

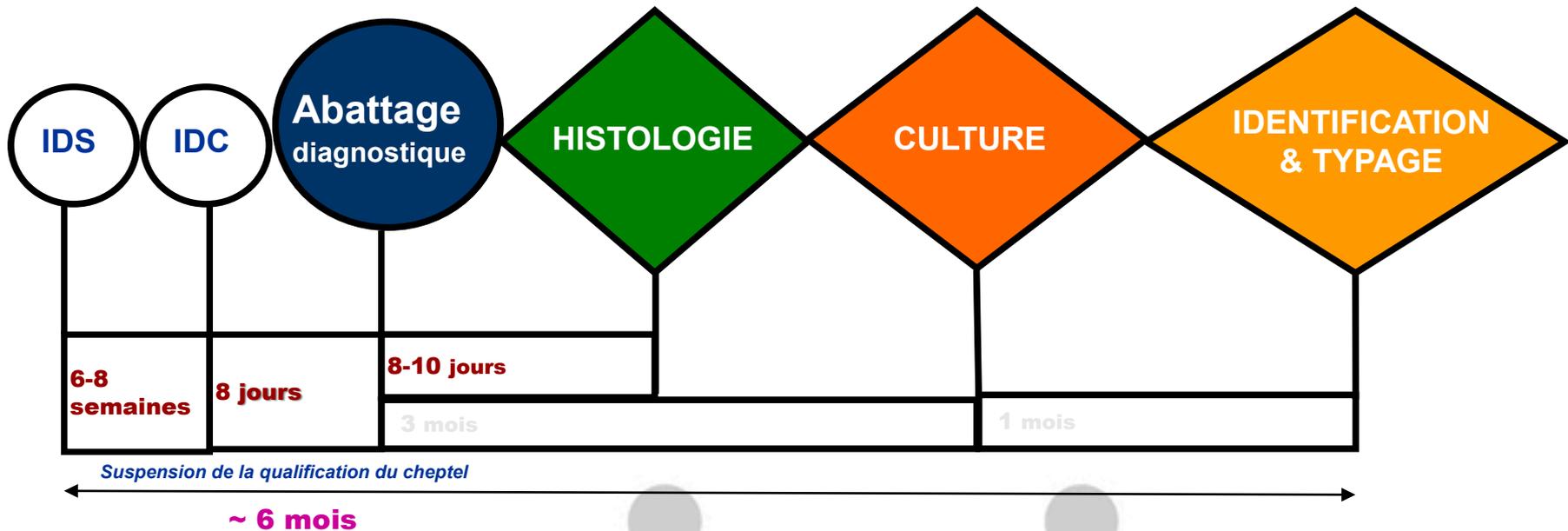
Tuberculose bovine :

Evolution des outils de dépistage et de diagnostic et implications sur le terrain

Maria-Laura BOSCHIROLI, LNR Tuberculose, ANSES Maisons-Alfort
Isabelle TOURETTE, GDS France

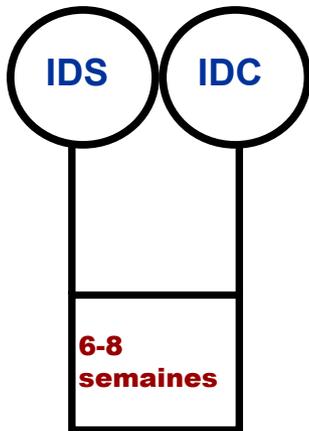
Surveillance et police sanitaire : des délais importants entre la détection et la confirmation / infirmation

Arrêté du 15 septembre 2003 dans sa version initiale - mesures techniques et administratives relatives à la prophylaxie collective et à la police sanitaire de la tuberculose



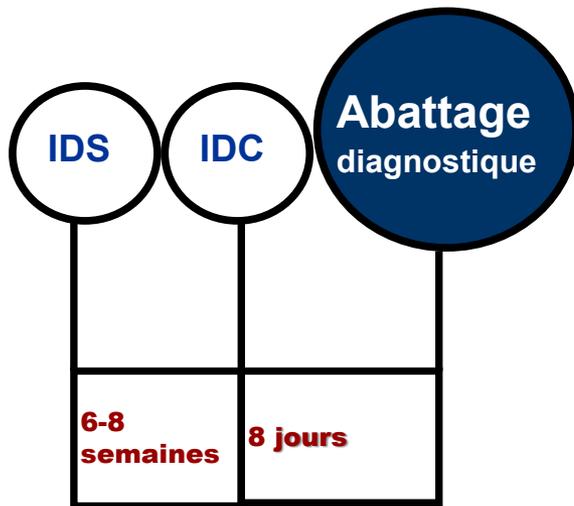
Surveillance et police sanitaire : des délais importants entre la détection et la confirmation / infirmation

Arrêté du 15 septembre 2003 dans sa version initiale - mesures techniques et administratives relatives à la prophylaxie collective et à la police sanitaire de la tuberculose



Surveillance et police sanitaire : des délais importants entre la détection et la confirmation / infirmation

