

ÉVALUATION DES CARACTÉRISTIQUES DES TESTS DE CONFIRMATION DE LA TUBERCULOSE BOVINE : COMPARAISON DE LA CULTURE BACTÉRIENNE, DE L'HISTOPATHOLOGIE ET DE LA PCR *

Aurélie Courcou¹, Jean-Louis Moyen², Laure Brugère², Sandy Faye², Sylvie Hénault³,
Hélène Gares², et Maria-Laura Boschioli³

RÉSUMÉ

La culture bactérienne et l'histopathologie sont actuellement les tests officiels les plus utilisés dans l'Union Européenne pour confirmer le diagnostic de tuberculose bovine sur un animal suspect. La PCR est également employée car elle permet d'obtenir un diagnostic rapide ; pourtant, ses caractéristiques n'ont pas été évaluées dans les conditions de terrain. L'objectif de notre travail était donc d'estimer et de comparer les sensibilités et spécificités de la culture bactérienne, l'histopathologie et la PCR dans les conditions d'utilisation françaises.

Cinq mille deux cent onze animaux abattus entre 2008 et 2012 et analysés par culture bactérienne et PCR (kit PCR LSI VetMAX™ *Mycobacterium tuberculosis Complex*, Life Technologies®) ont été inclus dans l'étude. Six cent quatre vingt dix sept d'entre eux ont également fait l'objet d'un examen histopathologique. Afin d'estimer les caractéristiques de ces trois tests, une analyse par classe latente a été mise en œuvre dans un cadre bayésien prenant en compte la dépendance entre la PCR et la culture.

La sensibilité de la PCR estimée par notre modèle était supérieure à celle de la culture bactérienne (en moyenne 87,7 % [82,5-92,3 %] pour la PCR contre 78,1 % [72,9-82,8 %] pour la culture). La spécificité des deux tests était très bonne (en moyenne 97,0 % pour la PCR [94,3-99,0 %] et 99,1 % pour la culture [97,1-100 %]). Nos résultats ont montré que l'histopathologie était au moins aussi sensible que la PCR (en moyenne 93,6 % [89,9-96,9 %]) mais moins spécifique que les deux autres tests (en moyenne 83,3 % [78,7-87,6 %]).

D'après ces résultats, la PCR pourrait donc être utilisée en remplacement de la culture bactérienne comme test de confirmation de la tuberculose bovine à partir de prélèvements d'animaux suspects.

Mots-clés : tuberculose bovine, tests diagnostiques, *Mycobacterium bovis*, PCR, bactériologie, histologie, analyse par classe latente, bayésien.

SUMMARY

Bacteriology and histopathology are the most commonly used tests for official confirmatory diagnosis of bovine tuberculosis (bTB) in cattle. In most countries, PCR is also increasingly being used because it allows a fast diagnosis. This test can be applied as a supplement to or a replacement for current bTB confirmatory diagnostic tests but its characteristics have first to be evaluated. This study was designed to estimate and compare sensitivities and specificities of bacteriology, histopathology and PCR under French field conditions, in the absence of a gold standard using latent class analysis.

.../..

* Texte de la conférence présentée au cours de la Journée scientifique AEEMA-RFSA, 18 mars 2014

¹ Unité épidémiologie, Laboratoire de santé animale, Anses, 23 avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort cedex, France

² Laboratoire départemental d'analyses et de recherche de Dordogne, 161 avenue Churchill, 24660 Coulounieix-Chamiers, France

³ Laboratoire national de référence tuberculose bovine, Unité zoonoses bactériennes, santé animale, Anses, 23 avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort cedex, France

.../..

