

**Un test IFN γ Bovigam[®] modifié
pour renforcer la lutte contre la Tuberculose bovine**

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

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

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

Matériel et Méthodes :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

II.1.1. Etape 1 : la stimulation cellulaire

II.1.1.1. Macro-méthode

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

II.1.1.2. Micro-méthode

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

II.2.3.1. Interprétation des résultats individuels

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

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

II.2.3.1.1. Mode de calcul “initial”

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

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

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

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

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

II.2.3.1.2. Mode de calcul “normalisé”

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

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

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

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

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

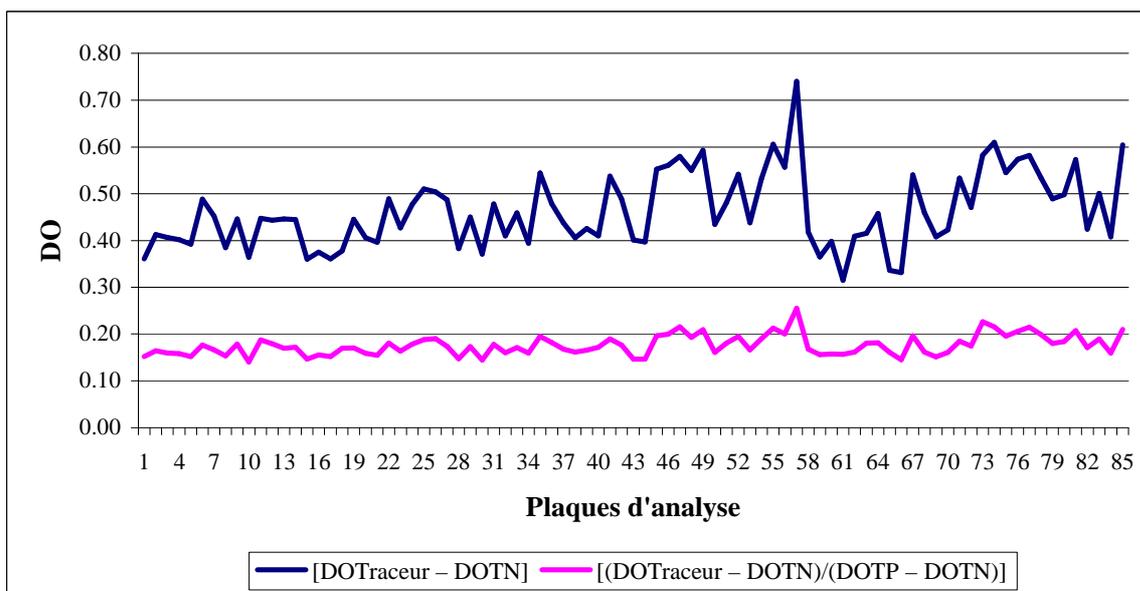


Figure II.1.2. Distributions des 85 valeurs de DO du traceur, transformées en suivant soit le mode de calcul initial soit le mode de calcul normalisé.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Réalisation d'une analyse IFN γ sur des cheptels à IDS non-négative

Pour la campagne prophylactique 2006-2007, la prise de sang pour l'analyse IFN γ était réalisée environ 10 jours après l'IDS. Depuis la campagne 2007-2008, elle est généralement effectuée le jour de la lecture de l'IDS (3 jours après l'injection de tuberculine bovine).

Les prises de sang se font sur tube hépariné (10 ml). Ensuite, les prélèvements sanguins homogénéisés sont placés dans une enveloppe auto-scillante et cachetée par le vétérinaire avec les documents d'accompagnement des prélèvements (DAP) renseignant notamment l'heure du prélèvement, les conditions de réalisation de l'IDS, l'identification de l'élevage et des bovins concernés. L'acheminement des prélèvements jusqu'au Laboratoire est à la charge de l'éleveur ou du laboratoire (préleveurs). Il doit être fait dans les 6 h qui suivent la prise de sang et entre 17 et 27 °C.

Ainsi, les analyses IFN γ sont réalisées en moyenne entre 6 et 8 h après la prise de sang.

Cela nécessite une bonne organisation entre les vétérinaires sanitaires, les éleveurs et le laboratoire : planification au préalable du nombre d'échantillons (prises de sang) et de leur arrivée au laboratoire afin que toutes les analyses puissent débuter suffisamment tôt (en début d'après-midi) pour que la phase d'incubation des échantillons (pour la stimulation cellulaire) se déroule pendant la nuit.

Devenir du cheptel selon le résultat du test IFN γ

Le Laboratoire transmet les résultats du test à la DDSV sous forme qualitative (négatif, positif ou divergent) en moyenne dans les 3 jours qui suivent la réception du prélèvement. La DDSV communique les résultats à l'éleveur et au vétérinaire concerné et indique la suite des démarches à suivre (Cf. Figures II.1.3 et II.1.4, arbres décisionnels).

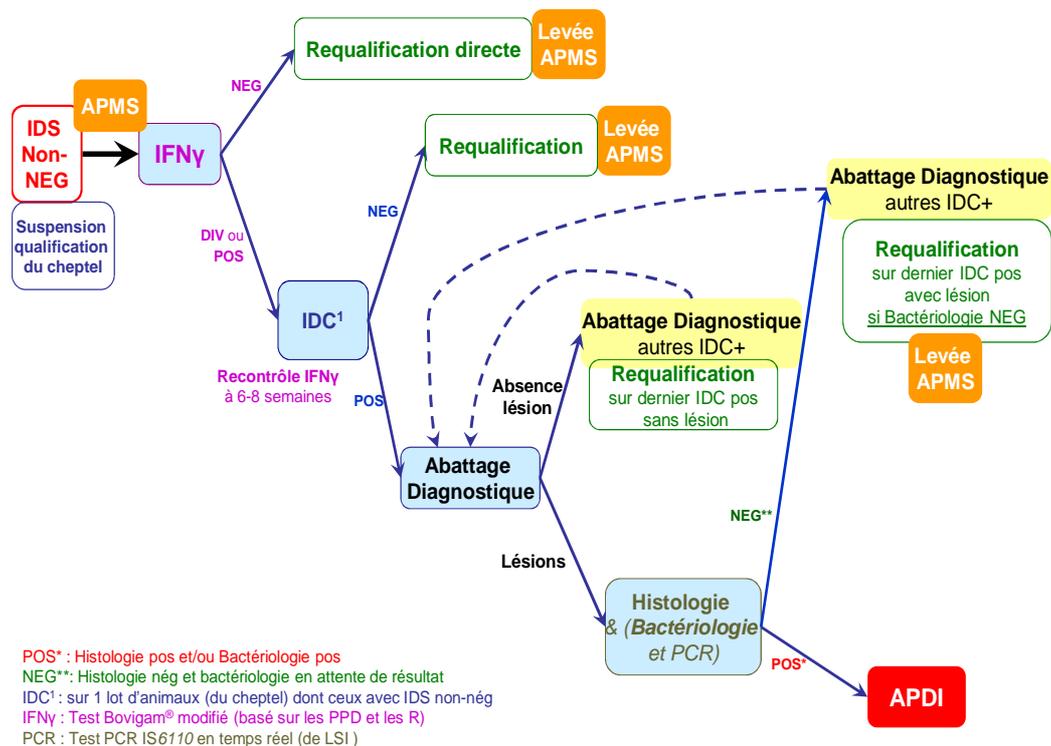


Figure II.1.3. Schéma décisionnel en cheptel à risque (susceptible), présentant une IDS non-négative selon le protocole expérimental utilisé en Dordogne (2007-2009).

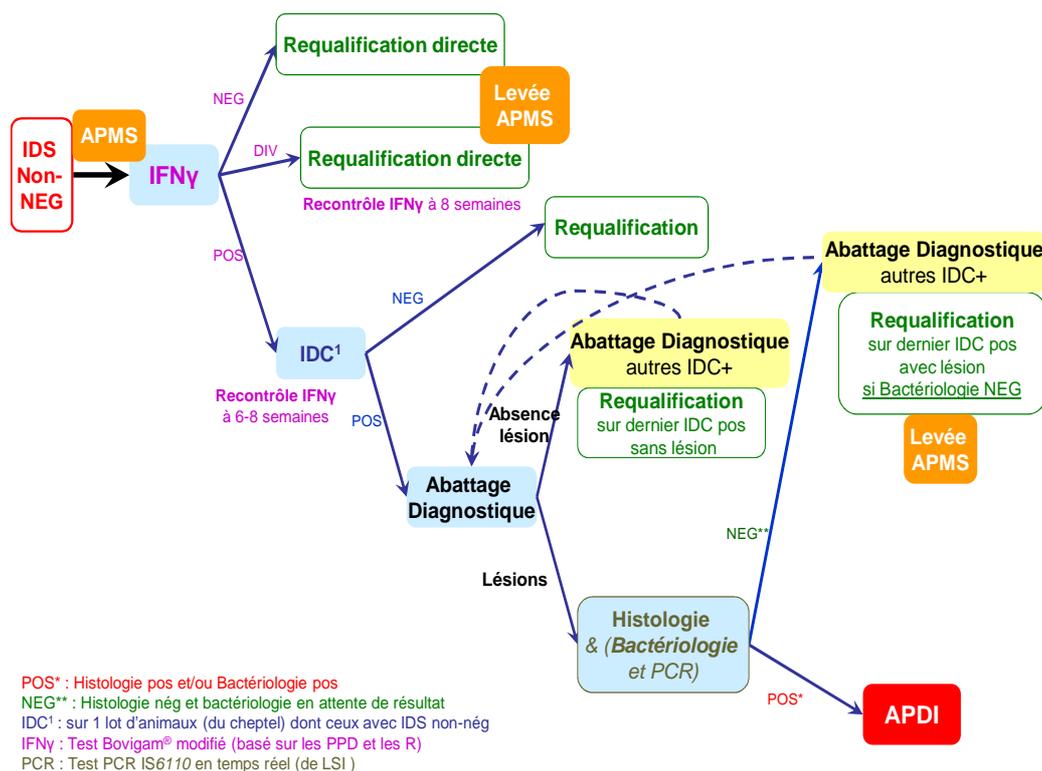


Figure II.1.4. Schéma décisionnel en cheptel n'ayant aucun risque connu et présentant une IDS non-négative (suspect) selon le protocole expérimental utilisé en Dordogne (2007-2009).

Le résultat du test IFN γ au niveau du cheptel et le statut suspect ou susceptible de l'élevage (Cf. Tableaux I.2.1 et I.2.2 (*statuts des animaux et cheptels définis par l'AM du 15/09/03 modifié**)) déterminent la requalification ou le maintien de la suspension, ainsi que les actions à mettre en place par la suite. Le Tableau II.1.4 présente les différentes actions menées sur le cheptel en fonction du résultat du test IFN γ .

III.2. Utilisation du test IFN γ en parallèle à l'IDS lors d'enquête épidémiologique

Lors d'enquêtes épidémiologiques, il est nécessaire de maximiser la sensibilité du dépistage. Or, le test IFN γ permet de détecter des bovins qui ne seraient pas détectés en IDS (Neill S.D. *et al.*, 1994 ; Pollock J.M. *et al.*, 2001 ; Vordermeier H.M. *et al.*, 2006ab ; De la Rua-Domenech R. *et al.*, 2006a).

Par conséquent, le test IFN γ modifié est utilisé en parallèle à l'IDS, lors d'enquêtes épidémiologiques, c'est-à-dire sur les animaux des cheptels susceptibles.

Tableau II.1.4. Les différentes actions menées sur le cheptel en fonction du résultat du test IFN γ modifié (au niveau cheptel).