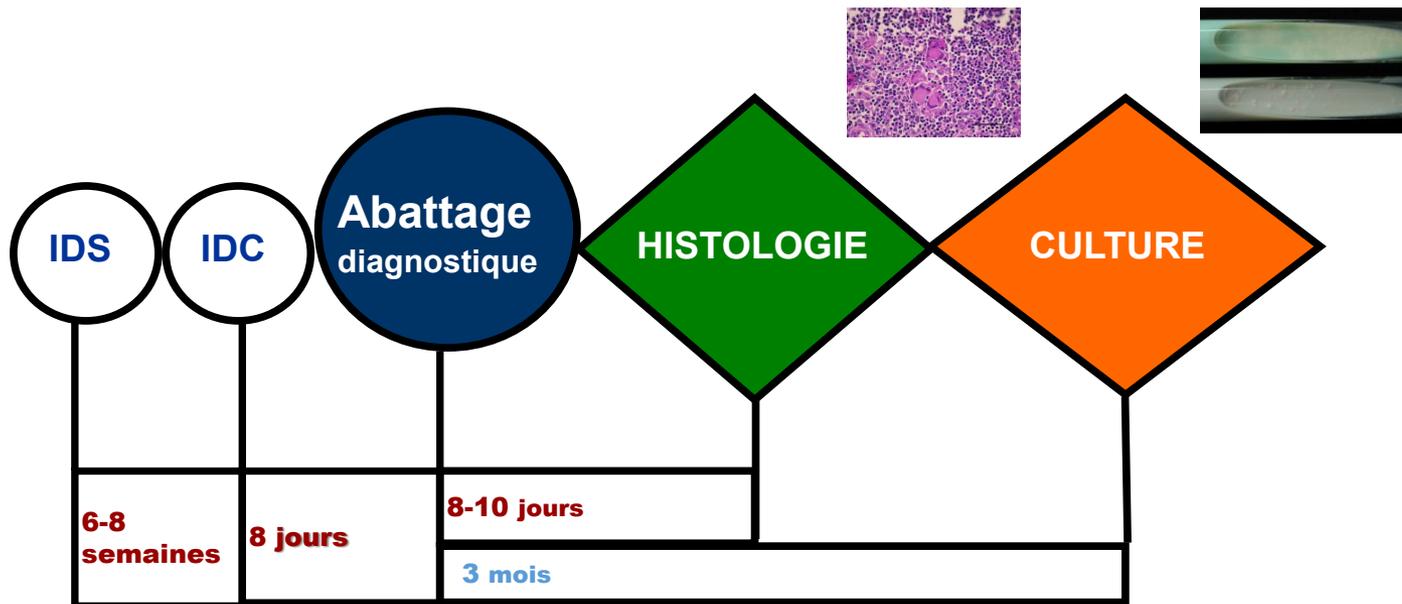
Arrêté du 15 septembre 2003 dans sa version initiale - mesures techniques et administratives relatives à la prophylaxie collective et à la police sanitaire de la tuberculose



Suspension de la qualification du cheptel

Surveillance et police sanitaire : des délais importants entre la détection et la confirmation / infirmation

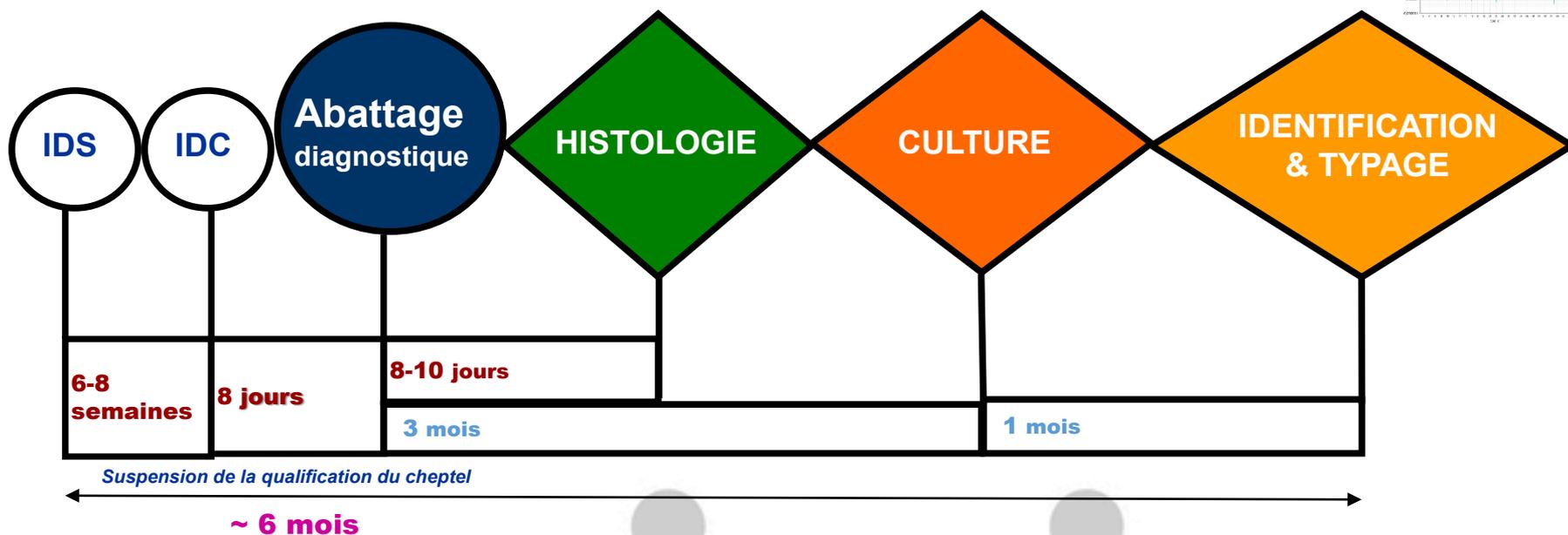
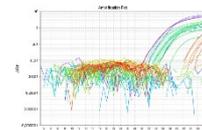
Arrêté du 15 septembre 2003 dans sa version initiale - mesures techniques et administratives relatives à la prophylaxie collective et à la police sanitaire de la tuberculose