The studied population amounted to 5,211 animals from whom the samples were subjected to bacteriology and PCR (LSI VetMAX™ *Mycobacterium tuberculosis Complex* PCR Kit, Life Technologies). Samples from 697 of these animals were also subjected to histopathology. Bayesian models were developed, allowing for dependence between bacteriology and PCR, while assuming independence from histopathology. The sensitivity of PCR was higher than that of bacteriology (on average 87.7% [82.5-92.3%] versus 78.1% [72.9-82.8%]) while specificity of both tests was found to be very high (on average 97.0% for PCR [94.3-99.0%] and 99.1% for bacteriology [97.1-100.0%]). Histopathology was at least as sensitive as PCR (on average 93.6% [89.9-96.9%]) but less specific than the two other tests (on average 83.3% [78.7-87.6%]). These results suggest that PCR has the potential to replace bacteriology to confirm bTB diagnosis on samples collected from suspected cattle.

Keywords: Bovine tuberculosis, Diagnostic tests, *Mycobacterium bovis*, PCR, Bacteriology, Histology, Latent class analysis, Bayesian.



I - INTRODUCTION

La tuberculose bovine est une maladie zoonotique causée principalement par *Mycobacterium bovis* constituant un problème majeur dans de nombreux pays européens : bien que des programmes de contrôle et d'éradication y aient été mis en place depuis plusieurs dizaines d'années, la prévalence d'infection est actuellement en augmentation dans plusieurs d'entre eux [Schiller *et al.*, 2011]. Dans ce contexte, la détection et la confirmation de l'infection doivent être rapides et fiables, ce qui implique une très bonne connaissance des caractéristiques des tests diagnostiques utilisés. Si les sensibilités et spécificités des tests de dépistage (intradermotuberculation et test interféron- γ) ont été beaucoup étudiées [Clegg *et al.*, 2011 ; de la Rua-Domenech *et al.*, 2006 ; Karolemeas *et al.*, 2012], les caractéristiques des tests de confirmation de l'infection sont bien moins connues. Dans l'Union Européenne, la culture bactérienne et l'histopathologie sont actuellement les tests officiels pour confirmer le diagnostic de tuberculose bovine sur un animal suspect. L'histopathologie a été démontrée moins spécifique que la culture bactérienne : Varello *et al.* [2008] ont estimé la spécificité moyenne des méthodes histologiques à 92,3 % en prenant la bactériologie comme méthode de référence. Ce manque de spécificité de l'histopathologie impose aux autorités vétérinaires d'attendre les résultats de la culture bactérienne pour pouvoir confirmer

ou infirmer l'infection. En France, des restrictions de mouvements sont imposées aux troupeaux bovins présentant des réactions non négatives aux tests de dépistage et faisant donc l'objet d'une suspicion. Lorsque l'animal suspect fait l'objet d'un abattage diagnostique, le résultat de la bactériologie ne peut être obtenu avant au moins trois semaines en cas de positivité et un résultat négatif (levée des restrictions de mouvements) avant au moins trois mois, ce qui rend l'utilisation de la culture bactérienne très contraignante sur le terrain. De plus, la sensibilité de ce test n'est pas parfaite : on l'estime à 85 % sur des échantillons présentant des lésions évocatrices de tuberculose bovine (Laboratoire européen de référence pour la tuberculose bovine, communication personnelle). Dans ce contexte, l'emploi de la PCR pourrait permettre de confirmer ou d'infirmer plus rapidement la suspicion, donc de gérer plus précocement les troupeaux infectés et de lever rapidement les restrictions touchant les troupeaux indemnes.

La PCR LSI VetMAX® *Mycobacterium tuberculosis Complex* commercialisée par Life Technologies® est fondée sur la détection de la séquence d'insertion IS6110 présente chez toutes les mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis*. Cette PCR pourrait être utilisée en supplément ou en remplacement des tests de confirmation actuels mais à notre connaissance, ses caractéristiques

n'ont pas été évaluées à partir d'échantillons collectés sur le terrain dans le cadre de la procédure standard de gestion des suspicions de tuberculose bovine. Or, cette évaluation semble un pré-requis pour pouvoir utiliser ce test de manière rationnelle. L'approche traditionnelle pour estimer les caractéristiques d'un test diagnostique consiste à tester un groupe d'individus dont le statut vis-à-vis de l'infection est connu. Cela suppose que ce statut ait été déterminé par une méthode de référence (ou « gold standard ») ayant une sensibilité et une spécificité parfaites. Pour la tuberculose bovine, une telle méthode n'est pas disponible, la culture bactérienne et l'histopathologie n'ayant ni l'une ni l'autre une sensibilité et une spécificité de 100 %. En l'absence de méthode de référence, il est possible d'estimer les caractéristiques d'un test diagnostique par une analyse à classe latente [Branscum *et al.*, 2005] : le statut vis-à-vis de l'infection des individus testés n'étant pas déterminé par un test de référence, il est appelé "latent" et doit être estimé par le modèle statistique. Dans une analyse à classe

