % selon les études. En revanche, la comparaison de la réaction entre les tuberculines bovines et aviaires permet d'augmenter la spécificité de l'IDC en comparaison avec l'IDS, avec des valeurs pouvant atteindre 100 % selon certains auteurs.

Parmi les facteurs physiopathologiques pouvant conduire à des résultats faussement positifs, le GT cite l'exposition à des mycobactéries atypiques, en particulier les mycobactéries du complexe MAC (*Mycobacterium avium intracellulare*), responsables de réactions croisées. De plus, un autre facteur important concourant à la variabilité des valeurs de spécificité obtenues dans la littérature est la définition des populations indemnes de référence. Selon les études notamment celles réalisées sur le terrain, ces populations pouvaient parfois être exposées à l'infection et dans d'autres cas elle étaient définies sur la base d'un résultat négatif à un ou plusieurs tests de dépistage (variable d'une étude à une autre).

L'analyse de la base de données a fourni des valeurs de spécificité pour l'IDC J₄₂ de 82,7 % pour les animaux « protocole » et de 93,9 % pour les animaux « SR », ce qui concorde avec les données de la littérature.

7.1.3 Concernant la sensibilité du test IFN γ

Les données de la littérature exploitées par le GT montrent que les valeurs médianes de sensibilité du test IFN γ sont comprises entre 73,6 et 92,5 %. Les tests IFN γ utilisant un cocktail associant les antigènes recombinants (ESAT-6 et CFP-10) possèdent globalement une sensibilité comparable à celle des tests utilisant les PPD. Selon les experts, il est difficile de généraliser ces données et de les extrapoler au contexte d'utilisation du test IFN γ en France. Les principales raisons sont :

- les antigènes utilisés, sachant que la majorité des études utilisent les PPD A et B ou les antigènes recombinants ESAT-6 et CFP-10, mais n'utilisent pas les quatre de façon combinée ;
- le fait que pour certains kits, il existe plusieurs versions disponibles qui n'ont pas forcément les mêmes caractéristiques ;
- les seuils de positivité et les modalités d'interprétation qui ne sont pas harmonisés.

Les données présentées ne peuvent donc être utilisées comme valeurs de référence. De plus, comme pour l'évaluation de la spécificité des tests IDT, les populations de référence sont variables d'un article à un autre.

Il ressort de l'analyse de la base de données que les valeurs de sensibilité du test IFN γ se situent dans le même ordre de grandeur que celles de la littérature. Ainsi, la sensibilité du test IFN γ à J₃ pour les animaux « protocole » est de 93,5 % si seuls les résultats positifs sont pris en compte, ou de 97,4 % si les résultats non conclusifs sont inclus dans les résultats positifs. Il convient de souligner que ces animaux ont été initialement sélectionnés sur la base d'une IDT initiale non négative, ce qui tend probablement à sous-estimer la sensibilité de l'IFN γ , certains animaux infectés avec un résultat IDT négatif pouvant présenter un résultat positif au test IFN γ à J₃. Inversement, un effet de surestimation pourrait être à l'œuvre, dans la mesure où la base de données ne donne pas accès aux bovins ayant fourni une réponse initiale négative en IDT et qui auraient fourni une réponse également négative au test IFN γ à J₃. Cependant, deux éléments ne plaident pas dans ce sens, d'une part le fait que le test IFN γ est réputé aussi sensible et plus précoce que l'IDS (et *a fortiori* plus sensible que l'IDC), et d'autre part, pour autant que ces résultats puissent être pris en compte, la sensibilité nettement plus élevée du test IFN γ à J₃ par rapport à l'IDS réalisée à J₀ dans le groupe des animaux « SR ».

Pour les animaux « SR », la sensibilité du test IFN γ à J₃ est de 75,0 % si seuls les résultats positifs sont pris en compte, ou de 86,1 % si les résultats non conclusifs sont inclus dans les résultats positifs. Cette sensibilité moindre peut être en partie expliquée par une proportion probablement plus importante d'animaux récemment exposés dans cette population.

7.1.4 Concernant la spécificité du test IFN γ

Les données de la littérature montrent que globalement, la spécificité du test IFN γ utilisant les PPD est proche de celle de l'IDT, avec une valeur médiane variant de 87,1 à 97 % selon les publications.

L'analyse de la base de données montre une valeur de spécificité de 43,9 % du test IFN γ à J₃ pour les animaux « protocole » pour les départements de la Dordogne et de la Côte-d'Or. Selon les experts, cette faible valeur pourrait être imputable aux critères d'inclusion des animaux indemnes.

Concernant les animaux « protocole » pour les tests réalisés à J₄₂, la spécificité de l'IDC est plus élevée que celle de l'IFN γ (88,5 vs 60,6 % pour les départements de Côte-d'or et Dordogne) malgré l'utilisation d'ESAT-6/CFP-10.

Pour les animaux « SR » (Dordogne), la spécificité du test IFN γ J₃ apparaît comme particulièrement faible. Cela n'est qu'en partie imputable au critère d'inclusion des bovins (réaction non négative au test IDT à J₀) qui a pris en compte le fait que dans le protocole national, le test IFN γ à J₃ est utilisé en série avec le test IDT. En effet, la spécificité reste faible lorsqu'on inclut l'ensemble des animaux « SR », qu'ils aient fourni une réponse positive ou négative en IDT à J₀. Le protocole national utilisé pour le dépistage est de nature à sur-sélectionner les animaux susceptibles de fournir une réponse positive au test IFN γ , notamment une réponse faussement positive. Une autre explication pourrait être qu'il s'agit d'animaux authentiquement infectés mais non détectés comme tels *in fine*. Il convient par ailleurs de relever que la taille de l'effectif est limitée. Les experts soulignent en outre les difficultés d'analyse générées par la qualité de la base de données. De ce fait, les experts ne peuvent se prononcer quant aux causes sous-jacentes à l'amélioration significative de la spécificité à J₄₂ du test IFN γ par rapport à celle observée à J₃, tout en relevant la faible spécificité du test IFN γ à J₄₂ comparée à celle de l'IDC J₄₂ et concernant globalement la très faible concordance observée entre les résultats des tests issus de la base de données.

7.1.5 Réponses aux questions de la saisine

- ✓ Question 1 : Suite à un résultat non négatif en IDT à J₃, quel est le risque de perte de sensibilité si l'on substitue l'IDC réalisée à J₄₂, par un test IFN γ à J₃ ? Cette éventualité ayant notamment comme prérequis l'évaluation de la sensibilité du test IFN γ à l'échelle individuelle et collective.

En se basant sur les résultats issus de l'analyse de la base de données, les experts soulignent que la substitution du test IDC réalisé à J₄₂ par un test IFN γ réalisé à J₃ combinant les antigènes PPD et ESAT-6/CFP-10, ne semble pas induire un risque de perte de sensibilité au niveau individuel et au niveau collectif. Les experts rappellent à ce propos, que la réponse IFN γ qu'aurait fournie certains des animaux « protocole » non réagissants en IDT à J₀ s'ils avaient été soumis à ce test, ne peut être connue. Or, si ces animaux non réagissants à l'IDT à J₀ avaient été soumis au test IFN γ à J₃, certains auraient pu fournir un résultat positif et s'avérer infectés *in fine*. Il est donc probable que la sensibilité individuelle et collective du test IFN γ effectuée à partir de la base de données soit sous-estimée.

- ✓ *Question 2i : Pouvez-vous comparer le risque de lever à tort la suspension de qualification suite d'une part à un résultat IFN γ négatif suite à la lecture du dépistage initial et suite d'autre part à un contrôle IDC négatif réalisé 6 semaines plus tard ?*

À partir de la base de données, le risque de lever à tort la suspension de qualification suite à un résultat IFN γ négatif suite à un dépistage initial en IDT non négatif, paraît moins élevé par rapport à celui associé à un résultat négatif à une IDC réalisée six semaines après l'IDT initiale. Il faut noter que compte tenu du faible nombre d'animaux analysés, il n'est pas possible de quantifier ce risque. A partir de l'analyse de la base de données et compte tenu des incertitudes, les experts considèrent que l'utilisation du test IFN γ à J₃ pourrait cependant améliorer la sensibilité.

- ✓ *Question 2ii : A partir de données de comparaison des tests IFN γ réalisés sur les mêmes échantillons avec des antigènes différents et de la comparaison avec des résultats bactériologiques, quels critères d'interprétation et quels antigènes seraient à adopter en fonction du contexte, selon qu'il s'agit d'un dépistage (suspicion faible ou forte) ou d'un assainissement par abattage partiel progressif, afin de viser une sensibilité maximale ?*

L'analyse de la bibliographie et de la base de données n'a pas permis aux experts de recommander des antigènes autres que ESAT-6 et CFP-10, en plus des PPD. Les experts soulignent que l'utilisation combinée des PPD et d'ESAT-6/CFP-10 est pertinente. La combinaison des antigènes (PPD + ESAT-6/CFP-10) permet, comme déjà signalé par l'étude de Faye *et al.* (2011) en France, d'adapter le test IFN γ en fonction des contextes épidémiologiques. Les experts soulignent l'importance de la prise en compte du contexte épidémiologique (contexte défavorable ou favorable), compte tenu du nombre important des résultats non conclusifs, et du fait que la majorité des animaux de la base de données proviennent de zones à risque. Il apparaît donc nécessaire de statuer sur le devenir de cette catégorie d'animaux ayant obtenu des résultats non conclusifs. Pour ce faire, mais aussi plus largement, pour poursuivre l'utilisation optimale du test IFN γ dans le processus national de dépistage, il conviendrait d'actualiser les seuils de positivité d'ESAT-6/CFP-10 seul et PPD seul, et de ré-évaluer l'interprétation des résultats des combinaisons, en fonction du contexte épidémiologique. Ce travail nécessite cependant des études complémentaires.