Suspension de la qualification du cheptel

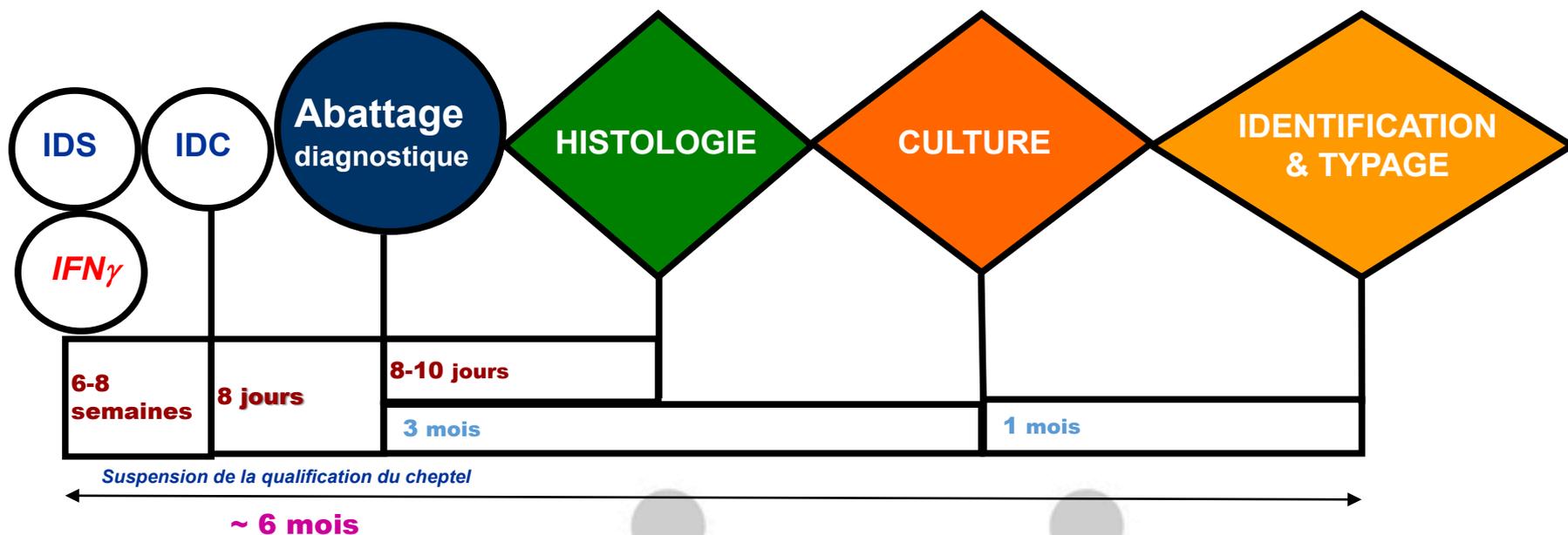
Surveillance et police sanitaire : des délais importants entre la détection et la confirmation / infirmation

Arrêté du 15 septembre 2003 dans sa version initiale - mesures techniques et administratives relatives à la prophylaxie collective et à la police sanitaire de la tuberculose