RESULTAT du test IFNγ au niveau du cheptel	ACTIONS	
NEGATIF	« REQUALIFICATION » du cheptel (<u>suspect ou susceptible</u>) <i>Levée de la restriction de mouvement du cheptel</i>	- Pas de contrôle ultérieur requis
DIVERGENT	« REQUALIFICATION » du cheptel si <u>suspect</u> <i>Maintien de la restriction de mouvement uniquement pour les animaux avec un résultat divergent</i>	- Demande de recontrôle IFN γ des bovins IFN γ Div (après un délai 8 semaines) ⁽¹⁾
	SUSPENSION de la qualification du cheptel si <u>susceptible</u> (en lien épidémiologique avec un cheptel reconnu infecté) APMS	- Recontrôle IDC des bovins IDS Non-Nég et un lot ^(*) (après un délai 6 semaines) ⁽²⁾ - Recontrôle IFN γ le jour de l'IDC des bovins IFN γ Div.
POSITIF	SUSPENSION de la qualification du cheptel (<u>suspect ou susceptible</u>) APMS	- Recontrôle IDC des bovins IDS Non-Nég et un lot ^(*) (après un délai 6 semaines) ⁽²⁾ - Recontrôle IFN γ le jour de l'IDC des bovins IFN γ Pos et Div

Légende :

NEGATIF : tous les animaux testés du cheptel ont eu un résultat négatif au test IFN γ ;

DIVERGENT : au moins un animal du cheptel a eu un résultat divergent au test IFN γ mais aucun n'a eu un résultat positif ;

POSITIF : au moins un animal du cheptel a eu un résultat positif au test IFN γ ;

⁽¹⁾ : Si des bovins fournissent encore un résultat IFN γ divergent ou positif, la DDSV demande à l'éleveur d'abattre à des fins diagnostiques un des bovins concernés et procède de nouveau à un contrôle du cheptel ;

⁽²⁾ : le cheptel rejoint alors la procédure classique de dépistage, avec abattage diagnostique des bovins avec une IDC non-négative et l'enchaînement des autres actions (Cf. Figures II.1.3 et II.1.4). Lors de l'abattage diagnostique d'un bovin, des prélèvements sont systématiquement réalisés en vue d'une PCR, même sur les bovins sans lésion apparente ;

^(*) : Lot de bovins testés en IDC : 25 % du cheptel avec un minimum de 25 bovins ou la totalité si inférieur ;

IV. Les différentes études relatives à l'utilisation du test IFN γ modifié en Dordogne

L'objectif de ce travail était d'estimer les qualités du test IFN γ modifié, c'est-à-dire sa sensibilité conditionnelle à la confirmation *post mortem* de Tb (sensibilité relative), sa spécificité indépendamment des autres tests (spécificité absolue) et sa spécificité conditionnelle à une IDS non-négative (spécificité relative ou opérationnelle), selon les conditions de terrain de la Dordogne et en vue d'une validation de son utilisation.

La démarche adoptée a été la suivante :

Dans un premier temps, il s'agissait de comparer le mode de calcul "normalisé" par rapport au mode de calcul "initial" à partir des valeurs de sensibilité et de spécificité du test IFN γ modifié estimées avec les deux modes de calcul.

Dans un deuxième temps, c'est-à-dire après avoir déterminé un mode de calcul préférentiel, il fallait déterminer les valeurs de seuil décisionnel pour les PPD et les R pour lesquelles les valeurs de sensibilité et spécificité du test Bovigam[®] modifié, dans une région à faible prévalence, sont optimales, d'une part, dans la population générale et, d'autre part, dans la population d'IDS non-négatives.

Le but était ainsi d'optimiser l'utilité diagnostique du test IFN γ modifié dans cette région à faible prévalence en vue d'une classification optimale des cheptels et des animaux infectés et non infectés.

IV.1. Etudes de la spécificité absolue, de la spécificité et la sensibilité relatives du test IFN γ modifié : description des échantillons et processus de sélection

En l'absence de gold standard, la sensibilité du test IFN γ modifié a été étudiée rétrospectivement, dans des cheptels reconnus infectés de Tb c'est-à-dire où au moins un animal du cheptel a fourni un résultat positif en bactériologie (identification de *M. bovis*) et, conditionnellement à la confirmation *post mortem* de Tb, c'est à dire par la présence de lésions suspectes de Tb à l'abattoir sur les bovins, avec ou sans confirmation par au moins une des trois méthodes de diagnostic direct, l'histologie, la bactériologie et le test PCR MTBC (PCR IS6110 de LSI, France). Cette sensibilité relative à la confirmation *post mortem* de Tb du test IFN γ modifié a été notée Se_r (utilisation du terme « relative » par opposition à « absolue »).

La spécificité du test IFN γ modifié a été conduite dans des cheptels indemnes de Tb c'est-à-dire dans des cheptels où aucun animal n'avait fourni un résultat positif en bactériologie (pas de mise en évidence de *M. bovis*) depuis 2001, d'une zone indemne (où aucun animal positif à l'IDT et aucun foyer déclaré, depuis au moins 10 ans (condition utilisée par Aagaard C. *et al.*, 2006)). De plus, cette étude a été réalisée de manière absolue, c'est-à-dire indépendamment des autres tests pratiqués (processus de sélection des bovins sans tenir

compte des résultats des autres tests). Cette spécificité absolue du test IFN γ modifié, notée Sp est donc valide lorsque le test est utilisé en parallèle à l'IDS.

Toutefois, comme le test IFN γ modifié a été largement utilisé en routine comme méthode de confirmation des IDS non-négatives (utilisation en série dans les programmes de contrôles de la Tb dans tout le département depuis 2006), la spécificité opérationnelle du test, c'est-à-dire sa spécificité conditionnelle à une IDS non-négative a été étudiée rétrospectivement dans des cheptels indemnes de zones infectées ou pas. Cette spécificité opérationnelle du test IFN γ modifié a été également nommée spécificité relative à l'IDS non-négative (notée Sp_r) par opposition à sa spécificité absolue.

Concernant la méthode statistique utilisée, les différentes valeurs de sensibilité et de spécificité du test ont été estimées avec un intervalle de confiance à 95 %, utilisant la loi binomiale et à l'aide du logiciel de statistique R (version 2.9.2 du logiciel R (August 2009), R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche, <http://www.R-project.org>).

IV.1.1. Etude de la sensibilité relative à la confirmation *post mortem* de Tb (Se_r) du test IFN γ modifié

L'étude de la sensibilité relative à la confirmation *post mortem* de Tb (Se_r) du test IFN γ modifié a été menée *a posteriori*, à partir des résultats obtenus durant les campagnes de dépistage de la Tb, 2006-2007, 2007-2008 et 2008-2009 en Dordogne.

Cette Se_r du test a donc été réalisée rétrospectivement à partir de 73 bovins issus de 28 cheptels reconnus infectés (d'une zone infectée du département). Ces bovins présentaient tous des lésions évocatrices de Tb à l'abattoir, c'est pourquoi ils ont donc été classés comme positifs pour la Tb (classification déjà utilisée par Vordermeier H.M. *et al.*, 2001 et Gormley E. *et al.*, 2005 et Aagaard C. *et al.*, 2006). De plus, 40 parmi ces 73 animaux ont été analysés et confirmés infectés de Tb par des méthodes de diagnostic direct (Vordermeier H.M. *et al.*, 2001; Aagaard C. *et al.*, 2006) : 26 par la bactériologie et, l'histologie et/ou le test PCR MTBC (LSI, France) puis, 14 par l'histologie et/ou le test PCR MTBC (Tableau II.1.5). Les 33 animaux restants n'ont pas été analysés par les méthodes de diagnostic direct.

En outre, 71/73 bovins avaient été dépistés (non-négatifs) par IDS pratiquée à l'encolure. Ainsi, les prises de sang (PS) pour l'analyse IFN γ de ces 71 animaux avaient été réalisées entre 3 (59 PS pour les périodes 2007-2008 et 2008-2009) et 10 jours (12 PS pour la période

2006-2007) après l'injection de tuberculine bovine (IDS). Les deux animaux avec une IDS négative (et non testés en IDC) ont été analysés avec le test IFN γ lors du recontrôle (avec le test IFN γ) d'animaux IFN γ positifs du même cheptel. Toutefois, ces deux animaux ont été détectés positifs par la suite en histologie et PCR MTBC (et 1/2 en bactériologie).

Parmi ces 71 bovins non négatifs en IDS, 64 ont été également détectés non-négatifs en IDC alors que seulement 4 ont été trouvés négatifs en IDC. Les trois animaux restants n'ont pas subi d'IDC. Toutefois, ils ont été détectés positifs en histologie, PCR MTBC et bactériologie.

Par ailleurs, les 12 échantillons analysés en 2006-2007 ont été testés en IFN γ avec la macro-méthode (volumes recommandés par Bovigam[®] et utilisation d'ESAT6 et CFP10 individuellement). Les 61 échantillons analysés en 2007-2008 et 2008-2009 ont été testés avec la micro-méthode (volumes réduits pour l'analyse et utilisation d'ESAT6 et CFP10 en mélange).

Tableau II.1.5. Description des 73 bovins présentant des lésions suspectes de Tb à l'abattoir et issus de cheptels infectés et sélectionnés pour l'étude de la Se_r du test IFN γ modifiée selon la période de dépistage de la Tb, la méthode utilisée pour la stimulation cellulaire, le nombre (Nb) de bovins testés en IFN γ , le nombre de bovins analysés par 3 méthodes de diagnostic direct et ceux positifs (Pos) en bactériologie (identification *M. bovis*), en histologie (lésions évocatrices de Tb avec ou sans BAAR), en PCR MTBC.

Période dépistage de la Tb	Méthode stimulation cellulaire	Nb bovins testés en IFN γ	40 bovins testés en IFN γ et analysés par 3 méthodes de diagnostic direct			
			Nb d'analyses	Nb Bactériologie Pos	Nb Histologie Pos	Nb PCR MTBC Pos
2006-2007	macro-méthode	12	12	5	11	8
2007-2008	micro-méthode	14	14	8	14	10
2008-2009	micro-méthode	47	14	13	14	13
	<i>Total</i>	73	40	26	39	31

IV.1.2. Etude de la spécificité absolue (Sp) du test IFN γ modifié

L'étude de la spécificité absolue a été conduite en début d'année 2008 sur 500 bovins issus de 25 cheptels indemnes qui avaient été initialement sélectionnés (soit 20 bovins par cheptel). Ces 25 cheptels étaient considérés comme indemnes de Tb et cela est toujours le cas au moment de la rédaction de ce manuscrit, et ils provenaient d'une zone indemne de Tb (condition utilisée par Aagaard C. *et al.* (2006)) en Dordogne.

Une prise de sang a donc été réalisée le jour de l'IDS (pratiquée à l'encolure), sur ces 500 bovins en vue d'une analyse IFN γ modifiée avec la micro-méthode (Cf. § II.1.1.2.).

Or, 4 animaux (parmi les 500) provenant d'un des 25 cheptels sélectionnés n'ont pas pu être analysés en raison d'un volume de sang prélevé trop faible pour réaliser le test. Ainsi, seulement 496 animaux ont été testés. Par ailleurs, ils ont tous été retrouvés négatifs en IDS (résultats également retrouvés dans les études de Vordermeier H.M. *et al.* (2001) et Aagaard C. *et al.* (2006)).

IV.1.3. Etude de la spécificité relative à l'IDS non-négative (Sp_r) du test IFN γ modifié

L'étude de la spécificité relative à l'IDS non-négative (Sp_r) du test IFN γ modifié a été menée *a posteriori*, à partir des résultats obtenus durant les campagnes de dépistage de la Tb 2007-2008 et 2008-2009 en Dordogne (Faye S. *et al.*, sous presse).