- ✓ *Question 2iii : Est-ce que cette évaluation dépend du type d'IDT réalisée en première intention ?*

Aucune donnée disponible ni à partir de la base de données ni à partir de la littérature, n'a permis au GT de comparer la sensibilité de la combinaison IDS J₀ / IFN γ J₃ versus celle de la combinaison IDC J₀ / IFN γ J₃ (tests en série ou en parallèle).

Par ailleurs, suite à l'analyse de la bibliographie actuellement disponible, il a été difficile de conclure à l'effet d'une tuberculination initiale préalable (IDC ou IDS) sur la réponse au test à l'IFN γ , *a posteriori*, notamment dans des conditions d'infection naturelle. Ceci est imputable à la fois au faible nombre d'études et à la disparité des approches (même si une étude récente a utilisé à la fois des bovins infectés naturellement et expérimentalement). Nombre d'auteurs préconisent, dans leur conclusion, la réalisation d'études supplémentaires en conditions naturelles (d'autant plus que la majorité des études expérimentales utilisent de fortes doses de *M. bovis*, qui ne sont pas celles de la majorité des infections naturelles). Ces préconisations visent en particulier les bovins présentant une faible réponse IFN γ et les bovins non infectés. Pour les tests utilisant les PPD, certains auteurs insistent également sur la nécessité de prendre en compte le possible impact de l'infection des bovins par des mycobactéries de

l'environnement sur les réponses IFN γ , les tests basés sur certains cocktails peptidiques comme ESAT-6/CFP-10 et Rv3615c ne présentant pas de tels inconvénients.

7.2 Recommandations du GT

Suite à cette analyse, plusieurs recommandations sont formulées par les experts, des recommandations d'études et de recherches mais également des recommandations plus axées sur la surveillance de la tuberculose en France et les tests de dépistage (les recommandations listées dans les paragraphes ci-dessous ne sont pas classées par ordre d'importance) :

- Compte tenu du nombre important des résultats non conclusifs observés pour le test IFN γ , tel qu'il est standardisé en France aujourd'hui, il est nécessaire de statuer sur le devenir de cette catégorie d'animaux. Pour cela les experts recommandent d'adapter le mode d'interprétation des résultats du test IFN γ en fonction du contexte épidémiologique, comme préconisé par les travaux de Faye *et al.* :
 - ✓ en « contexte défavorable » (élevages situés en zone à risque, dans une zone présentant une augmentation significative de l'incidence, ou élevages présentant d'autres facteurs de risque, par exemple des élevages en lien épidémiologique avec un foyer), la positivité d'une seule des deux stimulations (soit PPD, soit ESAT-6/CFP-10) devrait être prise en compte pour considérer un résultat comme positif ;
 - ✓ dans les autres situations, en « contexte favorable », c'est la positivité des deux stimulations (PPD et ESAT-6/CFP-10) qui serait requise pour considérer un test comme positif.

Nonobstant ces critères d'interprétation, l'accumulation de données devrait permettre de réévaluer les seuils de positivité des tests et par voie de conséquence, limiter la proportion de résultats non conclusifs. Dans ce cadre, les experts recommandent de mener une évaluation fine du contexte, incluant la réalisation et la documentation des enquêtes épidémiologiques ;

- Les experts du GT soulignent également qu'un important travail d'harmonisation est nécessaire pour le test IFN γ . Ce travail doit être poursuivi en France et à l'échelle européenne. Alors que le manuel de l'OIE décrit les procédures de production et de contrôle de la qualité des tuberculines, à ce jour, au niveau international, aucune procédure n'existe pour les antigènes utilisés pour les tests IFN γ . De même la validation des kits ELISA utilisés pour le dosage de l'IFN γ ne fait pas l'objet de procédure harmonisée. Les méthodes sont également fort disparates et devront être harmonisées ;
- En matière d'études et recherches, le GT souligne l'importance de mettre en place des études épidémiologiques rigoureuses afin de collecter des données de terrain de qualité, et de les analyser de manière approfondie pour mieux caractériser les performances des tests disponibles. Ceci permettra de mieux appréhender l'utilisation potentielle de ces tests dans le dispositif de décision sanitaire, en fonction des différents contextes épidémiologiques, particulièrement au sein des zones où la tuberculose bovine est la plus présente. Il conviendrait non seulement d'exploiter les données issues du dépistage utilisant le protocole national (tests en série), mais aussi celles issues de l'assainissement des troupeaux reconnus infectés par abattage partiel progressif, afin de disposer des données fournies par l'utilisation de plusieurs tests en parallèle. Dans ce contexte, un effort particulier pourrait être fourni en testant (par PCR et/ou culture) un échantillon d'animaux ayant fourni un résultat positif ou négatif en IDT et IFN γ afin d'évaluer plus finement sur le terrain, dans un contexte d'infection avérée, les performances respectives et conjointes de ces tests et la plus-value apportée par cette combinaison. Une telle étude pourrait par ailleurs contribuer à anticiper la question de la pertinence de l'utilisation d'un

test en parallèle dès le dépistage dans les situations les plus à risque. Inversement, des essais d'estimation de la spécificité des tests IDT et IFN γ et de leur combinaison devraient être réalisés dans des zones reconnues indemnes depuis longtemps en France ;

- Le GT insiste, à cet égard, sur la nécessité de permettre à la plateforme ESA (Epidémiosurveillance en Santé Animale) un accès plus aisé aux données de la base sanitaire (Sigal/Resytal). Des études *ad hoc* pourraient ainsi être développées, associant les différentes structures en charge de la surveillance épidémiologique, afin d'exploiter ces données au mieux et d'estimer plus finement les caractéristiques des tests de dépistage. Des équipes de recherche pourraient également être associées au pilotage de ces projets. Ces études permettraient également d'avoir un suivi en temps réel de la situation épidémiologique et de répondre à certaines questions soulevées dans l'analyse présentée dans le rapport ;
- Le GT préconise également l'application de toutes mesures visant à améliorer la mise en œuvre des tests de dépistage de la tuberculose sur le terrain. Une sensibilisation de tous les acteurs de terrain pour la bonne réalisation des tests IDT et IFN γ et le respect de la conduite à tenir en cas d'observation d'un résultat non négatif, sont à rappeler et à encourager ;
- Finalement, les experts s'accordent à dire que même si les données de la littérature exploitées donnent des indications sur les caractéristiques des tests de dépistage de la tuberculose bovine, seules des données fiables issues des campagnes de dépistage en France permettront de définir des valeurs de sensibilité et de spécificité des tests utilisés dans le contexte épidémiologique français.

Date de validation du rapport d'expertise collective par le CES SABA : 08 octobre 2019.

8 Bibliographie

8.1 Publications

- Aagaard, C., M. Govaerts, V. Meikle, J. A. Gutiérrez-Pabello, J. McNair, P. Andersen, F. Suárez-Güemes, J. Pollock, C. Espitia et A. Cataldi. 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* 96 (3-4):161-169. doi: 10.1016/j.prevetmed.2010.06.007.
- Aagaard, C., M. Govaerts, V. Meikle, A. J. Vallecillo, J. A. Gutierrez-Pabello, F. Suarez-Guemes, J. McNair, A. Cataldi, C. Espitia, P. Andersen et J. M. Pollock. 2006. "Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity." *J Clin Microbiol* 44 (12):4326-35. doi: 10.1128/jcm.01184-06.
- Abdellrazeq, G. S., M. M. Elnaggar, H. S. Osman, W. C. Davis et M. Singh. 2016. "Prevalence of Bovine Tuberculosis in Egyptian Cattle and the Standardization of the Interferon-gamma Assay as an Ancillary Test." *Transboundary and Emerging Diseases* 63 (5):497-507. doi: 10.1111/tbed.12291.
- Alvarez, A. H., A. Gutiérrez-Ortega, V. Gómez-Entzin, G. Pérez-Mayorga, J. Naranjo-Bastián, V. González-Martínez, F. Milián-Suazo, M. Martínez-Velázquez, S. Herrera-Rodríguez et E. Hinojoza-Loza. 2017. "Assessment of antigenic supplementation of bovine purified protein derivative for diagnosis of subclinical infection with *Mycobacterium bovis* in cattle." *Microbial Pathogenesis* 108:114-121. doi: 10.1016/j.micpath.2017.05.012.
- Anses. 2012. Avis 2012-SA-0011 relatif à l'utilisation de certains tests de diagnostic de la tuberculose bovine. Première partie : caractéristiques intrinsèques et performances du test interféron gamma. Maisons-Alfort.
- Anses. 2017. Avis 2015-SA-0089 relatif à l'illustrations et actualisation des recommandations pour l'évaluation du poids des preuves et l'analyse d'incertitude à l'Anses. Maisons-Alfort.
- Anses. 2019. Avis 2016-SA-0200 relatif à la gestion de la tuberculose bovine chez les blaireaux. Maisons-Alfort.
- Bass, K. E., B. J. Nonnecke, M. V. Palmer, T. C. Thacker, R. Hardegger, B. Schroeder, A. J. Raeber et W. R. Waters. 2013. "Clinical and diagnostic developments of a gamma interferon release assay for use in bovine tuberculosis control programs." *Clinical and Vaccine Immunology* 20 (12):1827-1835. doi: 10.1128/CVI.00519-13.
- Bénet, J. J. et B. Dufour. 2014. "Analyse de données épidémiologiques produites par la lutte contre la tuberculose bovine sur le terrain en France " *Epidémiologie et santé animale* 65:53-76.
- Berthet, F. X., P. B. Rasmussen, I. Rosenkrands, P Andersen et B Gicquel. 1998. "A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT= 6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10)." *Microbiology* 144 (11):3195-3203.
- Bezous, J., C. Casal, B. Romero, B. Schroeder, R. Hardegger, A. J. Raeber, L. López, P. Rueda et L. Domínguez. 2014. "Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis." *Res Vet Sci* 97 (S):S44-S52. doi: 10.1016/j.rvsc.2014.04.002.
- Boireau, Clémence. 2015. "Étude des caractéristiques intrinsèques du test interféron gamma utilisé en série suite à une intradermotuberculination dans le cadre du dépistage de la tuberculose bovine en France et enquête sociologique auprès des acteurs locaux." Thèse pour le doctorat vétérinaire, École nationale vétérinaire d'Alfort, Faculté de médecine de Créteil.
- Buddle, B. M., A. R. McCarthy, T. J. Ryan, J. M. Pollock, H. M. Vordermeier, R. G. Hewinson, P. Andersen et G. W. de Lisle. 2003. "Use of mycobacterial peptides and recombinant proteins for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-positive cattle." *Vet Rec* 153 (20):615-20.