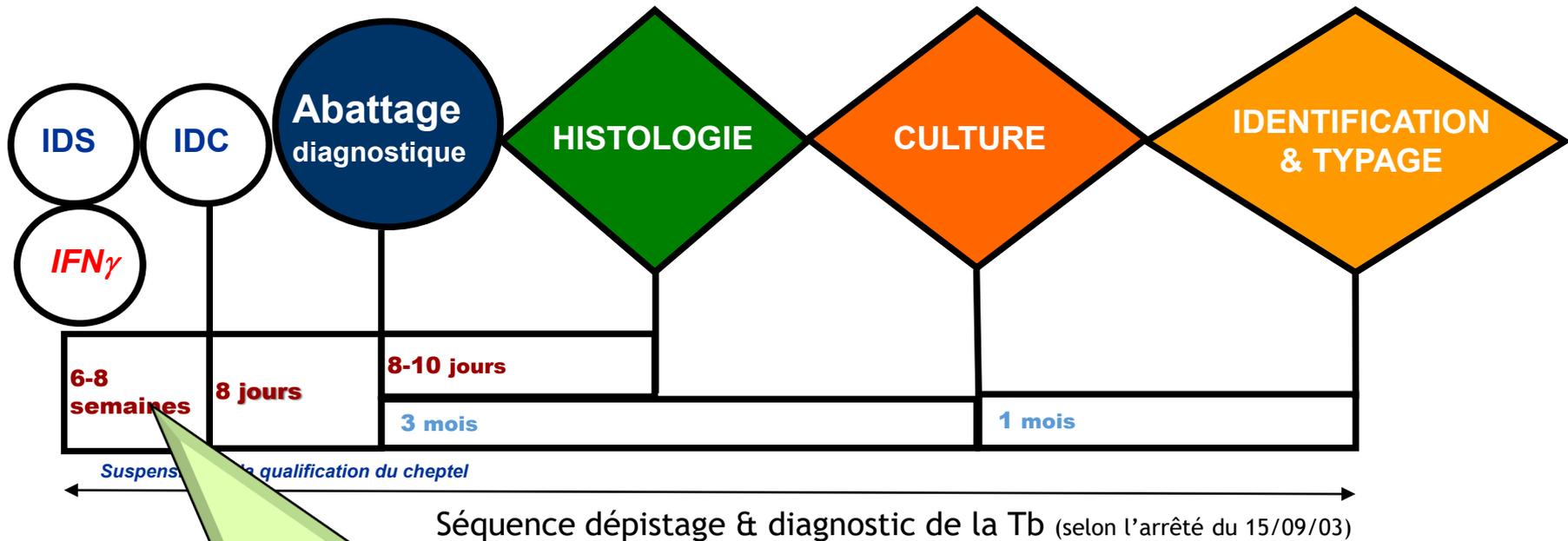


Surveillance et police sanitaire : des délais importants entre la détection et la confirmation / infirmation

Arrêté du 15 septembre 2003 dans sa version initiale - mesures techniques et administratives relatives à la prophylaxie collective et à la police sanitaire de la tuberculose

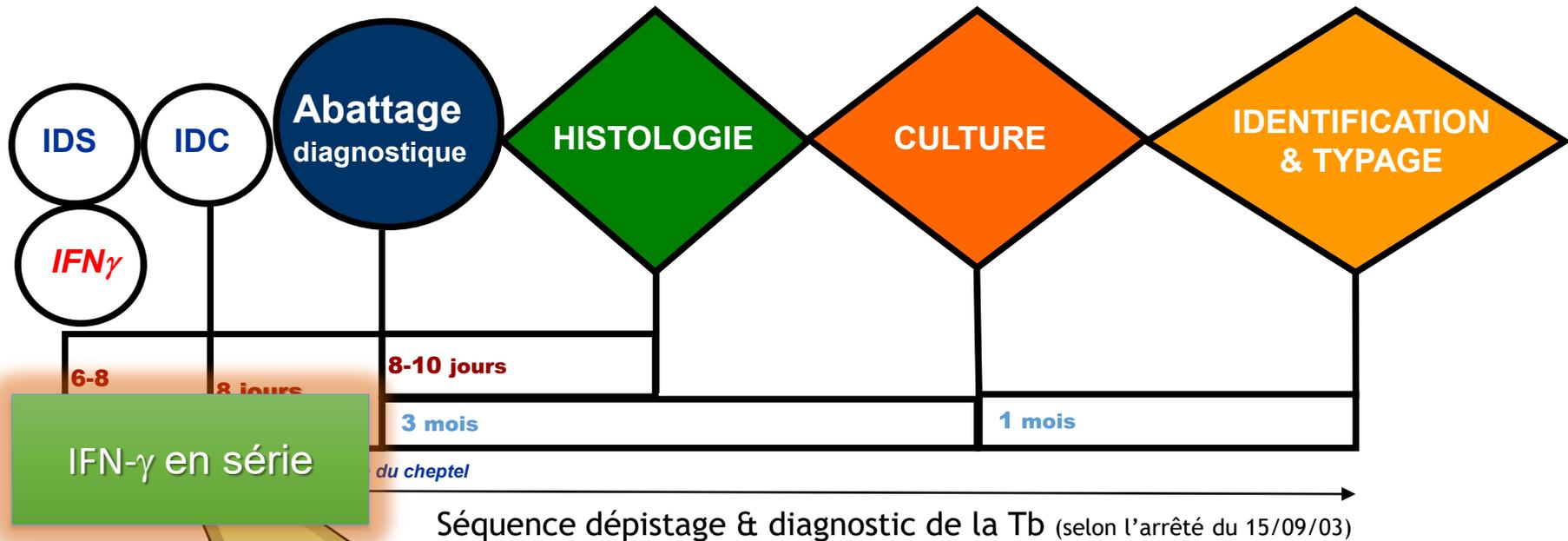


Amélioration du dépistage: le test IFN- γ France



IDT faible VPP en situation de faible prévalence et long laps d'attente entre dépistage et confirmation