Cette Sp_r ou spécificité opérationnelle du test a donc été réalisée rétrospectivement à partir de 578 bovins avec une IDS (pratiquée à l'encolure) non-négative issus de 176 cheptels indemnes qui par la suite ont été contrôlés annuellement et, au moment de la rédaction de ce chapitre, étaient encore tous considérés indemnes de Tb. Toutefois, contrairement à l'étude de spécificité absolue (mentionnée au § VI.1.2.), ces 176 cheptels provenaient d'une zone infectée de Tb en Dordogne, c'est-à-dire une zone où plusieurs cas de Tb avaient été détectés depuis ces dernières années.

Par ailleurs, chaque prise de sang pour l'analyse IFN γ avait été généralement réalisée 3 jours après l'injection de tuberculine bovine (IDS).

IV.2. Etude comparative entre les deux modes de calcul ("initial" et "normalisé") et entre deux seuils différents à partir des estimations des Se_r , Sp et Sp_r individuelles et finales du test IFN γ modifié : *description de la méthode employée*

Les Se_r , Sp et Sp_r individuelles (des R et des PPD) et finales du test IFN γ modifié ont été estimées à partir des résultats individuels calculés selon deux méthodes, d'une part le mode de calcul "initial" et d'autre part le mode de calcul "normalisé". De plus, deux critères d'interprétation (seuils de positivité) des résultats individuels (des PPD et des R) des échantillons ont été étudiés pour chacun des modes de calcul utilisés.

IV.2.1. Modes de calcul et critères d'interprétation des résultats individuels (des PPD et R) des échantillons de chacune des études

Tableau II.1.6. Formules de calcul des résultats individuels des échantillons analysés avec les PPD et avec les R selon les modes de calcul “initial” et “normalisé” et critères de positivité selon le type de seuil choisi.

Mode de calcul		Calcul des résultats individuels (formules)	Seuil de positivité	
			<i>haut</i>	<i>bas</i>
“initial”	PPD	$DO_{PPDB} - DO_{PPDA}$	> 0,10	> 0,04
	R	$DO_R - DO_N$	> 0,10	> 0,04
“normalisé”	PPD	$DO_{PPDB} - DO_{PPDA} / DO_{TP} - DO_{TN}$	> 0,04	> 0,02
	R	$DO_R - DO_N / DO_{TP} - DO_{TN}$	> 0,04	> 0,02

IV.2.1.1. Mode de calcul “initial” et seuils décisionnels étudiés

Pour chacune des trois études (Se_r , Sp et Sp_r) du test IFN γ modifié, les formules “initiales” utilisées pour calculer les résultats individuels du test IFN γ de chaque échantillon ont été les suivantes : $DO_{PPDB} - DO_{PPDA}$ pour les PPD et $DO_R - DO_N$ pour les R (Tableau II.1.6).

Deux valeurs de seuil de positivité pour interpréter les résultats individuels obtenus avec ces deux formules “initiales” ont été employées afin de définir le seuil décisionnel optimal, c'est-à-dire permettant d'obtenir les meilleures valeurs de sensibilité et spécificité du test IFN γ modifié.

D'une part, nous avons utilisé un seuil de positivité à 0,10 unité de DO (*désigné comme le seuil « haut »*), recommandé par Bovigam[®], utilisé notamment par Ryan T.J. *et al.* (2000) et approuvé en Nouvelle-Zélande lorsque le test est utilisé pour reconstrôler les animaux ayant réagi à l'IDS (pratiquée au pli sous-caudal) (Buddle B.M. *et al.*, 2001), (Tableau II.1.6).

D'autre part, nous avons employé un seuil de positivité à 0,04 unité de DO (*désigné comme le seuil « bas »*) étudié par Buddle B.M. *et al.* (2001) (Tableau II.1.6). En effet, ce seuil bas est couramment adopté pour une utilisation du test en parallèle avec les tests tuberculiques pour les cheptels à risque (Buddle B.M. *et al.*, 2001), puisque le fait d'abaisser le seuil permet de d'augmenter la sensibilité.

Ce seuil est même (de surcroît) plus intéressant pour les R qui sont plus spécifiques que les PPD et donc à priori moins sensibles (Buddle B.M. *et al.*, 2001).

IV.2.1.2. Mode de calcul “normalisé” et seuils décisionnels étudiés

Pour chacune des trois études (Se_r , Sp et Sp_r) du test IFN γ modifié, les formules “normalisées” utilisées pour calculer les résultats individuels du test IFN γ de chaque échantillon ont été les suivantes : $(DO_{PPDB}-DO_{PPDA})/(DO_{TP}-DO_{TN})$ pour les PPD et $(DO_R-DO_N)/(DO_{TP}-DO_{TN})$ pour les R (Tableau II.1.6).

Deux valeurs de seuil de positivité correspondant à celles utilisées pour le mode de calcul “initial” ont été également employées.

Le seuil de positivité de 0,10 du mode de calcul “initial” (seuil haut) a été adapté au mode de calcul “normalisé” (Cf. § II.2.3.1.2.). La valeur du seuil haut, comme nous l’avons déjà démontrée dans l’introduction de ce chapitre, a donc été redéfinie à 0,04 unité de DO pour le mode de calcul “normalisé” (Tableau II.1.6).

Concernant le seuil de positivité de 0,04 du mode de calcul “initial” (seuil bas), il a également été adapté au mode de calcul “normalisé”, c’est-à-dire à la formule incluant la médiane de $DO_{TP}-DO_{TN}$ à 2,4 : $(DO_{PPDB}-DO_{PPDA})/(DO_{TP}-DO_{TN})= 0,04/2,4= 0,02$ (Faye S. *et al.*, 2008). Ainsi, en utilisant le même procédé que celui employé pour redéfinir le seuil haut, la valeur du seuil bas a donc été redéfinie à 0,02 unité de DO pour le mode de calcul “normalisé” (Tableau II.1.6).

IV.2.2. Interprétation du résultat final à partir des résultats individuels

Pour chacune des trois études (Se_r , Sp et Sp_r) du test IFN γ modifié, le résultat final du test IFN γ modifié pour chaque échantillon a été interprété en fonction des résultats individuels obtenus pour les PPD et les R.

Ainsi, le résultat final de chaque échantillon testé a été interprété positif si les résultats individuels (PPD et R) étaient positifs, ou négatif si les résultats individuels étaient négatifs ou bien interprété divergent dans le cas de résultats individuels discordants (positif et négatif), (Tableau II.1.3).

IV.2.3. Définitions des Se_r , Sp et Sp_r individuelles et finales du test IFN γ modifié

IV.2.3.1. Calcul des Se_r , Sp et Sp_r individuelles (R et PPD) du test IFN γ

Concernant les Se_r individuelles des PPD (Se_r PPD) et des R (Se_r R), il s'agit respectivement du pourcentage de résultats positifs en PPD et du pourcentage de résultats positifs en R, dans l'étude de la sensibilité relative à la confirmation *post mortem* de Tb (Se_r) du test IFN γ modifié.

De même, concernant les Sp individuelles des PPD (Sp PPD) et des R (Sp R), il s'agit respectivement du pourcentage de résultats négatifs en PPD et du pourcentage de résultats négatifs en R, dans l'étude de la spécificité absolue (Sp) du test IFN γ modifié.

Enfin, concernant les Sp_r individuelles des PPD (Sp_r PPD) et des R (Sp_r R), il s'agit respectivement du pourcentage de résultats négatifs en PPD et du pourcentage de résultats négatifs en R, dans l'étude de la spécificité relative à l'IDS non-négative (Sp_r) du test IFN γ modifié.

IV.2.3.2. Calcul des Se_r , Sp et Sp_r finales du test IFN γ

La sensibilité et la spécificité finales du test IFN γ modifié peuvent être estimées selon deux méthodes c'est-à-dire en considérant les résultats finaux positifs et divergents (PPDUR) ou bien uniquement les résultats finaux positifs ($PPD \cap R$) (Tableau II.1.3) (Vordermeier H.M. et Ewer K., 2006a ; Coad M. *et al.*, 2008).

Il existe donc deux méthodes d'interprétation (PPDUR ou $PPD \cap R$) permettant de calculer les Se_r , Sp et Sp_r finales du test IFN γ modifié.

Avec la méthode d'interprétation PPDUR, la Se_r finale (Se_r PPDUR) du test correspond au pourcentage de résultats finaux positifs et divergents, dans notre étude de sensibilité relative (Se_r) du test IFN γ modifié et, la Sp finale (Sp PPDUR) et la Sp_r finale (Sp_r PPDUR) du test correspondent au pourcentage de résultats finaux négatifs seulement, dans nos études respectives de spécificité absolue (Sp) et de spécificité relative (Sp_r) du test IFN γ modifié.

Au contraire, avec la méthode d'interprétation $PPD \cap R$, la Se_r finale (Se_r $PPD \cap R$) du test correspond au pourcentage de résultats finaux positifs seulement, dans notre étude de sensibilité relative (Se_r) du test IFN γ modifié et, la Sp finale (Sp $PPD \cap R$) et la Sp_r finale

(Sp_r PPD \cap R) du test correspondent au pourcentage de résultats finaux négatifs et divergents, dans nos études respectives de spécificité absolue (Sp) et de spécificité relative (Sp_r) du test IFN γ modifié.

IV.3. Evaluation des valeurs de sensibilité & spécificité individuelles optimales permettant de déterminer des seuils décisionnels normalisés et ainsi d'estimer la sensibilité et la spécificité finales du test IFN γ avec les deux méthodes d'interprétation, selon les différentes conditions d'utilisation du test en Dordogne

Les combinaisons des résultats de sensibilités et spécificités individuelles des différentes études pour différentes valeurs de seuils décisionnels normalisés (seuils relatifs aux formules "normalisées" de calcul des résultats des PPD et des R) avaient pour objectif de déterminer des valeurs-seuils permettant d'obtenir des valeurs optimales de sensibilités et spécificités individuelles, selon deux conditions différentes d'application du test IFN γ modifié (dans la population générale (dépistage en parallèle avec l'IDS) ou pour confirmer les animaux non-négatifs en IDS (diagnostic)) dans cette région à une faible prévalence de Tb.

Différentes valeurs-seuils pour les PPD et les R ont donc été testées afin de déterminer leurs effets sur les valeurs de sensibilités relatives individuelles et de spécificités absolues et opérationnelles individuelles du test (également réalisé par Lauzi S. *et al.* (2000) pour étudier la spécificité des PPD).

Or, l'utilisation de courbe ROC (*receiver-operating characteristic*) recommandée par l'OIE (OIE, 2008b), permet de représenter graphiquement sur un plan orthonormé, les différents couples de sensibilité et spécificité calculés pour chaque valeur-seuil possible (Biteau-Coroller F. *et al.*, 2003). Cet outil graphique permet de représenter la capacité d'un test à discriminer entre les populations d'animaux infectés et indemnes (Perneger T. et Perrier A., 2004).

Le graphique a pour abscisse le taux de faux-positifs (dans une population indemne) soit le complément de la spécificité (« 1-spécificité ») et en ordonnée le taux de vrai-positifs (dans une population infectée) soit la sensibilité.

La valeur-seuil optimale, c'est-à-dire donnant le meilleur couple de sensibilité et spécificité est le point de la courbe ROC le plus près du coin supérieur gauche (point de coordonnées

($x=0$; $y=1$) ou autrement dit le plus éloigné de la diagonale représentant le test d'apport nul [c'est-à-dire ne produisant aucune discrimination entre les individus des deux populations (infectée et indemne)] (Delacour H., Servonnet A. et Roche C., 2009).

Ainsi, quatre courbes ROC ont donc été nécessaires pour sélectionner graphiquement les valeurs-seuils des PPD et des R selon les deux conditions d'application du test IFN γ modifié (courbes également utilisées par Ryan T.J. *et al.* (2000), Cockle P.J. *et al.* (2006), Schiller I. *et al.* (2009)).