latente, trois hypothèses, appelées le paradigme de Hui-Walter, doivent être posées [Hui et Walter, 1980] : (i) les individus testés doivent provenir d'au moins deux populations aux prévalences d'infection différentes, (ii) les sensibilités et spécificités des tests doivent être constantes dans toutes les populations et (iii) les tests doivent être conditionnellement indépendants. La PCR et la bactériologie sont fondées sur le même principe biologique (la détection directe de l'agent pathogène), ce qui n'est pas le cas pour l'histologie qui elle analyse les changements morphologiques des tissus. Nous avons donc utilisé un modèle statistique adapté afin de prendre en compte une dépendance conditionnelle au statut d'infection entre la PCR et la culture bactérienne [Toft *et al.*, 2007].

Le but de notre étude étant donc d'estimer, par une analyse à classe latente dans un cadre bayésien, les sensibilités et spécificités de la culture bactérienne, l'histopathologie et la PCR réalisés en France sur les nœuds lymphatiques des bovins suspects.

II - MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. COLLECTE DES ÉCHANTILLONS ET STRATIFICATION DE LA POPULATION

La population source de notre étude est constituée des animaux dont les échantillons ont été soumis au Laboratoire d'analyse et de recherche de Dordogne (LDAR 24) pour confirmation de l'infection par la tuberculose bovine entre 2008 et 2012. Ces animaux ont été analysés dans le cadre d'abattages diagnostiques à la suite d'une suspicion de tuberculose bovine dans leur troupeau, dans le cadre d'abattages totaux ou sélectifs de troupeaux déclarés infectés de tuberculose bovine ou parce qu'ils présentaient des lésions évocatrices de tuberculose bovine à l'inspection de routine en abattoir. La totalité des animaux analysés par le LDAR 24 entre 2008 et 2012 ont été rétrospectivement inclus dans l'étude, excepté 30 bovins pour lesquels le numéro EDE du troupeau d'appartenance, le résultat de PCR ou le résultat de culture bactérienne n'était pas disponible. L'échantillon analysé comprenait donc 5 211 bovins provenant de 1 325 troupeaux différents situés dans 51 départements français.

Sur chaque animal, les ganglions rétro-pharyngiens, trachéo-bronchiques et médiastinaux ont été prélevés et les mêmes broyats ont été utilisés pour la PCR et la bactériologie. Un animal a été considéré positif en PCR (et/ou bactériologie) si au moins un des échantillons était positif en PCR (et/ou bactériologie respectivement). Parmi ces 5 211 animaux, 697 provenant de 358 troupeaux différents ont également été analysés en histopathologie à la demande des services vétérinaires ou du LDAR 24. Les 697 animaux sur lesquels les trois tests ont été réalisés présentaient des lésions macroscopiques évocatrices de tuberculose bovine.

L'incidence d'infection sur la période 2000-2007 des cantons d'où provenaient les animaux testés a été utilisée pour définir trois populations à prévalences d'infection attendues différentes :

- Population A = animaux provenant des cantons dont l'incidence troupeau était supérieure à 0,25 foyer pour 100 troupeaux-années sur la période 2000-2007 ;
- Population B = animaux provenant des cantons dont l'incidence troupeau était non nulle mais

inférieure ou égale à 0,25 foyer pour 100 troupeaux-années sur la période 2000-2007 ;

- Population C = animaux provenant des cantons dont l'incidence troupeau était nulle sur la période 2000-2007 (aucun troupeau n'ayant fait l'objet d'un arrêté préfectoral de déclaration d'infection dans le canton sur cette période).