- Buddle, B. M., T. J. Ryan, J. M. Pollock, P. Andersen et G. W. de Lisle. 2001. "Use of ESAT-6 in the interferon-gamma test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing." *Vet Microbiol* 80 (1):37-46.
- Casal, C., J. Bezos, A. Diez-Guerrier, J. Alvarez, B. Romero, L. de Juan, S. Rodriguez-Campos, M. Vordermeier, A. Whelan, R. G. Hewinson, A. Mateos, L. Dominguez et A. Aranaz. 2012. "Evaluation of two cocktails containing ESAT-6, CFP-10 and Rv-3615c in the intradermal test and the interferon-gamma assay for diagnosis of bovine tuberculosis." *Prev Vet Med* 105 (1-2):149-54. doi: 10.1016/j.prevetmed.2012.02.007.
- Cavalerie, L., A. Courcoul, M. L. Boschioli, E. Réveillaud et P. Gay. 2014. "Tuberculose bovine en France en 2014 : une situation stable." *Bulletin Épidémiologique*:4-11.
- Coad, M., D. Clifford, S. G. Rhodes, R. G. Hewinson, H. M. Vordermeier et A. O. Whelan. 2010. "Repeat tuberculin skin testing leads to desensitisation in naturally infected tuberculous cattle which is associated with elevated interleukin-10 and decreased interleukin-1 beta responses." *Vet Res* 41 (2):14. doi: 10.1051/vetres/2009062.
- Cockle, P. J., S. V. Gordon, R. G. Hewinson et H. M. Vordermeier. 2006. "Field evaluation of a novel differential diagnostic reagent for detection of *Mycobacterium bovis* in cattle." *Clin Vaccine Immunol* 13 (10):1119-24. doi: 10.1128/cvi.00209-06.
- Crozet, G., J. J. Bénet et A. Praud. 2019. "La tuberculose animale. Polycopié des Unités de maladies contagieuses des Ecoles Nationales Vétérinaires françaises." *Boehringer Ingelheim (Lyon)*:111 p.
- de la Rua-Domenech, R., A. T. Goodchild, H. M. Vordermeier, R. G. Hewinson, K. H. Christiansen et R. S. Clifton-Hadley. 2006. "Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques." *Res Vet Sci* 81 (2):190-210. doi: 10.1016/j.rvsc.2005.11.005.
- de Lisle, G. W., R. S. Green et B. M. Buddle. 2017. "Factors affecting the gamma interferon test in the detection of bovine tuberculosis in cattle." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 29 (2):198-202. doi: 10.1177/1040638716689114.
- Delavenne, C., F. Pandolfi, S. Girard, E. Réveillaud, P. Jabert, M.L. Boschioli, L. Dommergues, F. Garapin, N. Keck, F. Martin, M. Moussu, S. Philizot, J. Rivière, I. Tourette, D. Calavas, C. Dupuy, B. Dufour et F. Chevalier. 2019. "Tuberculose bovine : Bilan et évolution de la situation épidémiologique entre 2015 et 2017 en France métropolitaine." *Bulletin Epidémiologique, Santé Animale Alimentation*.
- Desquesnes, M. 1997. "International and regional standardization of immunoenzyme tests: methods, concerns and limitations." *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 16 (3):809-823.
- Doherty, M. L., M. L. Monaghan, H. F. Bassett et P. J. Quinn. 1995. "Effect of a recent injection of purified protein derivative on diagnostic tests for tuberculosis in cattle infected with *Mycobacterium bovis*." *Res Vet Sci* 58 (3):217-221.
- Duriez, M. 2016. "Evaluation d'un protocole alternatif de mesure du pli de peau lors de la tuberculination chez les bovins." Thèse pour le doctorat vétérinaire, ENVA.
- EFSA. 2012. "Scientific Opinion on the use of a gamma interferon test for the diagnosis of bovine tuberculosis." *EFSA Journal* 10 (12):2975.
- El-Naggar, M. M., G. S. Abdellrazeq, M. Sester, S. A. Khaliel, M. Singh, H. A. Torkey et W. C. Davis. 2015. "Development of an improved ESAT-6 and CFP-10 peptide-based cytokine flow cytometric assay for bovine tuberculosis." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 42:1-7. doi: 10.1016/j.cimid.2015.07.005.
- Faye, S., J. L. Moyen, H. Gares, J. J. Bénet, B. Garin-Bastuji et M. L. Boschioli. 2011. "Determination of decisional cut-off values for the optimal diagnosis of bovine tuberculosis with a modified IFN-gamma assay (Bovigam(R)) in a low prevalence area in France." *Vet Microbiol* 151 (1-2):60-7. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.02.026.

- Faye, Sandy. 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." Thèse d'Université, AgroParisTech.
- García-Sáenz, A. 2010. "Metanàlisi per a determinar la sensibilitat i l'especificitat de la Intradermoreacció i del Gamma-interferó, en el diagnòstic ante-mortem de la Tuberculosis bovina. ." Thèse de master, Universitat Autònoma de Barcelona,.
- Haddad, N., A. Ostyn, C. Karoui, M. Masselot, M. F. Thorel, S. L. Hughes, J. Inwald, R. G. Hewinson et B. Durand. 2001. "Spoligotype Diversity of *Mycobacterium bovis* Strains Isolated in France from 1979 to 2000." *J Clin Microbiol* 39 (10):3623-3632. doi: 10.1128/jcm.39.10.3623-3632.2001.
- Humblet, M. F., J. L. Moyen, P. Bardoux, M. L. Boschioli et C. Saegerman. 2011. "The Importance of Awareness for Veterinarians Involved in Cattle Tuberculosis Skin Testing." *Transboundary and Emerging Diseases* 58 (6):531-536. doi: 10.1111/j.1865-1682.2011.01228.x.
- Je, S., U. C. Yeo, T. Song, K. C. Kim, S. Y. Park, M. J. Kim et S. N. Cho. 2014. "Extent of *Mycobacterium bovis* infection in dairy cattle herds subject to partial culling as determined by an interferon-gamma assay." *Journal of Veterinary Science* 15 (2):259-265. doi: 10.4142/jvs.2014.15.2.259.
- Jenkins, A. O., E. Gormley, N. Gcebe, G. T. Fosgate, A. Conan, C. Aagaard, A. L. Michel et Vpmg Rutten. 2018. "Cross reactive immune responses in cattle arising from exposure to *Mycobacterium bovis* and non-tuberculous mycobacteria." *Prev Vet Med* 152:16-22. doi: 10.1016/j.prevetmed.2018.02.003.
- Jones, G. J., M. Coad, B. Khatri, J. Bezos, N. A. Parlane, B. M. Buddle, B. Villarreal-Ramos, R. G. Hewinson et H. M. Vordermeier. 2017. "Tuberculin Skin Testing Boosts Interferon Gamma Responses to DIVA Reagents in *Mycobacterium bovis*-Infected Cattle." *Clin Vaccine Immunol* 24 (5). doi: 10.1128/cvi.00551-16.
- Lambert, O. et J. J. Bénét. 2015. "Evaluation d'un protocole alternatif de mesure du pli de peau lors de tuberculination chez les bovins." *Bulletin Épidémiologique Santé animale -Alimentation* 73:14-15.
- Lopes, L. B., T. M. Alves, A. P. R. Stynen, P. M. P. C. Mota, R. C. Leite et A. P. Lage. 2012. "Parameter estimation and use of gamma interferon assay for the diagnosis of bovine tuberculosis in Brazil." *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 32 (4):279-283. doi: 10.1590/S0100-736X2012000400001.
- Neill, S. D., J. Cassidy, J. Hanna, D. P. Mackie, J. M. Pollock, A. Clements, E. Walton et D. G. Bryson. 1994. "Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma." *Vet Rec* 135 (6):134-5. doi: 10.1136/vr.135.6.134.
- Nuñez-García, J., S. H. Downs, J. E. Parry, D. A. Abernethy, J. M. Broughan, A. R. Cameron, A. J. Cook, R. de la Rua-Domenech, A. V. Goodchild, J. Gunn, S. J. More, S. Rhodes, S. Rolfe, M. Sharp, P. A. Upton, H. M. Vordermeier, E. Watson, M. Welsh, A. O. Whelan, J. A. Woolliams, R. S. Clifton-Hadley et M. Greiner. 2018. "Meta-analyses of the sensitivity and specificity of ante-mortem and post-mortem diagnostic tests for bovine tuberculosis in the UK and Ireland." *Preventive Veterinary Medicine* 153:94-107. doi: 10.1016/j.prevetmed.2017.02.017.
- Palmer, M. V., W. R. Waters, T. C. Thacker, W. C. Stoffregen et B. V. Thomsen. 2006. "Experimentally induced infection of reindeer (*Rangifer tarandus*) with *Mycobacterium bovis*." *J Vet Diagn Invest* 18 (1):52-60. doi: 10.1177/104063870601800107.
- Pollock, J. M., R. M. Girvin, K. A. Lightbody, R. A. Clements, S. D. Neill, B. M. Buddle et P. Andersen. 2000. "Assessment of defined antigens for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-reactor cattle." *Vet Rec* 146 (23):659-65.
- Praud, A., C. Boireau et B. Dufour. 2016. "Sensitivity of γ -interferon test used in series after tuberculin test to detect bovine tuberculosis." *Veterinary Record* 179 (7):174. doi: 10.1136/vr.103803.
- Praud, A., M. L. Boschioli, L. Meyer, B. Garin-Bastuji et B. Dufour. 2015. "Assessment of the sensitivity of the gamma-interferon test and the single intradermal comparative cervical test for