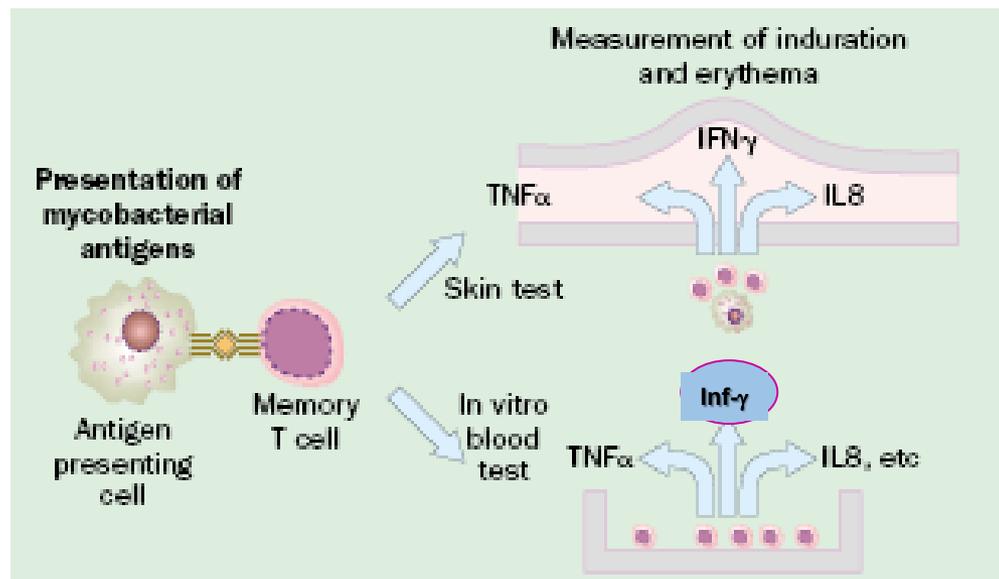
Amélioration du dépistage: le test IFN- γ France



IDT faible VPP en situation de faible prévalence et long laps d'attente entre dépistage et confirmation

Amélioration du dépistage: le test IFN- γ France

Hypersensibilité retardée (ID)

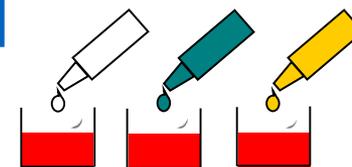


Test de dosage interféron gamma (IFN- γ)

Pai *et al*, The Lancet, 2004

Amélioration du dépistage: le test IFN- γ France

Etape 1-Stimulation de lymphocytes



Nil antigen Avian PPD Bovine PPD

1. Collecte du sang

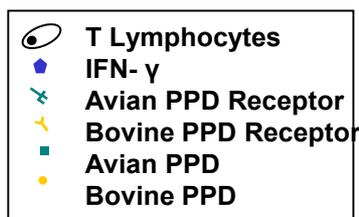
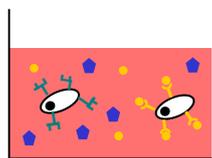
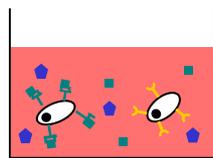
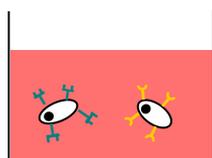
Un petit échantillon est collecté dans un tube avec héparine

2. Transport du tube

Les échantillons sont gardés à temp. amb. est transportés au lab. Dans les 8 heures post-collecte

3. Traitement du sang

Le sang est placé dans des plaques puits de culture cellulaire. Les lymphocytes T sont stimulés avec du PBS, PPDs aviaire y bovine a 37° C (16-24 hr).



4. Incubation

PBS (Sans Ag) ne stimule pas la production d'IFN- γ

lymphocyte T avec mémoire immunologique se lie à l'antigène du PPD et répond par la production d'IFN- γ

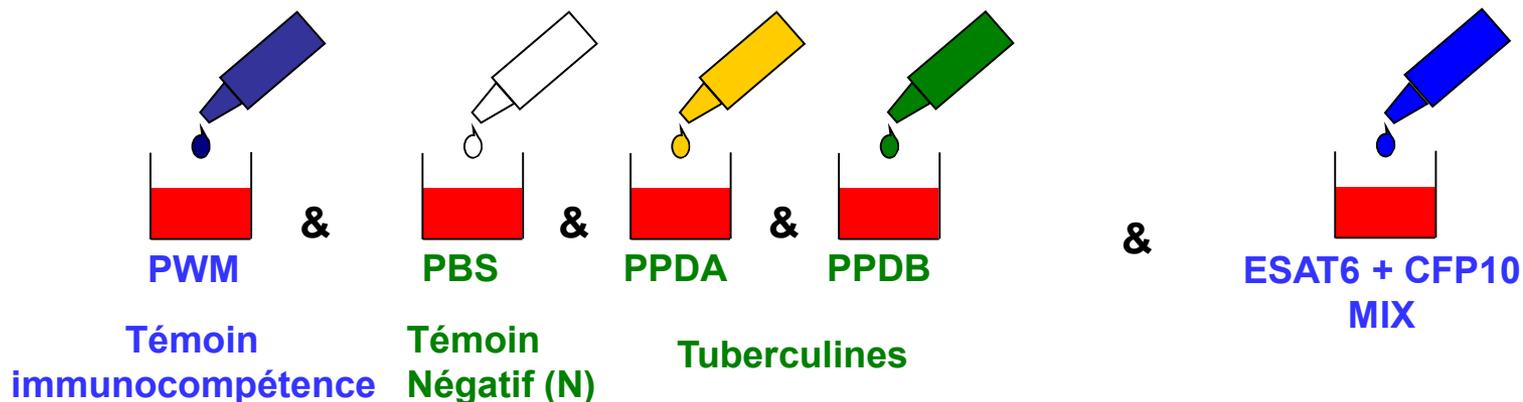
5. IFN- γ EIA (Etape 2)

Le plasma est transféré à des microplaques. La quantité d'IFN- γ produite est mesurée par EIA.