2. TESTS DIAGNOSTIQUES

2.1. BACTÉRIOLOGIE

La bactériologie a été réalisée sous accréditation selon la norme NFU 47-104. Il s'agit d'une méthode fondée sur le broyage et la décontamination des prélèvements avec du H₂SO₄/NaOH puis sur l'ensemencement sur des milieux de culture solides spécifiques pour la recherche de mycobactéries.

2.2. PCR

La PCR en temps réel utilisée est la PCR LSI VetMAX® *Mycobacterium tuberculosis* complex commercialisée par Life Technologies®, fondée sur la détection de la séquence d'insertion IS6110 présente chez toutes les mycobactéries du complexe de *Mycobacterium tuberculosis* [Thierry *et al.*, 1990]. Cette méthode est celle agréée par le Laboratoire national de référence tuberculose.

2.3. HISTOLOGIE

Les analyses histologiques ont été réalisées sur la partie lésée de l'échantillon au sein d'un des deux laboratoires agréés, le Laboratoire de développement et d'analyses des Côtes-d'Armor (LDA22) ou le laboratoire de Vetagro Sup. Ces laboratoires mettent en œuvre des méthodes de coloration Ziehl-Neelsen ou hémalun-éosine-safran, et pour le deuxième laboratoire une technique d'immunohistochimie complémentaire.

3. MODÈLE STATISTIQUE

Deux analyses ont été réalisées en utilisant une formulation bayésienne d'un modèle à classe latente : la première visait à estimer les caractéristiques de la PCR et de la culture bactérienne d'après les résultats aux tests des 5 211 animaux recrutés et répartis selon les populations A, B et C. La seconde avait pour objectif d'estimer les caractéristiques de la PCR, de

la culture bactérienne et de l'histopathologie d'après les résultats aux tests des 697 animaux présentant des lésions évocatrices de tuberculose bovine et analysés via les trois tests.

3.1. PREMIÈRE ANALYSE

La PCR et la bactériologie étant fondées sur le même principe biologique (la détection directe de l'agent pathogène), ces deux tests ont été considérés comme des tests dépendants. Cependant, le degré de dépendance entre PCR et bactériologie était inconnu. Considérant un modèle avec deux tests et trois populations échantillonnées, neuf paramètres devaient être estimés (trois prévalences, deux sensibilités, deux spécificités et deux covariances entre PCR et culture). Notre modèle disposait de neuf degrés de liberté et n'était donc pas identifiable (c'est-à-dire que ses paramètres ne pouvaient pas être estimés seulement à partir des données). Dans un cadre bayésien, l'identifiabilité n'est pas obligatoire si de l'information *a priori* sur les valeurs de certains paramètres est disponible. Dans notre cas, nous ne disposions de connaissances précises ni sur les prévalences d'infection dans les populations A, B et C entre 2008 et 2012 ni sur les caractéristiques des tests tels qu'utilisés en France. Les covariances entre PCR et culture bactérienne ont donc été fixées afin de n'avoir que sept paramètres à estimer et obtenir un modèle identifiable. La covariance entre ces deux tests a été exprimée comme une proportion de la covariance maximale conditionnelle (Paul *et al.*, 2012). Huit modèles ont donc été utilisés, chaque modèle ayant une valeur différente de proportion de covariance maximale (0,0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 et 0,7 respectivement) : quand cette proportion valait zéro, culture bactérienne et PCR étaient supposées indépendantes, ce qui n'était plus le cas à mesure que la valeur de proportion de covariance augmentait. Le critère d'information de déviance (DIC) a été utilisé pour sélectionner le meilleur modèle parmi les huit testés.

3.2. DEUXIÈME ANALYSE

La PCR et la bactériologie ont été considérées comme des tests dépendants et l'histologie comme un test indépendant des deux autres. Comme dans la première analyse, les covariances ont été fixées et exprimées en proportion de la covariance conditionnelle maximale. Les huit nouveaux modèles utilisés ont été comparés en utilisant le DIC.