- the diagnosis of bovine tuberculosis under field conditions." *Epidemiol Infect* 143 (1):157-66. doi: 10.1017/s0950268814000338.
- Praud, A., C. Bourély, M. L. Boschioli et B. Dufour. 2019. "Assessment of the specificity of a gamma-interferon test performed with specific antigens to detect bovine tuberculosis, after non-negative results to intradermal tuberculin testing." *Veterinary Record Open* 6 (1):e000335.
- Rangen, S. A., O. P. Surujballi, C. Lutze-Wallace et V. W. Lees. 2009. "Is the gamma interferon assay in cattle influenced by multiple tuberculin injections?" *Canadian Veterinary Journal* 50 (3):270-274.
- Robbe-Austerman, S, A. C. Krull et J. R. Stabel. 2006. "Time delay, temperature effects and assessment of positive controls on whole blood for the gamma interferon ELISA to detect paratuberculosis." *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 53 (5):213-217.
- Rothel, J. S, S. L. Jones, L. A. Corner, J. C. Cox et P. R. Wood. 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* 69 (1):1-4.
- Schiller, I., H. M. Vordermeier, W. R. Waters, M. Palmer, T. Thacker, A. Whelan, R. Hardegger, B. Marg-Haufe, A. Raeber et B. Oesch. 2009. "Assessment of Mycobacterium tuberculosis OmpATb as a novel antigen for the diagnosis of bovine tuberculosis." *Clinical and Vaccine Immunology* 16 (9):1314-1321. doi: 10.1128/CVI.00151-09.
- Schiller, I., H. M. Vordermeier, W. R. Waters, A. O. Whelan, M. Coad, E. Gormley, B. M. Buddle, M. Palmer, T. Thacker, J. McNair, M. Welsh, R. G. Hewinson et B. Oesch. 2010. "Bovine tuberculosis: effect of the tuberculin skin test on in vitro interferon gamma responses." *Vet Immunol Immunopathol* 136 (1-2):1-11. doi: 10.1016/j.vetimm.2010.02.007.
- Sidders, B., C. Pirson, P. J. Hogarth, R. G. Hewinson, N. G. Stoker, H. M. Vordermeier et K. Ewer. 2008. "Screening of Highly Expressed Mycobacterial Genes Identifies Rv3615c as a Useful Differential Diagnostic Antigen for the Mycobacterium tuberculosis Complex." *Infection and Immunity* 76 (9):3932-3939. doi: 10.1128/iai.00150-08.
- Smith, N. H., S. V. Gordon, R. de la Rúa-Domenech, R. S. Clifton-Hadley et R. G. Hewinson. 2006. "Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of Mycobacterium bovis." *Nat Rev Microbiol* 4 (9):670-81. doi: 10.1038/nrmicro1472.
- Thom, M., J. H. Morgan, J. C. Hope, B. Villarreal-Ramos, M. Martin et C. J. Howard. 2004. "The effect of repeated tuberculin skin testing of cattle on immune responses and disease following experimental infection with Mycobacterium bovis." *Vet Immunol Immunopathol* 102 (4):399-412. doi: 10.1016/j.vetimm.2004.08.005.
- Thom, M. L., J. C. Hope, M. McAulay, B. Villarreal-Ramos, T. J. Coffey, S. Stephens, H. M. Vordermeier et C. J. Howard. 2006. "The effect of tuberculin testing on the development of cell-mediated immune responses during Mycobacterium bovis infection." *Vet Immunol Immunopathol* 114 (1-2):25-36.
- Thrusfield, M. V. 2007. *Veterinary Epidemiology*. Traduit par. Edité par 3rd edition Wiley-Blackwell.
- van Dijk, J. 2013. "Towards Risk-Based Test Protocols: Estimating the Contribution of Intensive Testing to the UK Bovine Tuberculosis Problem." *PLoS ONE* 8 (5). doi: 10.1371/journal.pone.0063961.
- Vordermeier, M., A. Goodchild, R. Clifton-Hadley et R. de la Rúa. 2004. "The interferon-gamma field trial: background, principles and progress." *Vet Rec* 155 (2):37-8.
- Vordermeier, M., S. V. Gordon et R. G. Hewinson. 2011. "Mycobacterium bovis antigens for the differential diagnosis of vaccinated and infected cattle." *Vet Microbiol* 151 (1-2):8-13. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.02.020.
- Waters, W. R., B. J. Nonnecke, S. C. Olsen et M. V. Palmer. 2007. "Effects of pre-culture holding time and temperature on interferon-gamma responses in whole blood cultures from Mycobacterium bovis-infected cattle." *Vet Microbiol* 119 (2-4):277-82. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.08.014.

- Whelan, A. O., M. Coad, Z. A. Peck, D. Clifford, R. G. Hewinson et H. M. Vordermeier. 2004. "Influence of skin testing and overnight sample storage on blood-based diagnosis of bovine tuberculosis." *Vet Rec* 155 (7):204-6.
- Whipple, D. L., C. A. Bolin, A. J. Davis, J. L. Jarnagin, D. C. Johnson, R. S. Nabors, J. B. Payeur, D. A. Saari, A. J. Wilson et M. M. Wolf. 1995. "Comparison of the sensitivity of the caudal fold skin test and a commercial gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis." *Am J Vet Res* 56 (4):415-9.
- Whipple, D. L., M. V. Palmer, R. E. Slaughter et S. L. Jones. 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." *J Vet Diagn Invest* 13 (2):117-22. doi: 10.1177/104063870101300204.
- Wood, P. R., L. A. Corner, J. S. Rothel, J. L. Ripper, T. Fifis, B. S. McCormick, B. Francis, L. Melville, K. Small, K. de Witte et et al. 1992. "A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis." *Vet Microbiol* 31 (1):71-9.
- Wood, P. R. et S. L. Jones. 2001. "BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis." *Tuberculosis (Edinb)* 81 (1-2):147-55. doi: 10.1054/tube.2000.0272.
- Wright, P. F., E. Nilsson, E. M. A. Van Rooij, M. Leleanta et M. H. Jeggo. 1993. "Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis." *Revue scientifique et technique-office internationale des épizooties* 12:435-435.

8.2 Législation et réglementation

8.2.1 Directives

Directive 64/432/CEE du Conseil du 26 juin 1964, 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, p. 1977-2012*

ELI: <http://data.europa.eu/eli/dir/1964/432/oj>

Directive 97/12/CE du Conseil du 17 mars 1997 portant modification et mise à jour de la Directive 64/432/CEE relative à des problèmes de police sanitaire en matière d'échanges intracommunautaires d'animaux des espèces bovines et porcines. *Journal officiel n° L 109 du 25/04/1997 p. 0001-0037*

ELI: <http://data.europa.eu/eli/dir/1997/12/oj>

8.2.2 Décisions

Décision 2001/26/CE de la Commission du 27 décembre 2000 modifiant pour la quatrième fois la décision 1999/467/CE établissant le statut de troupeau officiellement indemne de tuberculose dans certains États membres ou régions d'États membres. *Journal officiel n° L 006 du 11/01/2001 p. 0018 - 0019*

ELI: [http://data.europa.eu/eli/dec/2001/26\(1\)/oj](http://data.europa.eu/eli/dec/2001/26(1)/oj)

8.2.3 Notes de service et instructions techniques

Instruction technique DGAL/SDSPA/2019-581 du 31/07/2019 modifiant l'instruction technique DGAL/SDSPA/2015-803 du 23/09/2015 : Tuberculose bovine : dispositions techniques au dépistage sur animaux vivants.