Etape 2 – Dosage d'IFN γ par la méthode ELISA

Amélioration du dépistage: le test IFN- γ France

3. Traitement sang et Incubation (37°C, 16-24h)

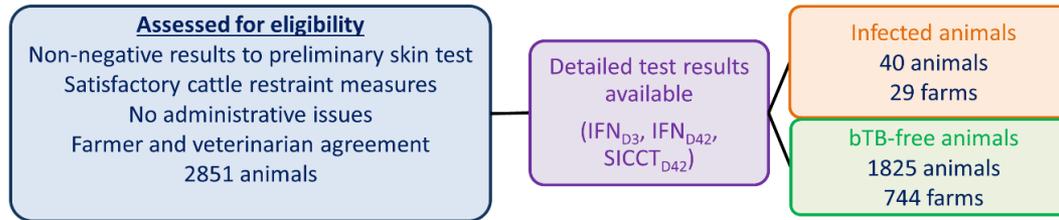


Résultats individuels		Résultat final du test IFN γ modifié
PPD	MIX	
Négatif	Négatif	NEGATIF
Positif	Positif	POSITIF
Positif	Négatif	Non conclusif
Négatif	Positif	

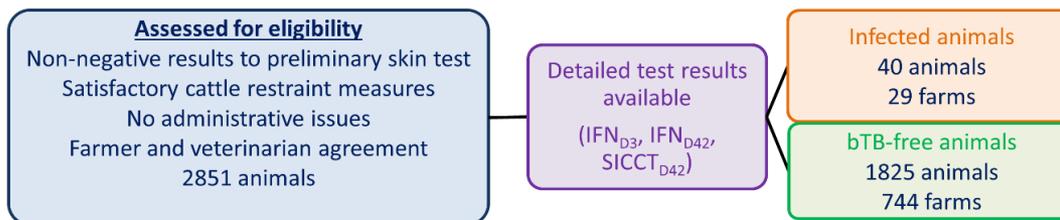
4. Prélèvement plasma surnageant
→ Estimation de la quantité d'IFN γ

Etape 2 – Dosage d'IFN γ par la méthode ELISA

Le test IFN γ France : protocole expérimental 2013-2015



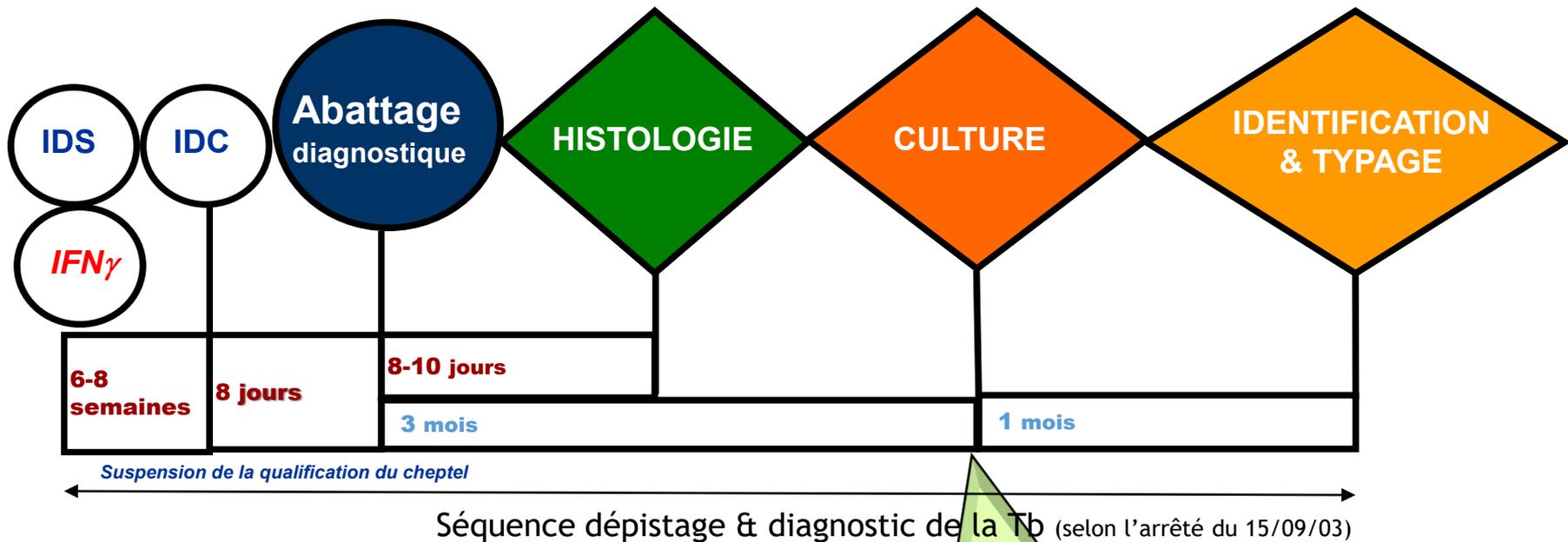
Le test IFN γ France : protocole expérimental 2013-2015