3.3. CALCUL BAYÉSIEN

Des distributions *a priori* non informatives ont été utilisées pour l'ensemble des paramètres. Vingt mille simulations ont été réalisées pour chaque modèle, les 10 000 premières étant rejetées car correspondant à la phase initiale de transition

(« burn-in »). Ces simulations ont été implémentées dans Openbugs version 3.2.2 [Lunn *et al.*, 2009]. La convergence des deux chaînes MCMC (Monte Carlo Markov Chain) a été vérifiée en visualisant la statistique de Brooks-Gelman-Rubin.

III - RÉSULTATS

1. PREMIÈRE ANALYSE (PCR ET CULTURE BACTÉRIENNE)

Respectivement 2 617, 715 et 1 879 animaux ont été classés dans les populations A, B et C. Les résultats aux tests de ces animaux sont présentés dans le tableau 1.

D'après ces données, la sensibilité et la spécificité de la PCR et de la bactériologie ainsi que les prévalences d'infection spécifiques à chaque

population (A, B et C) ont été estimées. Les huit modèles testés se sont avérés équivalents (DIC très proches), le modèle présentant une covariance entre PCR et bactériologie nulle se révélant néanmoins légèrement meilleur (DIC le plus faible). Les résultats de ce modèle sont présentés dans le tableau 2 : la PCR a été trouvée plus sensible que la bactériologie. Les deux méthodes (PCR et bactériologie) se sont avérées toutes deux très spécifiques.

Tableau 1

Résultats croisés en PCR et bactériologie des 5 211 bovins testés, classés par population

Population	POS _{bac} /POS _{PCR}	POS _{bac} /NEG _{PCR}	NEG _{bac} /POS _{PCR}	NEG _{bac} /NEG _{PCR}	Total
A	230	29	68	2 290	2 617
B	29	3	12	671	715
C	52	1	9	1 817	1 879
Total	311	33	89	4 778	5 211

Tableau 2

Moyenne et intervalle de crédibilité à 95 % des distributions a posteriori de la sensibilité (Se) et spécificité (Sp) de la PCR et de la bactériologie ainsi que des prévalences d'infection spécifiques à chaque population (A, B et C).

Ces estimations sont fondées sur une dépendance conditionnelle nulle entre les deux tests.

Paramètre estimé	Moyenne (%)	Intervalle de crédibilité à 95 %
Se bactériologie	79,2	[74,4 - 84,3]
Se PCR	90,9	[87,3 - 94,3]
Sp bactériologie	99,9	[99,7 - 100]
Sp PCR	99,8	[99,4 - 100]
Prévalence A	12,5	[11,1 - 13,9]
Prévalence B	6,1	[4,3 - 8,1]
Prévalence C	3,2	[2,4 - 4,2]

2. DEUXIÈME ANALYSE (PCR, CULTURE BACTÉRIENNE ET HISTOPATHOLOGIE)

Respectivement 345, 94 et 258 animaux ont été classés dans les populations A, B et C. Les résultats aux tests de ces animaux sont présentés dans le tableau 3.

D'après ces données, la sensibilité et la spécificité de la PCR, de la bactériologie et de l'histologie ainsi que les prévalences d'infection spécifiques à chaque population (A, B et C) ont été estimées. Le meilleur modèle correspondait à celui présentant une covariance entre PCR et bactériologie égale à

40 % de la covariance maximale conditionnelle (même si les modèles correspondant à des proportions de covariance de 30 à 50 % étaient très proches). Les résultats sont présentés dans le tableau 4 : tout comme dans la première analyse, la PCR et la bactériologie se sont révélées très spécifiques, ce qui n'a pas été le cas de l'histologie qui a été trouvée nettement moins spécifique que les deux autres tests. La sensibilité de la PCR a été montrée ici encore comme supérieure à celle de la bactériologie. Notons la très bonne sensibilité de l'histologie (au moins équivalente à celle de la PCR) sur cet ensemble d'animaux à lésions.