<https://info.agriculture.gouv.fr/gedei/site/bo-agri/instruction-2019-581>, consulté le 09/09/2019

Instruction technique DGAL/SDSPA/2018-598 du 06/08/2018 relative aux modalités techniques et financières de mise en œuvre de la campagne de surveillance de la tuberculose bovine 2018-2019

<https://info.agriculture.gouv.fr/gedei/site/bo-agri/instruction-2018-598>, consulté le 07/10/2019

Note de service DGAL/SDSPA/2016-1001 du 22/12/2016 relative aux modalités techniques de gestion des suspicions de tuberculose bovine (mise à jour pour la campagne de prophylaxie 2016-2017)

<https://info.agriculture.gouv.fr/gedei/site/bo-agri/instruction-2016-1001>, consulté le 02/09/2019

Note de service DGAL/SDSPA/2014-864 du 29/10/2014 portant sur une modification de la note de service DGAL/SDSPA/N2013-8162 relative au protocole expérimental d'évaluation de l'interféron gamma

<https://info.agriculture.gouv.fr/gedei/site/bo-agri/instruction-2014-864>, consulté le 02/09/2019

Notes de service DGAL/SDSPA/2014-541 du 04/07/2014 relative à une dérogation à l'abattage total de certains troupeaux de bovins infectés de tuberculose - Critères d'éligibilité et protocole applicable.

<https://info.agriculture.gouv.fr/gedei/site/bo-agri/instruction-2014-541>, consulté le 02/09/2019

Note de service DGAL/SDSPA/N2013-8202 du 04/12/2013 relative à la tuberculose bovine : diagnostic de laboratoire post-mortem.

<https://info.agriculture.gouv.fr/gedei/site/bo-agri/instruction-N2013-8202>, consulté le 02/09/2019

Note de service DGAL/SDSPA/N2013-8162 du 08/10/2013 relative au protocole expérimental d'évaluation de l'interféron gamma.

https://agriculture.gouv.fr/sites/minagri/files/documents/pdf/Protocole_evaluation_interferon_DGALN20138162_cle018ba9.pdf, consulté le 02/09/2019

ANNEXES

Annexe 1: Lettre de saisine

COURRIER ARRIVE

15 MAI 2017

DIRECTION GENERALE



2017 -SA- 0 1 2 1

N° - 0 4 5 1 - D

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE, DE L'AGROALIMENTAIRE ET DE LA FORÊT

Direction générale de l'alimentation
Service de l'action sanitaire en production primaire
Sous-direction de la santé et protection animales
Bureau de la santé animale

Suivi par : L. Cavalerie
 Tél : 01 49 55 86 26
 Réf. Interne : BSA/1612036

Le Directeur Général de l'Alimentation

à

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

11 MAI 2017

Objet : Saisine sur le recours au test du dosage de l'interféron gamma pour gérer des suspicions de tuberculose bovine faisant suite à des dépistages en élevage par intradermotuberculination

Conformément aux articles L. 1313-1 et 1313-3 du Code de la santé publique, j'ai l'honneur de solliciter l'avis de l'Anses sur le recours au dosage de l'interféron gamma dans le cadre de la gestion des suspicions de tuberculose bovine.

I. Contexte

La France fait face à une situation de lutte contre la tuberculose bovine complexe de la persistance de foyers résiduels dans certaines zones impliquant le maintien d'une pression de dépistage importante (de l'ordre de 750 000 bovins par an), dans un contexte d'incidence globalement très basse (de l'ordre de 0,05 % de troupeaux infectés incidents par an) et d'un faible pourcentage de réactions d'intradermotuberculination (IDT) simple (IDS) ou comparative (IDC) pour lesquelles l'abattage diagnostique confirme la présence de l'infection (de l'ordre de 10% des troupeaux présentant au moins une réaction non négative en IDT).

Dans le cadre de la qualification des troupeaux bovins, une démarche d'investigation des suspicions a été construite en se basant sur les principes de la réglementation européenne (Directive 64/432) et qui consiste à différencier les situations de résultats positifs entraînant des suspicions fortes et des résultats non conclusifs entraînant des suspicions faibles, le statut du troupeau dépendant du résultat le plus défavorable qui y est observé et le statut officiellement indemne devant être suspendu pendant la phase d'investigation.

Dans le cas des suspicions fortes, les animaux réagissant doivent faire l'objet d'abattage diagnostique et si la maladie n'est pas confirmée à ce stade le troupeau doit fournir un dépistage IDT favorable 6 semaines plus tard avant de se voir réattribuer sa qualification.

Dans le cas des suspicions faibles, il existe deux voies d'investigation, une voie dite rapide et une voie dite « conservatoire ». Dans le cas de la voie rapide, les animaux réagissant font l'objet d'abattage diagnostique et en cas de résultat favorable la suspension de qualification est levée. Dans le cas de la voie « conservatoire » les animaux réagissant sont dépistés à nouveaux, selon le protocole de la directive 64/432, 6 semaines plus tard par IDC et en cas de résultat favorable la suspension de qualification est levée, sinon le troupeau est placé en suspicion forte.

Compte tenu des caractéristiques de la maladie il est nécessaire de maintenir la pression de dépistage plusieurs années dans les zones où la maladie a été identifiée, lorsque les vétérinaires et les éleveurs réalisent dans des conditions satisfaisantes les dépistages, des résultats non conclusifs sont observés régulièrement, même en l'absence de maladie. Les conséquences de ces suspensions de qualification répétées d'année en année, sans que la maladie ne soit confirmée, sont principalement une

décrédibilisation de l'IDT, même auprès des vétérinaires, et une perte importante d'acceptabilité par les éleveurs liée aux périodes de blocage et/ou aux abattages diagnostiques.

Pour améliorer cette situation, des protocoles reposant sur le dosage de l'interféron gamma (test IFN- γ) après une stimulation des lymphocytes par des antigènes de protéines dérivées purifiées de mycobactéries aviaires et bovines (PPD) et des antigènes spécifiques (ESAT6, CFP10) ont été développés et on fait l'objet d'une première évaluation (avis du 4 décembre 2012 à la Saisine n°2012-SA-0011).

Cette méthode de dépistage a été évaluée par l'EFSA (EFSA Journal 2012;10(12):2975) mais uniquement dans une perspective de substitution de l'IDT par un test IFN- γ basé sur les PPD. Cette évaluation a conclu à l'équivalence en termes de sensibilité de cette méthode et de l'IDT, a souligné la nécessité de poursuivre l'harmonisation de son utilisation au niveau européen et a soulevé certaines inquiétudes sur la spécificité du test.

Sur la base de l'avis complémentaire de l'Anses (Saisine n°2012-SA-0011), la DGAI a proposé à la Commission européenne de mener une expérimentation à grande échelle, dont les principes ont été présentés aux autres Etats membres, pour évaluer la pertinence d'un schéma d'investigation, plus rapide, des résultats non conclusifs plus rapide consistant à remplacer le recontrôle par IDC à 6 semaines par un test IFN- γ réalisé suite à la lecture de l'IDT non négative. Pour évaluer l'opportunité d'un tel schéma l'expérimentation se proposait de comparer pendant plusieurs années (deux campagnes de dépistages : 2013-2014 et 2014-2015) les résultats obtenus au test IFN- γ réalisé suite à la lecture au recontrôle IDC 6 semaines plus tard et à un test IFN- γ réalisé conjointement à l'IDC de recontrôle pour évaluer si l'intradermotuberculinisation initiale avait un effet désensibilisant conduisant à une perte de sensibilité du test IFN- γ réalisé suite à la lecture. Les animaux réagissant à au moins un des tests devaient faire l'objet d'un abattage diagnostique. Ce protocole a été maintenu dans le cadre de la note de service DGAL/SDSPA/2016-1001, qui permet notamment de préciser la notion de résultat non conclusif.

Une partie des données recueillies n'a pas pu être exploitée en raison de problème de qualité d'enregistrement, d'écart vis-à-vis du protocole expérimental ou de corrélation statistique. Les données exploitant les séries complètes sur les bovins qui se sont avérés infectés, permettant un calcul de sensibilité, ont fait l'objet d'un article publié dans une revue internationale (2016, Aug 13;179(7):174¹). Cette étude a montré que la sensibilité du test IFN- γ suite à la lecture serait significativement plus élevée que la sensibilité de l'IDC 6 semaines plus tard.

Pour pouvoir être généralisé il convient, sur la base de cette expérimentation, d'évaluer le risque lié à un tel protocole alternatif et à partager cette évaluation, sous réserve qu'elle soit favorable, au plan international et notamment européen pour son intégration dans les standards de qualification.

La conduite de cette expérimentation a contribué à acquérir une expérience de référence solide sur le test IFN- γ et les conditions de maîtrise de sa bonne réalisation en laboratoire agréé, ce qui pourrait constituer un éclairage utile pour le LRUE dans une perspective de généralisation du protocole.