Se conditionnelle sur 40 anx. infectés; Sp conditionnelle sur 1825 anx. libres de bTB

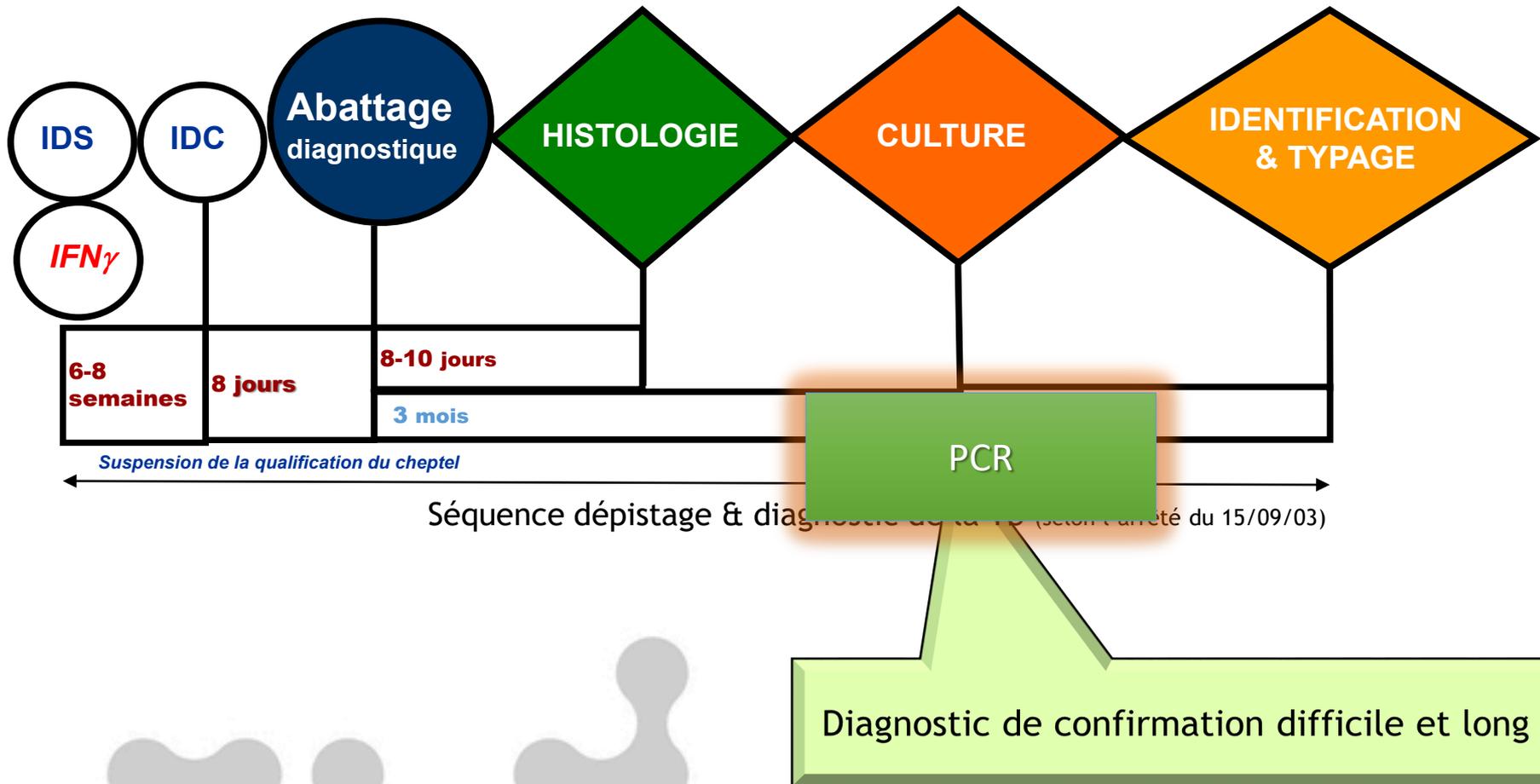
Test	Se conditionnelle (CI 95%)	Sp conditionnelle CI 95%
IDC _{J42}	45 % [30 %; 60 %]	89.15 % [87.72 %; 90.58 %]
IFN _{J3}	88 % [77 %; 98 %] (résultats pos. seulement)	82.47% [80.72%; 84.21%] (résultats nég. et non conclusifs)
	95 % [88 %; 100 %] (résultats pos. et non conclusifs)	46.08 % [43.80 %; 48.37 %] (résultats nég. seulement)
IFN _{J42}	85 % [74 %; 96 %] (résultats pos. seulement)	93.53 % [92.41%; 94.66%] (résultats nég. et non conclusifs)
	98 % [93 %; 100 %] (résultats pos. et non conclusifs)	60.71 % [58.47 %; 62.95 %] (résultats nég. seulement)