Par conséquent, afin de déterminer les valeurs-seuils optimales des PPD et des R lorsque le test est employé dans la population générale, nous avons tracé d'une part, la courbe ROC des PPD représentant la sensibilité relative des PPD (Se_r PPD) en fonction du complément de la spécificité absolue des PPD (« $1-Sp$ PPD »), obtenue pour différentes valeurs-seuils (de 0,00 à 1,25) et d'autre part, la courbe ROC des R représentant la sensibilité relative des R (Se_r R) en fonction du complément de la spécificité absolue des R (« $1-Sp$ R »), obtenue pour différentes valeurs-seuils (de 0,00 à 1,70).

De même, afin de déterminer les valeurs-seuils optimales des PPD et des R lorsque le test est employé dans la population d'animaux non-négatifs en IDS, nous avons tracé d'une part, la courbe ROC des PPD représentant la Se_r PPD en fonction du complément de la spécificité opérationnelle des PPD (« $1-Sp_r$ PPD »), obtenue pour différentes valeurs-seuils (de 0,00 à 1,25) et d'autre part, la courbe ROC des R représentant la Se_r R en fonction du complément de la spécificité opérationnelle des R (« $1-Sp_r$ R »), obtenue pour différentes valeurs-seuils (de 0,00 à 1,70).

Subséquentement, il était alors possible pour chacune des conditions d'utilisation, d'estimer les valeurs de sensibilité et spécificité finales du test à partir des résultats de sensibilités et spécificités individuelles optimales obtenus et selon deux méthodes d'interprétation des résultats finaux ($PPD \cap R$ et $PPD \cup R$).

Résultats et Interprétations :

I. Résultats des études de sensibilité et spécificité (Se_r , Sp et Sp_r) du test IFN γ modifié, pour les comparaisons des deux modes de calcul et des deux types de seuils utilisés

I.1. Résultats de l'étude de la sensibilité relative à la confirmation *post mortem* de Tb (Se_r) du test IFN γ modifié

I.1.1. Contrôle de la qualité des 73 échantillons sélectionnés

Les valeurs des témoins négatif (PBS) et positif (PWM) de l'ensemble des échantillons répondent aux critères qualité ($DO_{N<} < 0,3$ et $DO_{PWM-DO_{N>}} > 0,4$).

La qualité des 73 échantillons sélectionnés pour cette étude est donc validée.

I.1.2. Estimation des Se_r individuelles et finales du test IFN γ à partir de différents critères d'interprétation des résultats (*2 modes de calcul et 2 types de seuil décisionnel*)

13/73 animaux sélectionnés pour l'étude ont obtenu des résultats individuels invalides en PPD alors que leurs résultats en R sont valides – *de surcroît, ces 13 échantillons ont tous un résultat positif en R* –. En effet, ces 13 échantillons présentent des valeurs de DO de PPDA (DO_{PPDA}) élevées en même temps que celles de PPDB (DO_{PPDB}) et supérieures à 2,5 unités de DO, avec un rapport DO_{PPDB}/DO_{PPDA} compris entre 0,850 et 1,150. Or, au-delà de 2,5 unités de DO, le graphique représentant la valeur de DO en fonction de la concentration en IFN γ n'est plus linéaire en raison d'un phénomène de saturation de l'absorbance (résultats présentés en Annexe XI).

Par conséquent, seuls les 60 animaux restants (issus de 20 cheptels) ont été conservés pour notre étude. Ainsi, 9 et 51 animaux ont été analysés respectivement par la macro-méthode (en 2006-2007) et par la micro-méthode (9 en 2007-2008 et 42 en 2008-2009), (Cf. Annexe XI).

I.1.2.1. Estimation des Se_r individuelles (Se_r PPD et Se_r R) du test IFN γ

Si l'on compare les deux modes de calcul aux seuils hauts (0,10 du mode de calcul "initial" et 0,04 du mode de calcul "normalisé"), les Se_r R sont identiques (80 % [68-89]) alors que la Se_r PPD obtenue avec le mode de calcul "initial" (85 % [73-93]) est supérieure à celle

obtenue avec le mode de calcul “normalisé” (83 % [72-92]) (Tableau II.1.7) bien que les écarts ne soient pas statistiquement significatifs.

En effet, 59/60 échantillons présentent des résultats en PPD identiques pour les deux modes de calcul. Ainsi, 50 échantillons sont considérés positifs en PPD pour une interprétation des résultats calculés à partir de formule “normalisée” contre 51 avec la formule “initiale”. Toutefois, l’examen des valeurs de DO obtenues à l’issue des calculs “initial” et “normalisé” pour cet échantillon aux résultats discordants pour les PPD montre que l’échantillon est positif proche de la limite de détection pour une utilisation de la formule “initiale” ($DO_{PPDB} - DO_{PPDA} = 0,105$ soit 0,11) et, négatif proche de la limite de détection pour un emploi de la formule “normalisée” ($(DO_{PPDB} - DO_{PPDA}) / (DO_{TP} - DO_{TN}) = 0,038$ soit 0,04).

De plus, le test du Chi 2 de Mac Némar permet de confirmer que cette différence de Se_r PPD n’est pas significative entre les deux modes de calcul.

A l’inverse, si l’on compare les deux modes de calcul aux seuils bas (0,04 du mode de calcul “initial” et 0,02 du mode de calcul “normalisé”), les Se_r PPD sont identiques (93 % [84-98]) alors que la Se_r R obtenue avec le mode de calcul “initial” (93 % [84-98]) est supérieure à celle obtenue avec le mode de calcul “normalisé” (88 % [76-95]) (Tableau II.1.7).

En effet, 57/60 échantillons présentent des résultats en R identiques pour les deux modes de calcul. Ainsi, 53 échantillons sont considérés positifs en R pour une interprétation des résultats calculés à partir de formule “normalisée” contre 56 avec la formule “initiale”. Toutefois, l’examen des valeurs de DO obtenues à l’issue des calculs “initial” et “normalisé” pour ces trois échantillons aux résultats discordants pour les R (1,2,3) montre qu’ils sont positifs proches de la limite de détection pour une utilisation de la formule “initiale” ($DO_R - DO_N = 0,041$ (1) ; 0,047 (2); 0,052 (3)) et négatifs proches de la limite de détection pour un emploi de la formule “normalisée” ($(DO_R - DO_N) / (DO_{TP} - DO_{TN}) = 0,016$ (1); 0,017 (2); 0,019 (3)).

De plus, le test du Chi 2 de Mac Némar permet de confirmer que cette différence de Se_r R n’est pas significative entre les deux modes de calcul.

Par conséquent, cette étude de sensibilité relative ne nous a pas permis de mettre en évidence de différence significative de Se_r individuelles entre les deux types de calcul.

Tableau II.1.7. Sensibilités individuelles relatives à la confirmation *post mortem* de Tb (Se_r) du test IFN γ modifié selon le mode de calcul et le seuil choisis (n=60).

		Mode de calcul			
		“initial”		“normalisé”	
		Seuil haut : <i>0,10</i>	Seuil bas : <i>0,04</i>	Seuil haut : <i>0,04</i>	Seuil bas : <i>0,02</i>
Se_r individuelles % [IC 95 %] (Nb)	Se_r PPD	85 % [73-93] (51)	93 % [84-98] (56)	83 % [72-92] (50)	93 % [84-98] (56)
	Se_r R	80 % [68-89] (48)	93 % [84-98] (56)	80 % [68-89] (48)	88 % [76-95] (53)

Nb : Nombre de résultats positifs.

Par ailleurs, concernant les différents seuils, les résultats individuels obtenus (Tableau II.1.7) montrent que la Se_r PPD est supérieure ou égale à la Se_r R.

Enfin, pour les deux modes de calcul, les Se_r individuelles sont logiquement meilleures si l'on abaisse le seuil (avec la formule “initiale” : augmentation de 13 % pour la Se_r R (significative) et 8 % pour la Se_r PPD ; avec la formule “normalisée” : augmentation de 8 % pour la Se_r R et 10 % pour la Se_r PPD (significative)) (Tableau II.1.7).

I.1.2.2. Estimation de la Se_r finale (Se_r PPD \cap R ou Se_r PPD \cup R) du test IFN γ

Si on compare les Se_r PPD \cap R pour les deux modes de calcul utilisés, celles-ci sont identiques aux seuils hauts (73 %) tandis qu'aux seuils bas, la Se_r PPD \cap R est supérieure pour le mode de calcul “initial” (90 %) par rapport à l'autre mode de calcul (85 %) toutefois, cette différence n'est pas significative (Tableau II.1.8).

A l'inverse, si on compare les Se_r PPD \cup R pour les deux modes de calcul employés, celles-ci sont identiques et optimales aux seuils bas (97 %) tandis qu'aux seuils hauts, la Se_r PPD \cup R du mode de calcul “initial” (92 %) est supérieure à celle de l'autre mode de calcul (90 %) toutefois, cette différence n'est pas significative (Tableau II.1.8).

Par conséquent, cette étude de sensibilité relative montre qu'il n'existe pas de différence significative de Se_r finales entre les deux types de calcul.

Tableau II.1.8. Etude de la sensibilité relative à la confirmation *post mortem* de Tb (Se_r) du test IFN γ modifié : Résultats finaux issus de l'association des résultats des PPD et des R selon le mode de calcul et le seuil choisis et estimation de la Se_r finale du test selon la méthode d'interprétation des résultats finaux choisie (n=60).

Mode de calcul	Seuil	Résultats finaux (Nb)			Se _r finale du test % [IC 95 %] (nombre d'animaux positifs)	
		POS	DIV	NEG	Se _r PPD \cap R	Se _r PPDUR
"initial"	haut : 0,10	44	11	5	73 % [60-84] (44)	92 % [82-97] (55)
	bas : 0,04	54	4	2	90 % [82-98] (54)	97 % [89-100] (58)
"normalisé"	haut : 0,04	44	10	6	73 % [60-84] (44)	90 % [82-98] (54)
	bas : 0,02	51	7	2	85 % [73-93] (51)	97 % [89-100] (58)

Se_r PPD \cap R : POS % ;

Se_r PPDUR : (POS + DIV) %.

Par ailleurs, pour les deux modes de calcul, les Se_r finales sont logiquement meilleures si l'on abaisse les seuils (avec le mode de calcul "initial" : augmentation de 17 % de la Se_r PPD \cap R (significative) et 5 % de la Se_r PPDUR ; avec le mode de calcul "normalisé" : augmentation de 12 % de la Se_r PPD \cap R et 7 % de la Se_r PPDUR) (Tableau II.1.8).

Enfin, les différentes Se_r PPDUR obtenues sont supérieures aux Se_r PPD \cap R (par exemple, au seuil haut la Se_r PPDUR est (significativement) supérieure à la Se_r PPD \cap R de 19 % avec le mode de calcul "initial" et de 17 % avec celui "normalisé") (Tableau II.1.8).

I.2. Résultats de l'étude de spécificité absolue (Sp) du test IFN γ modifié

I.2.1. Contrôle de la qualité des 496 échantillons analysés

496 animaux ont été analysés avec le test IFN γ afin d'évaluer sa spécificité absolue (Sp). Toutefois, 3/496 échantillons provenant de trois animaux issus de trois cheptels différents (de 20 animaux) ont été considérés comme inhibés car « DO_{PWM}-DO_N » est inférieur ou égal à 0,4 unité de DO (alors que leurs témoins négatifs respectifs sont valides (DO_N <0,3)) c'est-à-dire le résultat de chaque échantillon stimulé avec du PWM (témoin positif) est invalide

(inhibition) (Cf. Annexe X (Figure A)). Par conséquent, les résultats de ces trois échantillons ne peuvent être interprétés.