Une piste d'amélioration de ce protocole serait de n'utiliser que les antigènes spécifiques dans le contexte d'investigation d'un résultat non conclusif. En effet, un écueil de l'utilisation du test IFN- γ est son manque de spécificité, notamment dans un contexte où les causes de manque de spécificité de l'IDT peuvent être identiques à celles du manque de spécificité du test IFN- γ avec les antigènes PPD. Le fait de n'employer que les antigènes spécifiques permet d'avoir un regard véritablement complémentaire par rapport au dépistage IDT et d'après les résultats de l'expérimentation, sans perte notable de sensibilité. De plus le recours à une seule série d'antigène permettrait de réduire le coût et la complexité liée aux tableaux de contingence d'interprétation des résultats. Toutefois, dans les contextes d'assainissement par abattage partiel ou lors d'investigation de certains liens épidémiologiques, les deux types d'antigènes seraient utilisés en considérant qu'une réaction à l'un ou l'autre type conduit à une interprétation positive du résultat de sorte à augmenter la sensibilité du dépistage.

1 PRAUD A., BOIREAU C., DUFOUR B., Sensitivity of γ -interferon test used in series after tuberculin test to detect bovine tuberculosis. Vet Rec. 2016 Aug 13;179(7):174. doi: 10.1136/vr.103803. Epub 2016 Jul 11.

II. Questions posées

Outre la valorisation par l'article publié, qui répond à l'objectif principal du protocole, d'autres exploitations des données collectées sont-elles envisageables pour étudier notamment l'effet de défaut de sensibilité du test IFN- γ réalisé le jour de la lecture par rapport à celui réalisé 6 semaines plus tard ?

Pouvez vous comparer le risque de lever à tort la suspension de qualification suite d'une part à un résultat IFN- γ négatif réalisé suite à la lecture du dépistage initial et suite d'autre part à un contrôle IDC négatif réalisé 6 semaines plus tard ? Pouvez vous décliner la réponse en fonction du type d'antigènes utilisés et des règles d'interprétation des résultats, en particulier si seuls les antigènes spécifiques sont utilisés ? Est-ce que cette évaluation dépend du type d'IDT réalisée en première intention ?

Par ailleurs pouvez vous évaluer la pertinence du recours à l'IDS comme test de dépistage IDT en première intention dans le contexte épidémiologique actuel ? Est-ce que la perspective de pouvoir investiguer les résultats non conclusifs par un test IFN- γ modifie cette évaluation ?

Je vous remercie de bien vouloir accuser réception de la présente demande. Une réponse à l'issue de l'été 2017 est attendue afin de préparer la prochaine campagne de prophylaxie (2017-2018).


Le Directeur Général de l'Alimentation,
Patrick DEHAUMONT

Annexe 2 : Profil de recherche bibliographique

PARTIE 1 - CADRAGE ET DÉFINITION DU PROFIL

1.1 DÉFINIR LES BESOINS DE RECHERCHE

Ce formulaire permet de tracer l'orientation de la recherche bibliographique, en application de la procédure [ANSES/PR1/9/01] « Organisation de la réalisation d'une expertise en réponse à une saisine ou une auto-saisine » :

Bases de données (ex : Scopus, PubMed, CAB Abstracts...)	Scopus, Pubmed	Périmètre	Monde
Mots-clés principaux	Bovine tuberculosis, <i>Mycobacterium bovis</i> , gamma-interferon test, single intradermal comparative cervical tuberculin test (SICCT), single intradermal tuberculin test (SIT)		
Organismes référents identifiés sur le sujet	LNR tuberculose bovine, Anses Maisons-Alfort		
Rapports et publications identifiés en amont de la saisine	<p>Thèse de Boireau, C. 2015. "Etude des caractéristiques intrinsèques du test interféron gamma utilisé en série suite à une intradermotuberculination dans le cadre du dépistage de la tuberculose bovine en France et enquête sociologique auprès des acteurs locaux."</p> <p>- Praud, A., C. Boireau et B. Dufour. 2016. "Sensitivity of gamma-interferon test used in series after tuberculin test to detect bovine tuberculosis." <i>Vet Rec</i> 179 (7):174. doi: 10.1136/vr.103803.</p> <p>- Praud, A., M. L. Boschioli, L. Meyer, B. Garin-Bastuji et B. Dufour. 2015. "Assessment of the sensitivity of the gamma-interferon test and the single intradermal comparative cervical test for the diagnosis of bovine tuberculosis under field conditions." <i>Epidemiol Infect</i> 143 (1):157-66. doi: 10.1017/s0950268814000338.</p> <p>- Avis de l'Anses 2012-SA-0011 relatif à l'utilisation de certains tests de diagnostic de la tuberculose bovine</p>		
Projets de Recherche (APRs Anses, ANR, FP7 etc.)	RAS		
Logiciel bibliographique utilisé (ex : EndNote, Zotero)	(Vérifier les outils utilisés par les experts) (Avez-vous suivi une formation « EndNote » ces 2 dernières années ?) OUI		
Mise en surveillance de sources d'information (veille)	<input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON (Avez-vous suivi la formation « Veille avec les flux RSS » ?)		

* renseignements des champs obligatoires

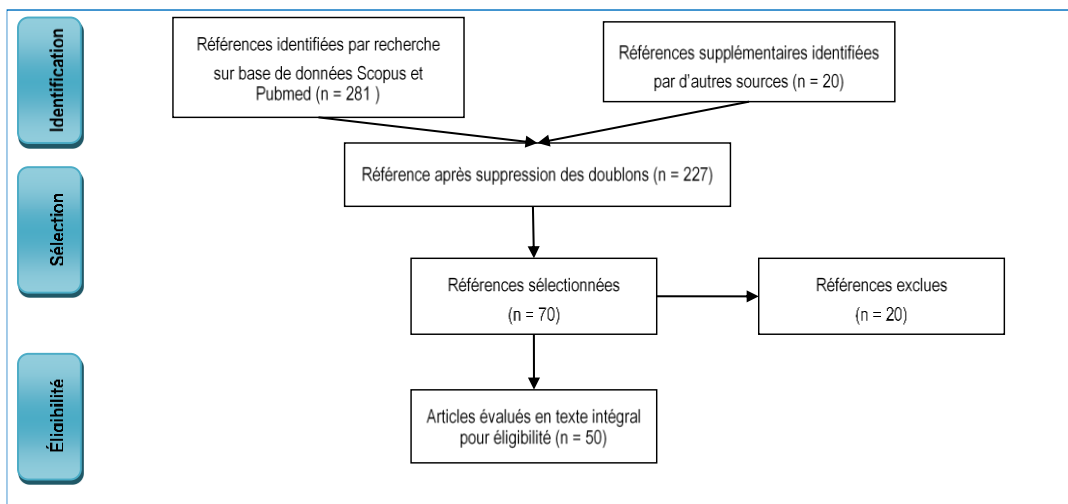
Thématique	Mots-clés issus de thésaurus	Autres termes
<p>Population* (ou sujets étudiés)</p> <p>Bovins</p> <p><i>Mycobacterium bovis</i>, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>, <i>Mycobacterium caprae</i></p>	<p>OR (bovine, cattle, "cattle herds", "cattle farms", "dairy cattle")</p> <p>OR ("Bovine tuberculosis", "<i>Mycobacterium bovis</i>", "<i>Mycobacterium tuberculosis</i>", "<i>Mycobacterium avium</i>")</p>	
<p>Intervention* ciblée (peut désigner une technologie, un médicament, un mode d'intervention ou un programme) : tests diagnostiques / Exposition</p>	<p>OR (epidemiology, diagnostic test*, diagnostic, tuberculin skin test*, comparative cervical tuberculin test*, single intradermal tuberculin test*, gamma interferon test, recombinant proteins, peptide cocktail, specific antigen MIX, ESAT6, CFP10, ESAT-6, CFP-10, "ESAT-6/CFP-10", "ESAT6-CFP10", PPD, IFNγ, Bovigam, ID-vet, ELISA, optical density)</p>	
<p>Comparateur* :</p>	-	
<p>Outcome* (résultat d'intérêt événement mesuré, critère de jugement. Ex : mortalité; effets sur la santé, effets psychosociaux, perceptions, résultats économiques) : sensibilité, spécificité</p>	<p>OR (sensitivity, specificity)</p>	
<p>Temporalité (Périodes de recherche)</p>	2009-2018	

Pour le détail de la méthode : EFSA (2010). Application of systematic review methodology to food and feed safety assessments to support decision making. *Efsa Journal* 8(6):1637 [doi:10.2903/j.efsa.2010.1637](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1637)

PARTIE 2 – RECOMMANDATIONS POUR LA RESTITUTION DE LA STRATÉGIE DE RECHERCHE

Les éléments ci-dessous, avec deux options possibles, guident les modalités d'explicitation de la stratégie de recherche au niveau du produit d'expertise ou d'appui scientifique et technique.