Tableau 3

Résultats croisés en PCR, bactériologie et histopathologie des 697 bovins testés, classés par population

Histologie	Population	POS _{bac} /POS _{PCR}	POS _{bac} /NEG _{PCR}	NEG _{bac} /POS _{PCR}	NEG _{bac} /NEG _{PCR}	Total
POS	A	163	14	32	31	240
	B	21	3	10	13	47
	C	32	0	2	37	71
NEG	A	8	1	9	87	105
	B	0	0	1	46	47
	C	6	0	3	178	187
Total		230	18	57	392	697

Tableau 4

Moyenne et intervalle de crédibilité à 95 % des distributions a posteriori de la sensibilité (Se) et spécificité (Sp) de la PCR, de la bactériologie et de l'histopathologie ainsi que des prévalences d'infection spécifiques à chaque population (A, B et C).

Ces estimations prennent en compte une dépendance conditionnelle entre PCR et bactériologie.

Paramètre estimé	Moyenne (%)	Intervalle de crédibilité à 95 %
Se bactériologie	78,1	[72,9 – 82,8]
Se PCR	87,7	[82,5 – 92,3]
Se histopathologie	93,6	[89,9 – 96,9]
Sp bactériologie	99,1	[97,1 – 100]
Sp PCR	97,0	[94,3 – 99,0]
Sp histopathologie	83,3	[78,7 – 87,6]
Prévalence A	68,3	[62,5 – 73,9]
Prévalence B	38,9	[28,5 – 49,8]
Prévalence C	16,2	[11,5 – 21,4]

IV - DISCUSSION

Nous avons estimé les sensibilités et spécificités de la culture bactérienne, de l'histopathologie et de la PCR employées pour le diagnostic de la tuberculose bovine, et ce en l'absence de méthode de référence. Il s'agit à notre connaissance de la première analyse à classe latente appliquée aux tests de confirmation de cette infection. Cette étude a montré que la PCR était plus sensible que la culture bactérienne et présentait une bonne spécificité (même si possiblement inférieure à la spécificité de la culture bactérienne). La PCR pourrait ainsi devenir à moyen terme un test utile pour le diagnostic officiel de la tuberculose bovine au sein de l'Union Européenne. L'histopathologie semble plus sensible que la culture bactérienne mais également moins spécifique, ce qui implique que ce test ne puisse pas être utilisé seul comme test de confirmation de tuberculose bovine.

Dans cette étude, la PCR s'est révélée plus sensible que dans des études précédemment publiées. Les résultats des estimations de sensibilité menées dans nos deux analyses étaient quasi-équivalentes (moyenne de 90,9 % dans la première analyse [87,3-94,3 %] et de 87,7 % [82,5-92,3 %] dans la seconde), ce qui suggère que l'estimation de la sensibilité de la PCR n'a pas été influencée par la présence ou l'absence de lésions évocatrices de tuberculose bovine sur les animaux testés. Au contraire, Parra *et al.* [2008] ont rapporté une sensibilité de la PCR de 61,1 % et de 80,6 % respectivement pour des échantillons sans et avec lésion macroscopique visible, en considérant une culture positive et/ou la présence de lésions évocatrices de tuberculose bovine comme test de référence. Dans le travail de Taylor *et al.* [2007], la comparaison des résultats de PCR *RD4* et *IS1081* avec une culture bactérienne positive a abouti à une évaluation de la sensibilité à environ 50 % et 70 % respectivement pour chacune de ces deux PCR. Thacker *et al.* [2011] ont rapporté que sur 30 échantillons positifs en culture pour *M. bovis*, seuls 20 étaient positifs en PCR temps-réel *IS6110*. Proaño-Perez *et al.* [2011], ont trouvé huit animaux positifs en PCR sur les douze positifs en bactériologie. Seuls Cardoso *et al.* [2009] ont rapporté des fréquences de résultats positifs en PCR et en culture bactérienne similaires (51,5 % versus 54,5 %) sur 35 échantillons de nœuds lymphatiques testés car présentant des lésions macroscopiques évocatrices de tuberculose bovine. Dans notre étude, la sensibilité de la PCR était plus élevée que celle de la culture