De plus, le témoin négatif (PBS) d'un autre échantillon provenant d'un animal issu d'un autre cheptel (de 20 animaux) a également été considéré comme invalide car la DO_N est supérieure ou égale à 0,3 unité de DO (Cf. Annexe X (Figure B)). Par conséquent, le résultat de cet échantillon ne peut être interprété.

Ainsi, en raison de résultats des témoins non validés lors de l'analyse IFN γ , le nombre total d'animaux retenus pour l'étude de Sp a été réduit à 492 animaux issus de 25 cheptels (20 cheptels de 20 animaux, 1 cheptel de 16 animaux, 4 cheptels de 19 animaux).

I.2.2. Estimation des Sp individuelles et finales du test IFN γ à partir de différents critères d'interprétation des résultats (*2 modes de calcul et 2 types de seuil décisionnel*)

I.2.2.1. Estimation des Sp individuelles (Sp PPD et Sp R) du test IFN γ

Si l'on compare les deux modes de calcul aux seuils hauts (0,10 du mode de calcul "initial" et 0,04 du mode de calcul "normalisé"), les Sp R et Sp PPD sont identiques (99,4 % [98,2-99,9]) (Tableau II.1.9).

A l'inverse, si l'on compare les deux modes de calcul aux seuils bas (0,04 du mode de calcul "initial" et 0,02 du mode de calcul "normalisé"), les Sp PPD sont identiques (98,0 % [96,3-99,0]) alors que la Sp R obtenue avec le mode de calcul "normalisé" (98,6 % [97,1-99,4]) est supérieure à celle obtenue avec le mode de calcul "initial" (98,2 % [96,6-99,2]) (Tableau II.1.9).

En effet, 490/492 échantillons présentent des résultats en R identiques pour les deux modes de calcul. Ainsi, 483 échantillons sont considérés négatifs en R pour une interprétation des résultats calculés avec la formule "initiale" contre 485 avec la formule "normalisée". Toutefois, l'examen des valeurs de DO obtenues à l'issue des calculs "initial" et "normalisé" pour ces deux échantillons aux résultats discordants pour les R montre qu'ils sont négatifs proches de la limite de détection pour une utilisation de la formule "normalisée" (valeurs : 0,018 pour les deux) et positifs proches de la limite de détection pour un emploi de la formule "initiale" (valeurs : 0,044 ; 0,047).

De plus, le test du Chi 2 de Mac Némar permet de confirmer que cette différence de Sp R n'est pas significative entre les deux modes de calcul.

Par conséquent, cette étude de spécificité absolue montre qu'il n'existe pas de différence significative de Sp individuelles entre les deux types de calcul.

Tableau II.1.9. Spécificités absolues (Sp) individuelles du test IFN γ modifié selon le mode de calcul et le seuil choisis (n=492).

		Mode de calcul			
		"initial"		"normalisé"	
		Seuil haut : <i>0,10</i>	Seuil bas : <i>0,04</i>	Seuil haut : <i>0,04</i>	Seuil bas : <i>0,02</i>
Sp individuelles % [IC 95 %] (Nb)	Sp PPD	99,4 % [98,2-99,9] (489)	98,0 % [96,3-99,0] (482)	99,4 % [98,2-99,9] (489)	98,0 % [96,3-99,0] (482)
	Sp R	99,4 % [98,2-99,9] (489)	98,2 % [96,6-99,2] (483)	99,4 % [98,2-99,9] (489)	98,6 % [97,1-99,4] (485)

Nb : Nombre de résultats négatifs

Par ailleurs, concernant les différents seuils, les résultats individuels obtenus montrent que la Sp R est supérieure ou égale à la Sp PPD (Tableau II.1.9).

Enfin, pour les deux modes de calcul, les Sp individuelles sont logiquement plus élevées aux seuils hauts (avec la formule "initiale" : +1,2 % pour la Sp R et +1,4 % pour la Sp PPD ; avec la formule "normalisée" : +0,8 % pour la Sp R et 1,4 % pour la Sp PPD) (Tableau II.1.9).

I.2.2.2. Estimation de la Sp finale (Sp PPD \cap R ou Sp PPDUR) du test IFN γ

Si l'on compare les Sp PPD \cap R pour les deux modes de calcul utilisés, les Sp PPD \cap R sont identiques et optimales quel que soit le seuil (100 %) (Tableau II.1.10).

Néanmoins, si l'on compare les Sp PPDUR pour les deux modes de calcul employés, les Sp PPDUR sont identiques et optimales aux seuils hauts (98,8 %) tandis qu'aux seuils bas, la Sp PPDUR du mode de calcul "normalisé" (96,5 %) est supérieure à celle de l'autre mode de calcul (96,1 %) (Tableau II.1.10) ; toutefois, cette différence n'est pas significative.

Par conséquent, cette étude de spécificité absolue montre qu'il n'existe pas de différence significative de Sp finales entre les deux types de calcul.

Tableau II.1.10. Etude de la spécificité absolue (Sp) du test IFN γ modifié : Résultats finaux issus de l'association des résultats des PPD et des R selon le mode de calcul et le seuil choisis et estimation de la Sp finale du test selon la méthode d'interprétation des résultats finaux choisie (n=492).

		Résultats finaux (Nb)			Sp finale du test % [IC 95 %] (nombre d'animaux négatifs)	
Mode de calcul	Seuil	POS	DIV	NEG	Sp PPD \cap R	Sp PPDUR
"initial"	haut : 0,10	0	6	486	100 % [99,2-100] (492)	98,8 % [97,4-99,6] (486)
	bas : 0,04	0	19	473	100 % [99,2-100] (492)	96,1 % [94-97,6] (473)
"normalisé"	haut : 0,04	0	6	486	100 % [99,2-100] (492)	98,8 % [97,4-99,6] (486)
	bas : 0,02	0	17	475	100 % [99,2-100] (492)	96,5 % [94,5-98] (475)

$$Sp\ PPD\cap R : 1 - (POS\ \%) = (NEG + DIV)\ \%$$

$$Sp\ PPDUR : 1 - [(POS + DIV)\ \%] = NEG\ \%$$

Par ailleurs, pour les deux modes de calcul, les Sp PPDUR sont meilleures aux seuils hauts (+2,7 % et +2,3 % avec les modes de calcul "initial" et "normalisé" respectivement) (Tableau II.1.10).

Enfin, les Sp PPD \cap R obtenues sont supérieures aux Sp PPDUR (par exemple au seuil bas, la Se_r PPDUR est supérieure à la Sp PPD \cap R de 3,9 % (significatif) avec le mode de calcul "initial" et de 3,5 % avec celui "normalisé") (Tableau II.1.10).

I.3. Résultats de l'étude de spécificité opérationnelle ou relative à l'IDS non-négative (Sp_r) du test IFN γ modifié

I.3.1. Contrôle de la qualité des 578 échantillons sélectionnés

Les valeurs des témoins négatif (PBS) et positif (PWM) de l'ensemble des échantillons répondent aux critères qualité ($DO_N < 0,3$ et $DO_{PWM} - DO_N > 0,4$). La qualité des 578 échantillons sélectionnés pour cette étude est donc validée.

I.3.2. Estimation des Sp_r individuelles et finales du test IFN γ à partir de différents critères d'interprétation des résultats (*2 modes de calcul et 2 types de seuil décisionnel*)

Comme cela s'est produit dans l'étude de sensibilité relative (Se_r) du test, 31/578 animaux sélectionnés pour l'étude de spécificité opérationnelle (Sp_r) ont obtenu des résultats individuels invalides en PPD alors que leurs résultats en R sont valides. En effet, les absorbances obtenues pour ces 31 échantillons stimulés avec PPDA et PPDB sont saturées (résultats présentés en Annexe XI).

Par conséquent, seuls les 547 animaux restants (issus de 172 cheptels) ont été conservés pour notre étude.

I.3.2.1. Estimation des Sp_r individuelles (Sp_r PPD et Sp_r R) du test IFN γ

Si l'on compare les deux modes de calcul aux seuils hauts (0,10 du mode de calcul "initial" et 0,04 du mode de calcul "normalisé"), les Sp_r R et Sp_r PPD semblent meilleures avec le mode de calcul "normalisé" (Sp_r R de 93,1 % et Sp_r PPD de 73,3 %) par rapport au mode de calcul "initial" (Sp_r R de 92,7 % et Sp_r PPD de 72,9 %) (Tableau II.1.11).

En effet, 543/547 échantillons présentent des résultats en PPD identiques pour les deux modes de calcul. Ainsi, 399 échantillons sont considérés négatifs en PPD pour une interprétation des résultats calculés à partir de formule "initiale" contre 401 avec la formule "normalisée".

Toutefois, l'examen des valeurs de DO obtenues à l'issue des calculs "initial" et "normalisé" pour ces quatre échantillons aux résultats discordants pour les PPD (1,2,3,4) montre que les échantillons 1, 2 et 3 sont négatifs proches de la limite de détection pour une utilisation de la formule "normalisée" (valeurs : 0,036 (1) ; 0,039 (2); 0,039 (3)) mais positifs proches de la limite de détection pour un emploi de la formule "initiale" (valeurs : 0,101 (1) ; 0,106 (2); 0,107 (3)) alors que l'échantillon 4 est positif proche de la limite de détection pour un emploi de la formule "normalisée" (0,043) mais négatif proche de la limite de détection pour un emploi de la formule "initiale" (0,088).

Par ailleurs, le test du Chi 2 de Mac Némar permet de confirmer que cette différence de Sp_r PPD n'est pas significative entre les deux modes de calcul.

De même, 537/547 échantillons présentent des résultats en R identiques pour les deux modes de calcul. Ainsi, 507 échantillons sont considérés négatifs en R pour une interprétation des résultats calculés à partir de formule “initiale” contre 509 avec la formule “normalisée”.

Toutefois, l’examen des valeurs de DO obtenues à l’issue des calculs “initial” et “normalisé” pour ces dix échantillons aux résultats discordants pour les R montre que six échantillons sont négatifs proches de la limite de détection pour une utilisation de la formule “normalisée” (valeurs comprises entre 0,036 et 0,039) mais positifs proches de la limite de détection pour un emploi de la formule “initiale” (valeurs comprises entre 0,101 et 0,113) alors que les 4 autres échantillons sont positifs proches de la limite de détection pour un emploi de la formule “normalisée” (valeurs comprises entre 0,042 et 0,046) mais négatifs proches de la limite de détection pour un emploi de la formule “initiale”(valeurs comprises entre 0,089 et 0,100).

De plus, le test du Chi 2 de Mac Némar permet de confirmer que cette différence de Sp_r R n’est pas significative entre les deux modes de calcul.

A l’inverse, si l’on compare les deux modes de calcul aux seuils bas (0,04 du mode de calcul “initial” et 0,02 du mode de calcul “normalisé”), les Sp_r R et Sp_r PPD semblent également meilleures avec le mode de calcul “normalisé” (Sp_r R de 84,8 % et Sp_r PPD de 66,5 %) par rapport au mode de calcul “initial” (Sp_r R de 77,7 % et Sp_r PPD de 64,9 %) (Tableau II.1.11).

En effet, 538/547 échantillons présentent des résultats en PPD identiques pour les deux modes de calcul. Ainsi, 355 échantillons sont considérés négatifs en PPD pour une interprétation des résultats calculés à partir de formule “initiale” contre 364 avec la formule “normalisée”.

Toutefois, l’examen des valeurs de DO obtenues à l’issue des calculs “initial” et “normalisé” pour ces neuf échantillons aux résultats discordants pour les R montre qu’ils sont négatifs proches de la limite de détection pour une utilisation de la formule “normalisée” (valeurs comprises entre 0,015 et 0,020) mais positifs proches de la limite de détection pour un emploi de la formule “initiale” (valeurs comprises entre 0,041 et 0,054).