1.1 DIAGRAMME PRISMA (extrait et adapté de Gedda, 2015)



Annexe 3 : Antigènes utilisés dans quelques études bibliographiques dans le cadre du test IFN γ

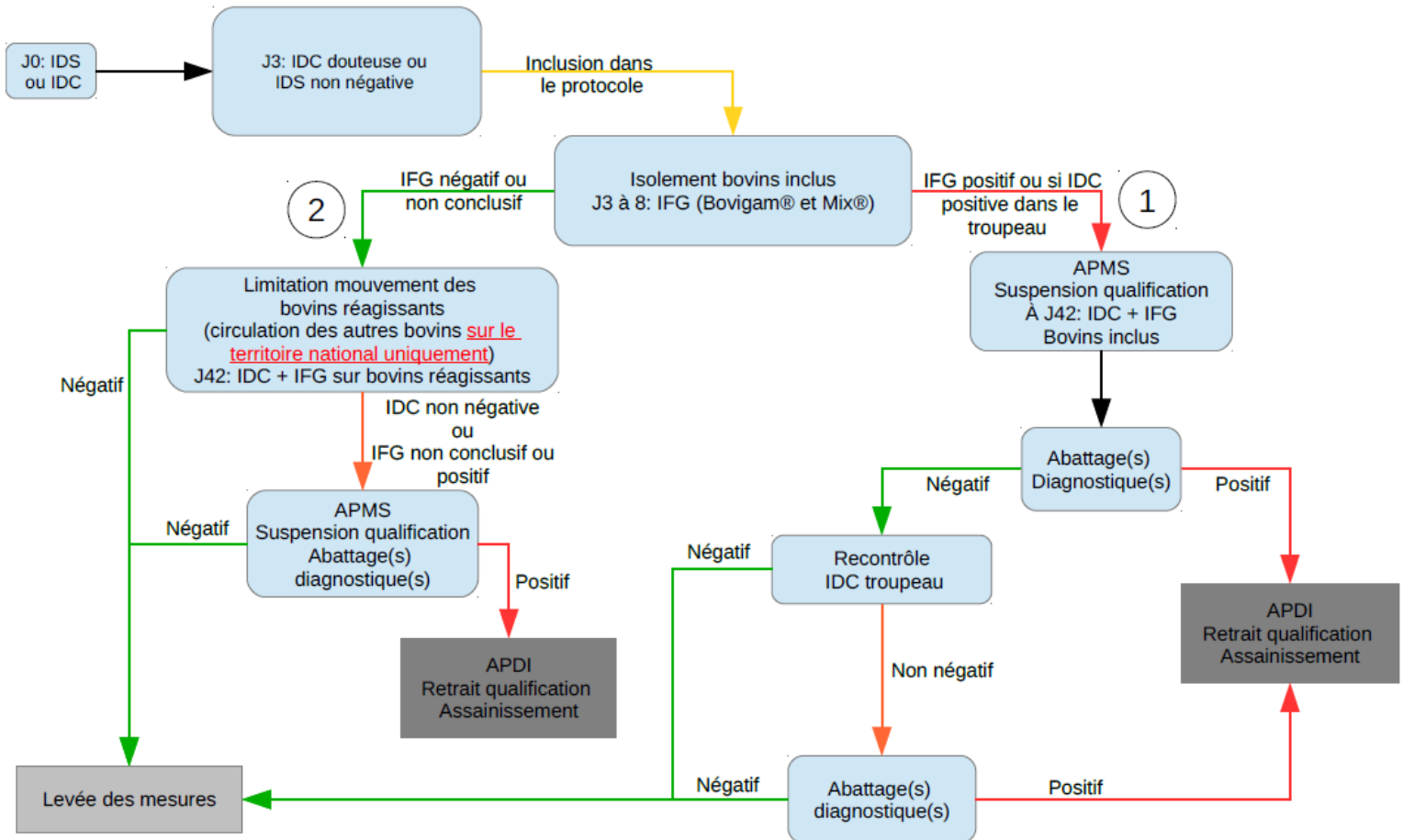
I- ESAT-6, CFP-10 et autres antigènes recombinants

Auteurs	Nom des Antigènes	Production des antigènes	Kit
(Jenkins <i>et al.</i> 2018)	Dix antigènes recombinants MTBC (R-Mag)	Dix protéines recombinantes (SSI, Denmark)	Bovigam™
(de Lisle, Green et Buddle 2017)	ESAT-6, CFP-10	Protéines recombinantes (SSI, Denmark)	Bovigam™
(Alvarez <i>et al.</i> 2017)	ESAT-6, CFP-10, Mb1762c, Mb2054c, Mb2057c, et Mb2660c	Protéines recombinantes pour ESAT-6 et CFP-10 Peptides pour les autres	Bovigam™
(Casal <i>et al.</i> 2012)	Protéines entières ESAT-6, CFP-10 et Rv3615c et cocktails peptidiques de ces 3 protéines	Protéines recombinantes Cocktails de peptides (peptides 16 acides aminés avec un overlap de 8 acides aminés sur un total de 32 peptides)	Bovigam™
(Aagaard <i>et al.</i> 2006)	ESAT-6, CFP-10, PE13, PE5, MPB70, TB10.4 et TB27.4	Protéines recombinantes (<i>E.coli</i>)	Bovigam™ (CSL)
(Je <i>et al.</i> 2014)	ESAT-6, CFP-10	Protéines recombinantes (<i>E.coli</i>)	« Home made »
(Aagaard <i>et al.</i> 2010)	ESAT-6, CFP-10	Protéines recombinantes (<i>E.coli</i>)	Bovigam™
(Faye <i>et al.</i> 2011)	ESAT-6, CFP-10	Protéines recombinantes (SSI, Denmark)	Bovigam™
(El-Naggar <i>et al.</i> 2015)	ESAT-6, CFP-10	Protéines recombinantes (LIONEX GmbH)	pas de dosage en ELISA
(Abdellrazeq <i>et al.</i> 2016)	ESAT-6, CFP-10	Protéines recombinantes (LIONEX GmbH)	Bovigam™
(Pollock <i>et al.</i> 2000)	ESAT-6 et MBP70	Protéines recombinantes (<i>E.coli</i>)	CSL australia
(Buddle <i>et al.</i> 2001)	ESAT-6	Protéines recombinantes (<i>E.coli</i>)	CSL australia
(Schiller <i>et al.</i> 2009)	ESAT-6, CFP-10	Protéines recombinantes (Fusion de ESAT-6 et CFP-10)	Bovigam™ (Prionics)
(Praud <i>et al.</i> 2015)	ESAT-6	Protéines recombinantes (SSI, Denmark)	Bovigam™