bactérienne, ce qui pourrait laisser penser que la culture bactérienne telle que pratiquée en France manque de sensibilité. Dans les conditions françaises de mise en œuvre de la bactériologie, la procédure de décontamination emploie l'acide sulfurique (H₂SO₄), méthode très efficace pour tuer les microorganismes ayant contaminé le prélèvement mais également les mycobactéries. Cependant, le LDAR 24 et le Laboratoire national de référence tuberculose ont obtenu des résultats très satisfaisants à l'essai inter-laboratoires organisé par le Laboratoire de référence de l'Union Européenne pour la tuberculose bovine. Ainsi, l'hypothèse d'une mauvaise sensibilité de la culture bactérienne en France n'est pas justifiée, ce que confirment les estimations de la sensibilité de la bactériologie réalisées ici (moyenne de 79,2 % dans la première analyse [74,4-84,4 %] et de 78,1 % dans la seconde [72,9-82,8 %]). Ces estimations sont cohérentes avec celles de Corner *et al.* [2012] qui ont rapporté une proportion d'échantillons infectés positifs en culture bactérienne comprise entre 58 % et 80 % selon le milieu de culture et la procédure de décontamination utilisés. Il faut souligner que toutes les méthodes PCR décrites dans la littérature ne sont pas équivalentes : les séquences de génome détectées et les techniques d'extraction de l'ADN peuvent différer. La bonne sensibilité de la méthode de la PCR rapportée ici pourrait donc être attribuée à une bonne qualité du test PCR LSI VetMAX® *Mycobacterium tuberculosis* complex. De plus, contrairement aux études précédemment mentionnées, nous avons réalisé l'estimation des caractéristiques des tests en l'absence de méthode de référence, en utilisant une approche par classe latente. Selon Toft *et al.* [2007], les estimations de sensibilité et spécificité réalisées en utilisant un test imparfait comme test de référence sont toujours biaisées : dans tous les cas, le nouveau test (ici la PCR) est décrit comme ayant des caractéristiques égales ou inférieures à celles du test de référence. La méthode que nous avons utilisée permet de supprimer ce biais, ce qui peut expliquer la différence entre les résultats de notre étude et ceux précédemment publiés. La culture bactérienne reste cependant nécessaire pour les études d'épidémiologie moléculaire. En effet, même si les progrès réalisés permettent souvent aujourd'hui un typage partiel à partir des éluats, certains tests moléculaires nécessitent une quantité importante d'ADN et donc des isolats

bactériens clonaux. Concernant l'histopathologie, nos estimations (sensibilité moyenne de 93,6 % [89,9 %-96,9 %] et spécificité moyenne de 83,3 % [78,7 %-97,6 %] sont cohérentes avec celles obtenues par Varelo *et al.* [2008].

Ainsi, cette analyse par classe latente a fourni des estimations des caractéristiques des deux tests actuellement utilisés (la culture bactérienne et l'histopathologie) et d'un nouvel outil, la PCR LSI VetMAX® *Mycobacterium tuberculosis Complex*, pour le diagnostic de confirmation de la

tuberculose bovine en conditions de terrain en France. Cette étude a montré que la PCR présentait une meilleure sensibilité que la culture bactérienne tout en ayant une bonne spécificité (même si possiblement inférieure à celle de la culture). De plus, la PCR permet de confirmer ou d'infirmier l'infection en moins de 48 heures. Ainsi, la PCR semble un bon test de confirmation dans les programmes de surveillance et de contrôle de la tuberculose bovine en France.