Cependant, le test du Chi 2 de Mac Némar permet de confirmer que cette différence de Sp_r PPD n’est pas significative entre les deux modes de calcul.

De même, 506/547 échantillons présentent des résultats en R identiques pour les deux modes de calcul. Ainsi, 425 échantillons sont considérés négatifs en PPD pour une interprétation des résultats calculés à partir de formule “initiale” contre 464 avec la formule “normalisée”.

Toutefois, l’examen des valeurs de DO obtenues à l’issue des calculs “initial” et “normalisé” pour les 41 échantillons aux résultats discordants pour les R montre que 40 échantillons sont négatifs proches de la limite de détection pour une utilisation de la formule “normalisée” (valeurs comprises entre 0,014 et 0,020) mais positifs proches de la limite de détection pour un emploi de la formule “initiale” (valeurs comprises entre 0,041 et 0,055) alors qu’un seul échantillon est positif proche de la limite de détection pour une utilisation de la formule “normalisée” (0,021) mais négatif proche de la limite de détection pour un emploi de la formule “initiale” (0,038).

Cependant, le test du Chi 2 de Mac Némar permet de confirmer que cette différence de Sp_r R n’est pas significative entre les deux modes de calcul.

Par conséquent, cette étude de spécificité opérationnelle montre qu’il n’existe pas de différence significative de Sp_r individuelles entre les deux types de calcul, bien que ces écarts de Sp_r individuelles soient plus grands pour les seuils bas.

Tableau I.1.11. Spécificités opérationnelles (Sp_r) individuelles du test IFN γ modifié selon le mode de calcul et le seuil choisis (n=547).

		Mode de calcul			
		“initial”		“normalisé”	
		Seuil haut : <i>0,10</i>	Seuil bas : <i>0,04</i>	Seuil haut : <i>0,04</i>	Seuil bas : <i>0,02</i>
Sp_r individuelles % [IC 95 %] (Nb)	Sp_r PPD	72,9 % [69-76,6] (399)	64,9 % [60,7-68,9] (355)	73,3 % [69,4-77,0] (401)	66,5 % [62,4-70,5] (364)
	Sp_r R	92,7 % [90,2-94,7] (507)	77,7 % [74-81,1] (425)	93,1 % [90,6-95,0] (509)	84,8 % [81,5-87,7] (464)

Nb : Nombre de résultats négatifs.

Par ailleurs, concernant les différents seuils étudiés des deux modes de calcul, les résultats individuels obtenus (Tableau II.1.11) montrent que la Sp_r R est largement supérieure à la Sp_r PPD (écart non-significatif seulement pour le seuil bas du mode de calcul initial).

Enfin, pour les deux modes de calcul, les Sp_r individuelles sont largement supérieures aux seuils hauts (avec la formule “initiale” : +15 % pour la Sp_r R et +8 % pour la Sp_r PPD ; avec la formule “normalisée” : +8,3 % pour la Sp_r R et +6,8 % pour la Sp_r PPD) (Tableau II.1.11).

I.3.2.2. Estimation de la Sp_r finale (Sp_r PPD \cap R ou Sp_r PPDUR) du test IFN γ

Si l'on compare les Sp_r PPD \cap R pour les deux modes de calcul utilisés, celles-ci sont identiques aux seuils hauts (95,4 %) alors qu'aux seuils bas, la Sp_r PPD \cap R du mode de calcul "normalisé" (91,2 %) est significativement supérieure (de 2,9 %) à celle de l'autre mode de calcul (88,3 %) (Tableau II.1.12).

De même, si l'on compare les Sp_r PPDUR pour les deux modes de calcul employés, celles-ci sont comparables aux seuils hauts (70,2 % et 70,9 % pour les modes de calcul initial et normalisé respectivement) tandis qu'aux seuils bas, la Sp PPDUR du mode de calcul "normalisé" (60,1 %) est supérieure (de 5,8 %) à celle de l'autre mode de calcul (54,3 %) (Tableau II.1.12).

Par conséquent, cette étude de spécificité opérationnelle montre qu'il n'existe pas de différence significative de Sp_r finales entre les deux types de calcul, bien que ces écarts de Sp_r finales soient plus grands pour les seuils bas.

Tableau II.1.12. Etude de la spécificité opérationnelle (Sp_r) du test IFN γ modifié
Résultats finaux issus de l'association des résultats des PPD et des R selon le mode de calcul et le seuil choisis et estimation de la Sp_r finale du test selon la méthode d'interprétation des résultats finaux choisie (n=547).

Mode de calcul	Seuil	Résultats finaux (Nb)			Sp _r finale du test % [IC 95 %] (nombre d'animaux négatifs)	
		POS	DIV	NEG	Sp _r PPD \cap R	Sp _r PPDUR
"initial"	haut : 0,10	25	138	384	95,4 % [93,3-97,0] (522)	70,2 % [66,2-74] (384)
	bas : 0,04	64	186	297	88,3 % [85,3-90,9] (483)	54,3 % [50-58,5] (297)
"normalisé"	haut : 0,04	25	134	388	95,4 % [93,3-97,0] (522)	70,9 % [66,9-74,7] (388)
	bas : 0,02	48	170	329	91,2 % [88,5-93,5] (499)	60,1 % [55,9-64,3] (329)

Sp_r PPD \cap R : $1 - (POS \%) = (NEG + DIV) \%$

Sp_r PPDUR : $1 - [(POS + DIV) \%) = NEG \%$

Par ailleurs, pour les deux modes de calcul, les Sp_r PPDUR sont logiquement largement supérieures aux seuils hauts (+15,9 % et +10,8 % avec les modes de calcul "initial" et "normalisé" respectivement) (Tableau II.1.12).

De plus, les Sp_r PPD \cap R obtenues sont significativement meilleures que les Sp_r PPDUR (par exemple au seuil haut, la Se_r PPDUR est supérieure à la Sp PPD \cap R de 25,2 % avec le mode de calcul “initial” et de 24,5 % avec celui “normalisé”) (Tableau II.1.12).

II. Combinaisons des résultats individuels des différentes études pour déterminer les seuils décisionnels, relatifs au mode de calcul “normalisé”, selon les différentes conditions d’utilisation du test en Dordogne et en déduire les valeurs de sensibilité et spécificité finales de ce test

II.1. Evaluation des Se_r (sensibilités relatives) et Sp (spécificités absolues) individuelles optimales et, estimation des Se_r et Sp finales du test pour des valeurs de seuil donnant des Se_r et Sp individuelles optimales

II.1.1. Détermination des seuils permettant des Se_r et Sp individuelles optimales

La détermination des valeurs de seuil décisionnel concernant les PPD et les R, pour lesquelles les sensibilités relatives (Se_r) et les spécificités absolues (Sp) individuelles (des PPD et des R) du test sont optimales, s’effectue par combinaison des résultats des Se_r et Sp individuelles obtenus pour différentes valeurs de seuils, dans les études de Se_r (60 échantillons) et de Sp (492 échantillons) du test IFN γ respectivement (Tableau II.1.13).

Tableau II.1.13. Résultats des Sensibilités relatives (Se_r) (n=60) et Spécificités absolues (Sp) (n=492) individuelles du test IFN γ pour différentes valeurs de seuils décisionnels (de 0,01 à 0,08) des formules “normalisées” de calcul des résultats des PPD et des R (Faye S. *et al.*, sous presse).

		Valeurs des seuils							
		0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08
PPD %	Se_r	93 % 84-98 (56)	93 % 84-98 (56)	87 % 75-94 (52)	83 % 72-92 (50)	83 % 72-92 (50)	75 % 62-85 (45)	75 % 62-85 (45)	75 % 62-85 (45)
	Sp	97,6 % 95,8-98,7 (480)	98,0 % 96,3-99,0 (482)	99,2 % 97,9-99,8 (488)	99,4 % 98,2-99,9 (489)				
R %	Se_r	97 % 89-100 (58)	88 % 76-95 (53)	87 % 75-94 (52)	80 % 68-89 (48)	72 % 59-83 (43)	68 % 55-80 (41)	67 % 53-78 (40)	62 % 48-74 (37)
	Sp	95,9 % 93,8-97,5 (472)	98,6 % 97,1-99,4 (485)	99,4 % 98,2-99,9 (489)	99,4 % 98,2-99,9 (489)	99,6 % 98,5-99,9 (490)	99,6 % 98,5-99,9 (490)	99,8 % 98,9-100 (491)	99,8 % 98,9-100 (491)

Nb : Nombre de résultats positifs dans l’étude de la Se_r du test ou de résultats négatifs dans l’étude de la Sp du test.

II.1.1.1. Résultats combinés des Se_r PPD & Sp PPD

Le Tableau II.1.13 présente les valeurs de Se_r PPD et de Sp PPD, obtenues en utilisant la formule “normalisée” pour calculer les résultats des PPD $[(DO_{PPDB}-DO_{PPDA})/(DO_{TP}-DO_{TN})]$ et huit valeurs différentes de seuil de positivité des résultats (de 0,01 à 0,08), dans les études de Se_r et de Sp du test IFN γ respectivement.

Ces résultats montrent que les PPD sont très spécifiques et assez sensibles (au seuil de 0,04, Se_r PPD de 83 % [IC 95 %, 72-92] et Sp PPD de 99,4 % [IC 95 %, 98,2-99,9]).

Une courbe ROC des PPD a été tracée à partir des valeurs de Se_r PPD et Sp PPD obtenues pour différentes valeurs de seuil (Figure II.1.5). Des valeurs optimales en Se_r PPD (93 % [84-98]) et Sp PPD (98,0 % [96,3-99,0]) ont été obtenues lorsque la valeur du seuil de positivité des résultats des PPD (calculés à partir de la formule de calcul “normalisée”), est de 0,02 (Figure II.1.5 et Tableau II.1.13).

N.B. : ce seuil décisionnel de 0,02 déterminé pour la formule “normalisée” de calcul des résultats des PPD (pour une utilisation du test IFN γ en parallèle à l’IDS) correspond à un seuil décisionnel de 0,04 pour la formule “initiale” de calcul des résultats des PPD ($DO_{PPDB}-DO_{PPDA}$).

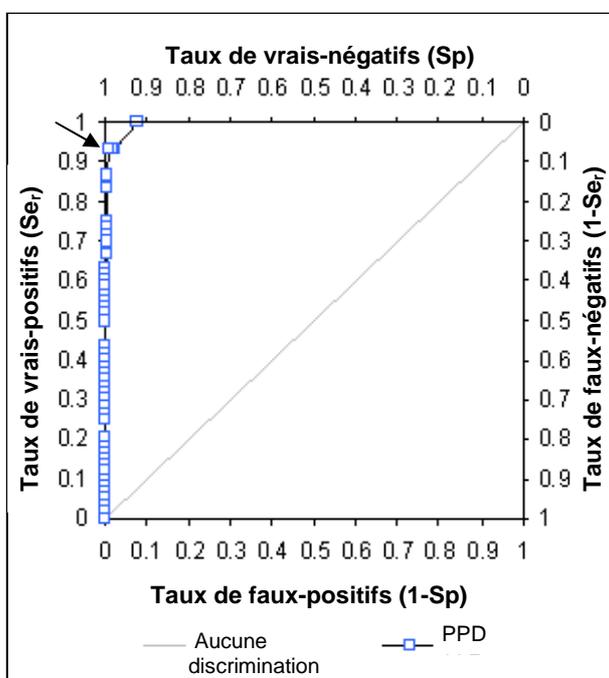


Figure II.1.5. Courbe ROC représentant la Se_r PPD (« taux de vrai-positifs » en PPD, dans l’étude de la Se_r) en fonction de « 1-Sp PPD » (« taux de faux-positifs », dans l’étude de la Sp), obtenue pour différentes valeurs-seuils (de 0,00 à 1,25) (Faye S. *et al.*, sous presse).