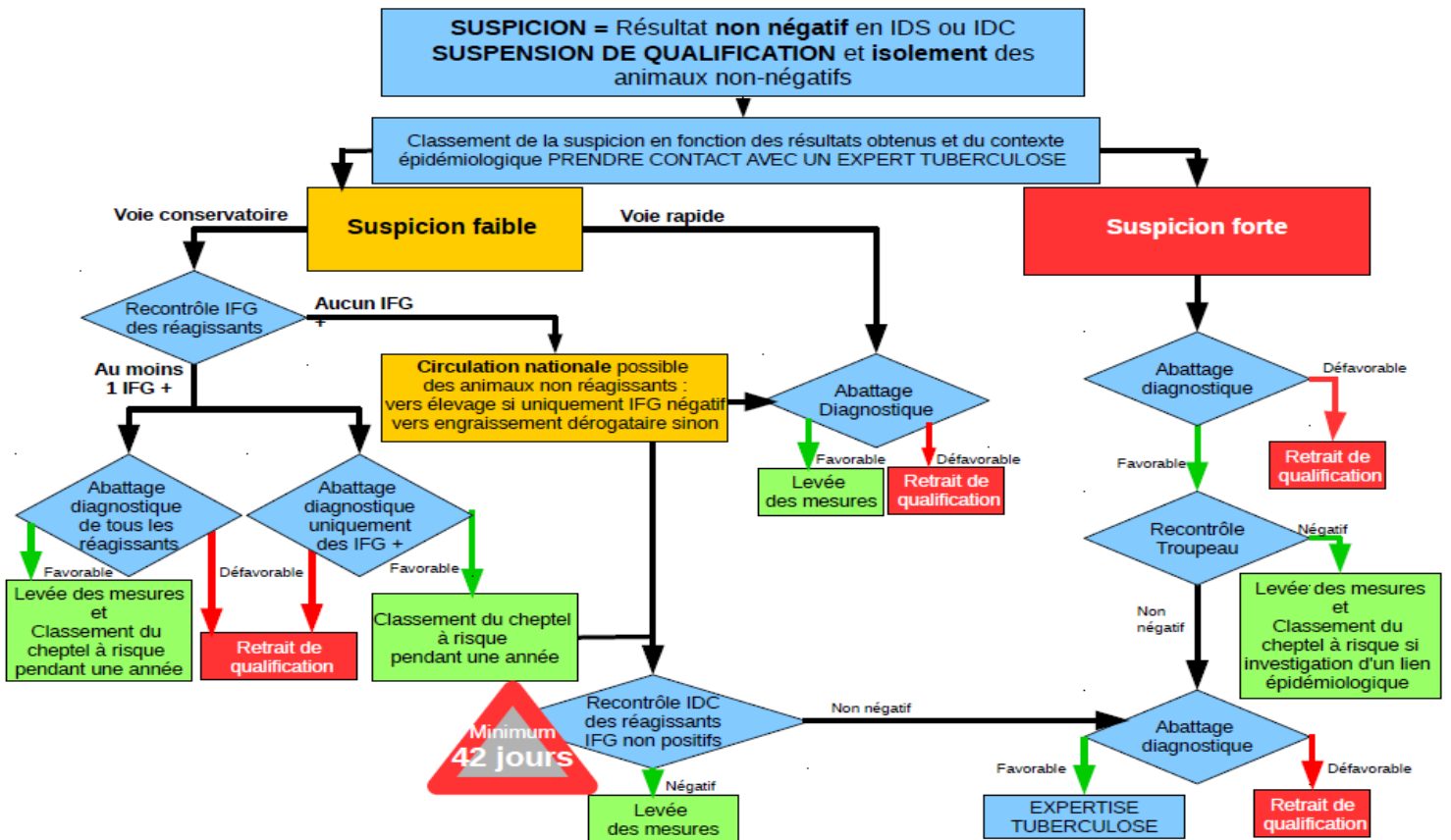
II- Cocktails de peptides

Auteur	Nom des Antigènes	Production des antigènes	Kit
(Bass <i>et al.</i> 2013)	ESAT-6, CFP-10	Deux cocktails de peptides 1) PC-EC = Mix de Vordermeier 2001 2) PC-HC=ESAT-6+CFP-10+RV3615 + trois autres antigènes de mycobactéries	Etude 1 Bovigam™ génération 1 Etude 2 Bovigam™ génération 2
(Vordermeier, Gordon et Hewinson 2011)	ESAT-6, CFP-10	Cocktail de peptides	Bovigam™ (CSL)
(Cockle <i>et al.</i> 2006)	Rv3873, Rv3879c, Rv0288, Rv3019c, ESAT-6 et CFP-10	Cocktail de peptides	Bovigam™ (Prionics)
(Sidders <i>et al.</i> 2008)	ESAT-6, CFP-10, et Rv3615c	Cocktail de peptides	Bovigam™ (Prionics)
(Jones <i>et al.</i> 2017)	ESAT-6, CFP-10 et Rv3615c	Mix peptidique (Pepceuticals) pas de détails	Evaluation IFN γ -DIVA
(Praud, Boireau et Dufour 2016)	Cocktails peptidique ESAT-6/CFP-10	Mix peptidique de prionics (EC)	Bovigam™

Annexe 4 : Grille de décision dans le cadre du protocole expérimental (DGAL/SDSPA/2014-864)



Annexe 5 : Grille de décision dans le cadre du protocole « national » (DGAL/SDSPA/2016-1001)



Annexe 6 : Utilisation d'une formule normalisée pour le dosage de l'IFN γ par le kit Bovigam™ (M.L. Boschioli, LNR Tuberculose, Anses)

1- Le test IFN γ standard

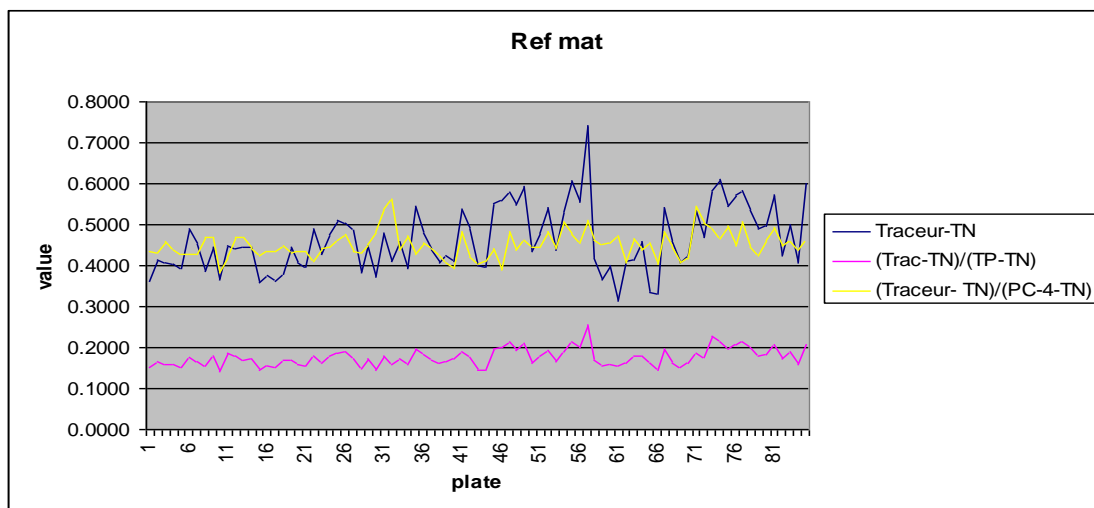
Depuis sa conception (Wood *et al.*, 2001), la formule d'interprétation du test de dosage d'IFN γ Bovigam™ couramment utilisé dans le monde, prenait en compte les DO brutes issues de la stimulation des LT du sang des bovins avec les PPD-B et PPD-A, et éventuellement ESAT-6/CFP-10, avec le PBS (servant à démontrer que les cellules ne produisent pas d'IFN γ à l'étape de stimulation). Les contrôles négatifs et positifs inclus dans le kit, des validateurs généralistes de l'ELISA, n'étaient pas pris en compte dans les formules d'interprétation.

Voici deux exemples des formules utilisées par deux laboratoires européens différents :

- $PPD-B \geq PBS + 0,05$; $PPD-B > PPD-A$
- $PPD-B-PBS > 0,1$; $PPD-B-PPD-A > 01$

2- Le test IFN γ en France

Par analogie avec les autres kits ELISA, un ratio utilisant le Témoin Positif (TP) moins le Témoin Négatif (TN) (TP-TN) au dénominateur a été utilisé lors de la mise en place du test en France (Faye, 2010), conformément à l'ancienne norme NF-U47-109 (désormais le guide technique d'accréditation LAB GTA 27). Cette étape permet d'obtenir des résultats plus reproductibles et comparables entre manipulations intra et inter laboratoire(s) en corrigeant les fluctuations des DO entre plaques liées aux facteurs extérieurs (température, variation de la durée d'incubation et d'agitation, équipement, manipulateur...). La Figure 11 montre la réduction du coefficient de variation (CV) interplaques obtenue avec la formule normalisée :



401	ref-NC	(Ref-NC)/(PC-NC)	(Ref-NC)/(PC4-NC)
mean	0.4645	0.1756	0.4526
ecartype	0.0801	0.0217	0.0358
CV	17.24	12.33	7.92

Figure 11 : Exemple de l'impact du ratio sur le CV (lot 401) sur un MRI-traceur suite à l'utilisation des formules normalisées par l'inclusion des ratios.

Le CV passe de 17,2 % (DO brute en bleu) à 12,3 % (ratio, en jaune). Ainsi, la formule adoptée en France et les critères d'interprétation pour le test IFN γ jusqu'en août 2012 ont été les suivants (Faye *et al.* 2011) : $(PPD-B - PPD-A) / (TP-TN) > 0,05$ et $(ESAT-6/CFP-10 - PBS) / (TP-TN) > 0,03$.

3- Autres adaptations introduites pour l'utilisation de la formule normalisée

Étant donné que les TP du kit sont très fortement concentrés en IFN γ , un inconvénient pour l'utilisation de la normalisation est d'avoir des DO hors de la zone de linéarité du test ELISA. Par ailleurs, étant donné que Prionics²⁶ n'avait pas conçu les témoins dans cette optique de normalisation de calcul mais comme des outils de validation, les kits présentent non seulement des valeurs de DO des TP élevées mais ces DO peuvent par ailleurs fluctuer fortement d'un lot de kit à l'autre, ce qui peut avoir un impact sur les résultats de certains échantillons (Figure 11). Afin de corriger ce défaut, **un TP produit par dilution du TP original a été mis en place**. Ceci afin de disposer d'un TP proche d'une DO de 1 donc se situant dans la zone de linéarité de l'ELISA. On observe dans la figure 1 que cette dilution (en rose) diminue encore plus le CV dans les formules normalisées, qui passe de 12,3 % à 7,9 %.

Enfin, étant donné que les concentrations du TP, bien que toujours très concentrées, sont variables entre lots de BovigamTM, il n'est pas possible d'utiliser pour tous les lots le même facteur de dilution du TP. En effet un TP plus faible dilué au même taux pourrait conduire à des résultats faux positifs.

Ainsi, un facteur de dilution du TP est calculé lot par lot. Celui-ci doit ramener non seulement le TP à une DO proche de 1 mais il doit également **permettre de disposer d'un matériel de référence interne (MRI du LNR) toujours à la même valeur qui correspond à trois fois la valeur du TP-TN du kit utilisé pendant les essais de mise au point de la formule d'interprétation. Ceci a pour objectif de pouvoir conserver les mêmes seuils et donc appliquer la même formule d'interprétation ci - dessous** (Desquesnes 1997, Wright *et al.* 1993) : $(PPD-B - PPD-A) / 3 (TP-TN) > 0,05$ et $(ESAT-6/CFP-10 - PBS) / 3 (TP-TN) > 0,03$,

Sachant que la valeur du TP est celle du TP dilué au taux indiqué dans la notice du lot utilisé. Cette stratégie permet de retrouver un résultat totalement compatible avec les données utilisées pour la validation des seuils du kit lors des enquêtes de sensibilité et de spécificité (Faye *et al.* 2011).

La dilution du TP à employer pour chaque kit figure sur le certificat qualité qui est délivré avec le kit (voir dossier d'harmonisation LNR).

²⁶ Racheté ultérieurement par Thermo Fisher



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

14 rue Pierre et Marie Curie
F94701 Maisons-Alfort cedex

www.anses.fr

[@Anses_fr](https://twitter.com/Anses_fr)