BIBLIOGRAPHIE

- Branscum A.J., Gardner I.A., Johnson W.O. - Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modeling. *Prev. Vet. Med.*, 2005, **68**, 145-163.
- Cardoso M.A., Cardoso R.F., Hirata R.D., Hirata M.H., Leite C.Q., Santos A.C., Siqueira V.L., Okano W., Rocha N.S., Lonardoni M.V. - Direct detection of *Mycobacterium bovis* in bovine lymph nodes by PCR. *Zoonoses Public Health*, 2009, **56**, 465-470.
- Clegg T.A., Duignan A., Whelan C., Gormley E., Good M., Clarke J., Toft N., More S. - Using latent class analysis to estimate the test characteristics of the gamma-interferon test, the single intradermal comparative tuberculin test and a multiplex immunoassay under Irish conditions. *Vet. Microbiol.*, 2011, **151**, 68-76.
- Corner L.A., Gormley E., Pfeiffer D.U. - Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: conditions for maximising the number of positive cultures. *Vet. Microbiol.*, 2012, **156**, 162-171.
- de la Rua-Domenech R., Goodchild A.T., Vordermeier H.M., Hewinson R.G., Christiansen K.H., Clifton-Hadley R.S. - Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.*, 2006, **81**, 190-210.
- Hui S.L., Walter S.D. - Estimating the error rates of diagnostic tests. *Biometrics*, 1980, **36**, 167-171.
- Karolemeas K., de la Rua-Domenech R., Cooper R., Goodchild A.V., Clifton-Hadley R.S., Conlan A.J., Mitchell A.P., Hewinson R.G., Donnelly C.A., Wood J.L., McKinley T.J. - Estimation of the relative sensitivity of the comparative tuberculin skin test in tuberculous cattle herds subjected to depopulation. *PLoS One*, 2012, **7**, e43217.
- Lunn D., Spiegelhalter D., Thomas A., Best N. - The BUGS project: Evolution, critique, and future directions. *Statistics in Medicine*, 2009, **28**, 3049-3067.
- Parra A., Garcia N., Garcia A., Lacombe A., Moreno F., Freire F., Moran J., Hermoso de Mendoza J. - Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.*, 2008, **127**, 315-324.
- Paul S., Toft N., Agerholm J.S., Christoffersen A.B., Agger J.F. - Bayesian estimation of sensitivity and specificity of *Coxiella burnetii* antibody ELISA tests in bovine blood and milk. *Prev. Vet. Med.*, 2013, **109**, 258-263.
- Proaño-Perez F., Benitez-Ortiz W., Desmecht D., Coral M., Ortiz JRon L., Portaels F., Rigouts L., Linden A. - Post-mortem examination and laboratory-based analysis for the diagnosis of bovine tuberculosis among dairy cattle in Ecuador. *Prev. Vet. Med.*, 2011, **101**, 65-72.
- Schiller I., RayWaters W., Vordermeier H.M., Jemmi T., Welsh M., Keck N., Whelan A., Gormley E., Boschirolli M.L., Moyon J.L., Vela C., Cagiola M., Buddle B.M., Palmer M., Thacker T., Oesch B. - Bovine tuberculosis in Europe from the perspective of an officially tuberculosis free country: trade, surveillance and diagnostics. *Vet. Microbiol.*, 2011, **151**, 153-159.

Taylor G.M., Worth D.R., Palmer S., Jahans K., Hewinson R.G. - Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Vet. Res.*, 2007, **3**, 12.

Thacker T.C., Harris B., Palmer M.V., Waters W.R. - Improved specificity for detection of *Mycobacterium bovis* in fresh tissues using IS6110 real-time PCR. *BMC Vet. Res.*, 2011, **7**, 50.

Thierry D., Brisson-Noel A., Vincent-Levy-Frebault V., Nguyen S., Guesdon J.L., Gicquel B. - Characterization of a *Mycobacterium*

tuberculosis insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, **28**, 2668-2673.

Toft N., Akerstedt J., Tharaldsen J., Hopp P. - Evaluation of three serological tests for diagnosis of Maedi-Visna virus infection using latent class analysis. *Vet. Microbiol.*, 2007, **120**, 77-86.

Varello K., Pezzolato M., Mascarino D., Ingravalle F., Caramelli M., Bozzetta E. - Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2008, **20**, 164-169.



Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier le Laboratoire de développement et d'analyses des Côtes-d'Armor et le Laboratoire d'anatomo-pathologie et d'histologie de VetAgroSup pour avoir réalisé les analyses histopathologiques ainsi que la Direction générale de l'alimentation du Ministère de l'agriculture pour avoir autorisé l'analyse de ces données.