La flèche indique le seuil de positivité de 0,02 permettant d’obtenir une sensibilité relative et une spécificité absolue des PPD optimales.

II.1.1.2. Résultats combinés des Se_r R & Sp R

Les valeurs de Se_r R et de Sp R, obtenues en utilisant la formule “normalisée” pour calculer les résultats des R $[(DO_R - DO_N) / (DO_{TP} - DO_{TN})]$ et huit valeurs différentes de seuil de positivité des résultats (de 0,01 à 0,08), dans les études de Se_r et de Sp du test IFN γ respectivement sont indiquées au tableau II.1.13.

Ces résultats montrent que les R sont très spécifiques et assez sensibles (au seuil de 0,04, Se_r PPD de 80 % [IC 95 %, 68-89] et Sp PPD de 99,4% [IC 95 %, 98,2-99,9]), comme cela a déjà été décrit dans la littérature.

Une courbe ROC des R a été tracée à partir des valeurs de Se_r R et Sp R obtenues (Figure II.1.6). Des valeurs optimales en Se_r R (97 % [89-100]) et Sp R (95,9 % [93,8-97,5]) ont été obtenues lorsque la valeur du seuil de positivité des résultats des R (calculés à partir de la formule de calcul “normalisée”), est de 0,01 (Figure II.1.6 et Tableau II.1.13).

N.B. : ce seuil décisionnel de 0,01 déterminé pour la formule “normalisée” de calcul des résultats des R (pour une utilisation du test IFN γ en parallèle à l’IDS) correspond à un seuil décisionnel de 0,02 (0,01 x 2,4) pour la formule “initiale” de calcul des résultats des R ($DO_R - DO_N$).

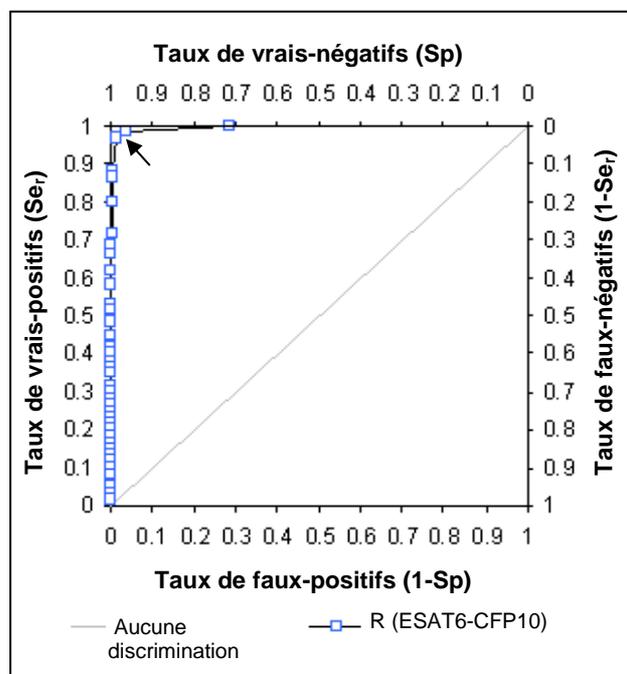


Figure II.1.6. Courbe ROC représentant la Se_r R (« taux de vrai-positifs » en R dans l’étude de la Se_r) en fonction de « 1-Sp R » (« taux de faux-positifs » dans l’étude de la Sp),

obtenue pour différentes valeurs-seuils (de 0,00 à 1,70) (Faye S. *et al.*, sous presse).

La flèche indique le seuil de positivité de 0,01 permettant d’obtenir une sensibilité relative et une spécificité absolue des R optimales.

II.1.2. Estimation des Se_r et Sp finales du test IFN γ aux seuils décisionnels déterminés pour des Se_r et Sp individuelles optimales

Les résultats finaux des études de Se_r et Sp du test IFN γ , obtenus à partir de l'association des résultats des PPD et R (résultats individuels de chaque étude respective, cf. Tableau II.1.13) déterminés pour des valeurs de seuil de positivité de 0,02 et de 0,01 respectivement sont exposés au tableau II.1.14.

De même, des estimations des Se_r et Sp finales du test IFN γ en suivant deux méthodes d'interprétation des résultats finaux ($PPD \cap R$ et $PPDUR$) sont présentées dans ce tableau.

Tableau II.1.14. Résultats finaux de l'étude de la sensibilité relative (Se_r) (n=60) et de l'étude de la spécificité absolue (Sp) (n=492) du test IFN γ , issus de l'association des résultats des PPD et des R obtenus pour des seuils de positivité de 0,02 et 0,01 respectivement ; Estimation de la Se_r et de la Sp finales à partir de deux méthodes d'interprétation des résultats finaux (Faye S. *et al.*, sous presse).

Nombre de	Résultats finaux	
	Etude de la Sp	Etude de la Se_r
POS	0	54
DIV	30	6
NEG	462	0
Méthode d'interprétation	Sp finale % [IC 95 %] (nombre d'animaux négatifs)	Se_r finale % [IC 95 %] (nombre d'animaux positifs)
PPD \cap R	100 % [99,2-100] (492)	90 % [82-98] (54)
PPDUR	93,9 % [91,4-95,8] (462)	100 % [95-100] (60)

$Sp_{PPD \cap R} : 1 - (POS \%) = (NEG + DIV) \%$; $Sp_{PPDUR} : 1 - [(POS + DIV) \%) = NEG \%$;

$Se_r_{PPD \cap R} : POS \%$; $Se_r_{PPDUR} : (POS + DIV) \%$

La Se_r $PPD \cap R$ et la Se_r $PPDUR$ obtenues du test IFN γ (*dont l'analyse des résultats est basée sur des formules "normalisées" avec des seuils de 0,02 pour les PPD et de 0,01 pour les R) ont donc été estimées respectivement à 90 % [82-98] et 100 % [95-100] (Tableau II.1.14).

De même, la Sp $PPD \cap R$ et la Sp $PPDUR$ obtenues du test IFN γ * ont donc été estimées respectivement à 100 % [99,2-100] et 93,9 % [91,4-95,8] (Tableau II.1.14).

II.2. Evaluation des Se_r (sensibilités relatives) & Sp_r (spécificités opérationnelles) individuelles optimales et, estimation des Se_r & Sp_r finales du test pour des valeurs de seuils donnant des Se_r & Sp_r individuelles optimales

II.2.1. Détermination des seuils permettant des Se_r & Sp_r individuelles optimales

La détermination des valeurs des seuils décisionnels concernant les PPD et les R, pour lesquelles les sensibilités relatives (Se_r) et les spécificités opérationnelles (Sp_r) individuelles (des PPD et des R) du test sont optimales, s'effectue par combinaison des résultats des Se_r et Sp_r individuelles obtenus pour différentes valeurs de seuils, dans les études de Se_r (60 échantillons) et de Sp_r (547 échantillons) du test IFN γ respectivement (Tableau II.1.15).

Tableau II.1.15. Résultats des Sensibilités relatives (Se_r) (n=60) et Spécificités opérationnelles (Sp_r) (n=547) individuelles du test IFN γ pour différentes valeurs de seuils décisionnels (de 0,01 à 0,08) des formules “normalisées” de calcul des résultats des PPD et des R (Faye S. *et al.*, sous presse).

		Valeurs des seuils							
		0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08
PPD %	Se_r	93 % 84-98 (56)	93 % 84-98 (56)	87 % 75-94 (52)	83 % 72-92 (50)	83 % 72-92 (50)	75 % 62-85 (45)	75 % 62-85 (45)	75 % 62-85 (45)
	Sp_r	61,1 % 56,8-65,2 (334)	66,5 % 62,4-70,5 (364)	70,4 % 66,4-74,2 (385)	73,3 % 69,4-77,0 (401)	75,5 % 71,7-79,0 (413)	77,1 % 73,4-80,6 (422)	79,5 % 75,9-82,8 (435)	80,8 % 77,2-84,0 (442)
R %	Se_r	97 % 89-100 (58)	88 % 76-95 (53)	87 % 75-94 (52)	80 % 68-89 (48)	72 % 59-83 (43)	68 % 55-80 (41)	67 % 53-78 (40)	62 % 48-74 (37)
	Sp_r	60,9 % 56,6-65,0 (333)	84,8 % 81,5-87,7 (464)	90,7 % 87,9-93,0 (496)	93,1 % 90,6-95,0 (509)	94,5 % 92,3-96,3 (517)	95,4 % 93,3-97,0 (522)	96,0 % 94,0-97,5 (525)	96,5 % 94,6-97,9 (528)

Nb : Nombre de résultats positifs dans l'étude de la Se_r du test ou de résultats négatifs dans l'étude de la Sp_r du test.

II.2.1.1. Résultats combinés des Se_r PPD & Sp_r PPD

Le Tableau II.1.15 présente les valeurs de Se_r PPD et de Sp_r PPD, obtenues en utilisant la formule “normalisée” pour calculer les résultats des PPD $[(DO_{PPDB}-DO_{PPDA})/(DO_{TP}-DO_{TN})]$ et huit valeurs différentes de seuil de positivité des résultats (de 0,01 à 0,08), dans les études de Se_r et de Sp_r du test IFN γ respectivement.

Ces résultats montrent que les PPD sont assez sensibles mais beaucoup moins spécifiques (au seuil de 0,04, Se_r PPD de 83 % [IC 95 %, 72-92] et Sp_r PPD de 73,3 % [IC 95 %, 69,4-77,0]), par rapport au résultat (de Sp PPD) obtenu dans l'étude de spécificité absolue (Sp).

Une seconde courbe ROC des PPD a été tracée à partir des valeurs de Se_r PPD et Sp_r PPD obtenues (Figure II.1.7). Des valeurs optimales en Se_r PPD (83 % [72-92]) et Sp_r PPD (75,5 % [71,7-79,0]) ont été obtenues lorsque la valeur du seuil de positivité des résultats des PPD (calculés à partir de la formule de calcul "normalisée"), est de 0,05 (Figure II.1.7 et Tableau II.1.15).

N.B. : ce seuil décisionnel de 0,05 déterminé pour la formule "normalisée" de calcul des résultats des PPD (pour une utilisation du test IFN γ en série avec l'IDS) correspond à un seuil décisionnel de 0,12 (0,05 x 2,4) pour la formule "initiale" de calcul des résultats des PPD ($DO_{PPDB}-DO_{PPDA}$).

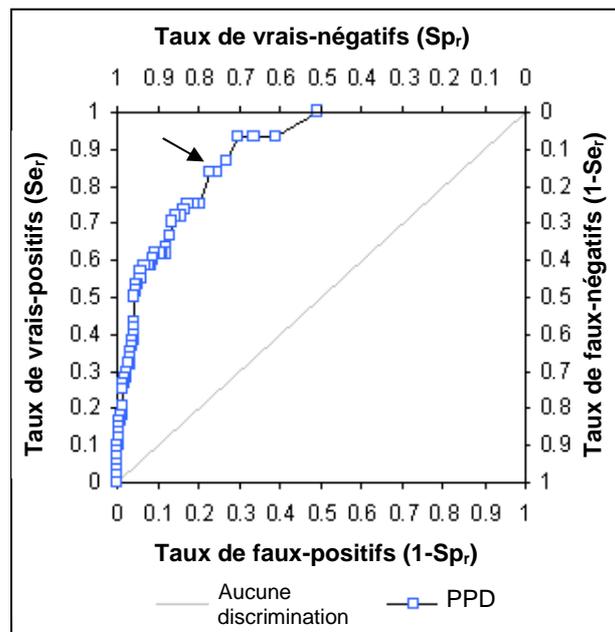


Figure II.1.7. Courbe ROC représentant la Se_r PPD (« taux de vrai-positifs » en PPD dans l'étude de la Se_r) en fonction de « $1-Sp_r$ PPD » (« taux de faux-positifs » dans l'étude de la Sp_r), obtenue pour différentes valeurs-seuils (de 0,00 à 1,25) (Faye S. *et al.*, sous presse).

La flèche indique le seuil de positivité de 0,05 permettant d'obtenir une sensibilité relative et une spécificité absolue des PPD optimales.

II.2.1.2. Résultats combinés des Se_r R & Sp_r R

Les valeurs de Se_r R et de Sp_r R, obtenues en utilisant la formule "normalisée" pour calculer les résultats des R $[(DO_R-DO_N)/(DO_{TP}-DO_{TN})]$ et huit valeurs différentes de seuil de positivité des résultats (de 0,01 à 0,08), dans les études de Se_r et de Sp_r du test IFN γ respectivement sont indiquées au tableau II.1.15.

Ces résultats montrent que les R sont bien spécifiques et assez sensibles (au seuil de 0,04, Se_r PPD de 80 % [IC 95 %, 68-89] et Sp_r PPD de 93,1 % [IC 95 %, 98,2-99,9]), comme cela a déjà été décrit dans la littérature et dans l'étude de spécificité absolue (Sp).

Une seconde courbe ROC des R a été tracée à partir des valeurs de Se_r R et Sp_r R obtenues (Figure II.1.8). Des valeurs optimales en Se_r R (87 % [75-94]) et Sp R (90,7 % [87,9-93,0]) ont été obtenues lorsque la valeur du seuil de positivité des résultats des R (calculés à partir de la formule de calcul "normalisée"), est de 0,03 (Figure II.1.8 et Tableau II.1.15).

N.B. : ce seuil décisionnel de 0,03 déterminé pour la formule "normalisée" de calcul des résultats des R (pour une utilisation du test IFN γ en série avec l'IDS) correspond à un seuil décisionnel de 0,07 (0,03 x 2,4) pour la formule "initiale" de calcul des résultats des R ($DO_R - DO_N$).

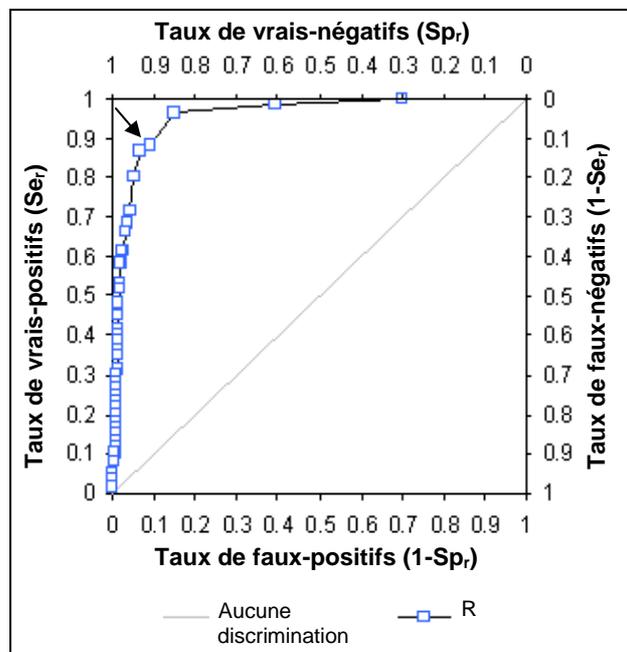


Figure II.1.8. Courbe ROC représentant la Se_r R (« taux de vrai-positifs » en R dans l'étude de la Se_r) en fonction de « $1-Sp_r$ R » (« taux de faux-positifs » en R dans l'étude de la Sp_r), obtenue pour différentes valeurs-seuils (de 0,00 à 1,70) (Faye S. *et al.*, sous presse). La flèche indique le seuil de positivité de 0,03 permettant d'obtenir une sensibilité relative et une spécificité absolue des R optimales.

II.2.2. Estimation des Se_r & Sp_r finales du test IFN γ aux seuils décisionnels déterminés pour des Se_r et Sp_r individuelles optimales

Les résultats finaux des études de Se_r et Sp_r du test IFN γ , obtenus à partir de l'association des résultats des PPD et R (résultats individuels de chaque étude respective, cf. Tableau II.1.15)

déterminés pour des valeurs de seuil de positivité de 0,05 et de 0,03 respectivement sont exposés dans le Tableau II.1.16.

De même, des estimations des Se_r et Sp_r finales du test IFN γ en suivant les deux méthodes différentes d'interprétation des résultats finaux (PPD \cap R et PPDUR) sont présentées dans ce tableau.

Tableau II.1.16. Résultats finaux de l'étude de la sensibilité relative (Se_r) (n=60) et de l'étude de la spécificité opérationnelle (Sp_r) (n=547) du test IFN γ , issus de l'association des résultats des PPD et des R obtenus pour des seuils de positivité de 0,05 et 0,03 respectivement ; Estimation de la Se_r et de la Sp_r finales à partir de deux méthodes d'interprétation des résultats finaux (Faye S. *et al.*, sous presse).

Nombre de	Résultats finaux	
	Etude de la Sp_r	Etude de la Se_r
POS	31	46
DIV	123	10
NEG	393	4
Méthode d'interprétation	Sp_r finale % [IC 95 %] (nombre d'animaux négatifs)	Se_r finale % [IC 95 %] (nombre d'animaux positifs)
PPD \cap R	94,3 % [92,0-96,1] (516)	77 % [64-87] (46)
PPDUR	71,8 % [67,9-75,6] (393)	93 % [84-98] (56)

Sp_r PPD \cap R : $1 - (POS \%) = (NEG + DIV) \%$; Sp_r PPDUR : $1 - [(POS + DIV) \%) = NEG \%$;

Se_r PPD \cap R : $POS \%$; Se_r PPDUR : $(POS + DIV) \%$

La Se_r PPD \cap R et la Se_r PPDUR obtenues du test IFN γ modifié (**dont l'analyse des résultats est basée sur des formules "normalisées" avec des seuils de 0,05 pour les PPD et de 0,03 pour les R) ont donc été estimées respectivement à 77 % [64-87] et 93 % [84-98] (Tableau II.1.16). De même, la Sp_r PPD \cap R et la Sp_r PPDUR obtenues du test IFN γ modifié** ont donc été estimées respectivement à 94,3 % [92,0-96,1] et 71,8 % [67,9-75,6] (Tableau II.1.16).

Discussion :

I. Validité de l'échantillonnage

I.1. Etude de la spécificité du test IFN γ modifié

L'échantillonnage des études de spécificité (spécificités absolue, Sp et opérationnelle, Sp_r) a été réalisé conditionnellement au statut connu des élevages indemnes. L'étude de spécificité absolue a été réalisée sur un nombre certes important de prélèvements (500 prévus, 492

finalement utilisables), mais limité d'élevages (25). Pour les causes de sensibilisation non spécifiques indépendantes des conditions épidémiologiques de l'élevage (et donc intervenant au niveau de l'animal), cette étude donne une bonne estimation. Pour des causes qui seraient liées aux conditions spécifiques des élevages, cette étude n'a qu'une portée limitée du fait du nombre réduit d'élevages étudiés.

Les conditions modulant la spécificité peuvent être très variables au plan géographique (prévalence des agents responsables de réactions non spécifiques, pratiques d'élevage pouvant moduler l'exposition des animaux à ces agents) ; il était donc indispensable de procéder à une étude devant permettre de refléter les conditions propres aux élevages de Dordogne, ce que nous avons fait (spécificité opérationnelle), en complément de la première étude réalisée (spécificité absolue). Toutefois, pour des raisons aisément compréhensibles, il ne nous était pas possible de procéder à cette étude dans la zone même où sont concentrés les élevages infectés. Nous pouvons cependant considérer que les résultats obtenus doivent être suffisamment représentatifs de la situation des élevages de Dordogne, et en particulier des zones infectées.

On peut se poser la question de la validité du classement des élevages étudiés : nous avons vérifié (au moment de la rédaction de ce chapitre) qu'ils étaient bien restés indemnes. Le risque d'erreur de ce classement se renforcera avec le temps, mais on voit bien qu'il est faible, puisqu'il est limité à la valeur du taux d'incidence, qui, heureusement est faible.

I.2. Etude de la sensibilité du test IFN γ modifié

L'échantillonnage de l'étude de sensibilité (Se_T) a été réalisé de façon rétrospective, à partir des résultats disponibles dans notre laboratoire, concernant des animaux qui ont permis l'isolement de *M. bovis*, qui ont donc présenté des lésions. L'historique des ces animaux a montré qu'ils avaient en fait été envoyés à l'abattoir dans le cadre d'une procédure d'abattage diagnostique, c'est-à-dire dans le but de rechercher des lésions éventuelles et dans ce cas, de réaliser les prélèvements devant permettre la confirmation du diagnostic.

Ces animaux ne constituent par conséquent qu'une partie du flux des animaux ayant subi une IDS, puis un test IFN γ et enfin un abattage diagnostique. On peut être en droit de se demander si cette procédure particulière d'échantillonnage soumise à toute une série de conditions successives, dont une seule catégorie nous est parvenue, n'est pas de nature à altérer la valeur de nos résultats : sous estimation, sur estimation ?

Une chose est sûre : nos résultats permettent de comparer les différentes modalités du test IFN γ entre elles. Nos travaux permettent donc de conclure sur leurs valeurs relatives.

Le fait que tous les animaux étudiés aient été trouvés porteurs de lésions constitue certainement un biais très important, car on sait bien que de nombreux animaux infectés peuvent ne pas présenter de lésion tuberculeuse. Or, la question de la sensibilité du test IFN γ , même conditionnellement à l'IDS non-négative, reste posée également pour les animaux non porteurs de lésion tuberculeuse macroscopique.

Parmi les animaux à la fois non-négatifs à l'IDS et positifs au test IFN γ qui n'ont pas présenté de lésion suspecte à l'abattoir, et n'ont donc pas fait l'objet d'un prélèvement, il est probable qu'un certain nombre soit toutefois infecté. Ceci constitue même un des avantages du test IFN γ qui est de révéler de façon très précoce des animaux infectés, bien avant la présence de lésions détectables par observation macroscopique.

Pour s'en assurer, il conviendrait de procéder à un échantillonnage systématique sur de tels animaux (prélèvement d'une série de ganglions, même en l'absence de lésion visible) en vue de l'analyse PCR MTBC*. Ce biais est de nature à sous-estimer la sensibilité du test IFN γ .

Pour les animaux ayant présenté des lésions suspectes mais n'ayant pas permis l'isolement de *M. bovis*, l'interprétation est similaire.

Cette étude complémentaire permettrait d'en apprécier la fréquence, que nous pensons malgré tout limitée. La valeur de nos indicateurs aurait plutôt tendance à légèrement sous-estimer les valeurs réelles, et de ce fait, ce biais n'est pas de nature à remettre en question nos conclusions, sur un plan pragmatique.

En revanche, nos résultats ne pourraient pas être utilisés tels quels pour une modélisation bien que les types d'études réalisées ressemblent à celles présentées dans la littérature.

* Ce procédé est déjà réalisé à titre expérimental depuis plus d'un an et quelques animaux abattus à des fins diagnostiques (avec une IDS non-négative, un test IFN γ positif et une IDC non-négative) mais finalement sans lésion macroscopique ont été confirmés infectés par bactériologie (et PCR MTBC).