Amélioration du diagnostic: la PCR et le diagnostic moléculaire



Diagnostic de confirmation difficile et long

Amélioration du diagnostic: la PCR et le diagnostic moléculaire

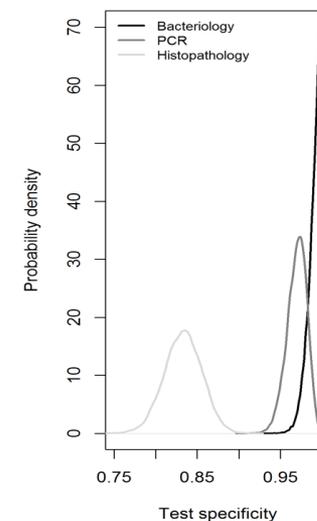
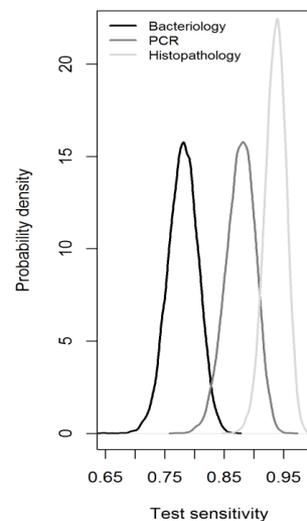


Amélioration du diagnostic: la PCR et le diagnostic moléculaire

Analysis 2 (+ lesions): 697 anx./358 cheptels suspects-infectés

2008-2012

Parameter	Mean	95% credible interval
Se_{culture}	78.1	[72.9 – 82.8]
Se_{PCR}	87.7	[82.5 – 92.3]
$Se_{\text{histology}}$	93.6	[89.9 – 96.9]
Sp_{culture}	99.1	[97.1 – 100]
Sp_{PCR}	97.0	[94.3 – 99.0]
$Sp_{\text{histology}}$	83.3	[78.7 – 87.6]



OPEN ACCESS Freely available online

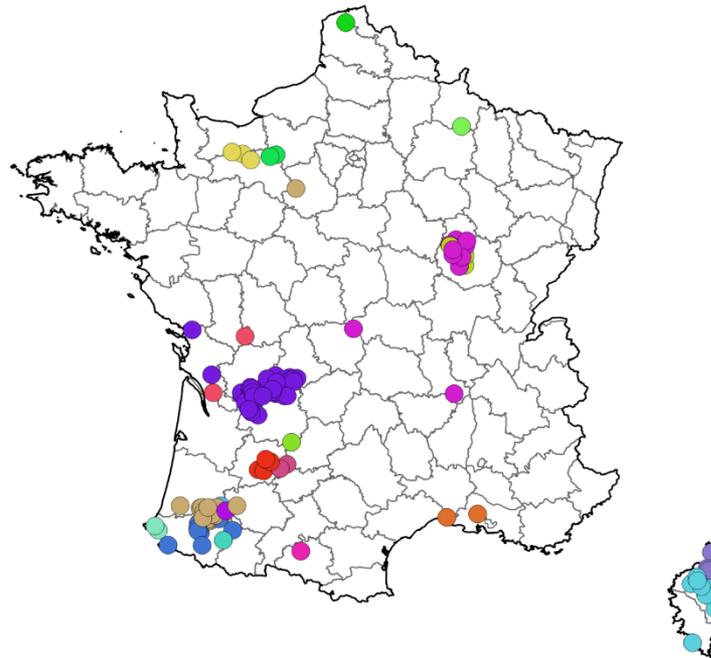
PLOS ONE

Estimation of Sensitivity and Specificity of Bacteriology, Histopathology and PCR for the Confirmatory Diagnosis of Bovine Tuberculosis Using Latent Class Analysis

Aurélie Courcoul^{1*}, Jean-Louis Moyen^{2*}, Laure Brugère², Sandy Faye², Sylvie Hénault³, Hélène Gares², Maria-Laura Boschioli^{3*}

Amélioration du diagnostic: la PCR et le diagnostic moléculaire

Possibilité de génotypage d'ADN de *M. bovis* : confirmation et données épidémiologiques en 48h



Types de souches de *M. bovis* qui ont pu être isolées et identifiées en 2015-2016

- | | | | |
|-----------------|-----------------|---------------|---------------|
| ● BCG [2] | ● BCG-Rodéo [2] | ● F023 [1] | ● GB35-14 [3] |
| ● BCG-08 [1] | ● F001 [10] | ● F041 [5] | ● GB35-21 [5] |
| ● BCG-21 [16] | ● F004 [1] | ● F070 [1] | ● SB0263 [1] |
| ● BCG-corse [3] | ● F005 [2] | ● GB21-47 [2] | ● SB0999 [1] |
| ● BCG-NAq [42] | ● F007 [22] | ● GB21-UK [2] | |
| ● F015 [9] | ● F023 [1] | ● GB35-09 [1] | |

Amélioration du diagnostic: la PCR et le diagnostic moléculaire

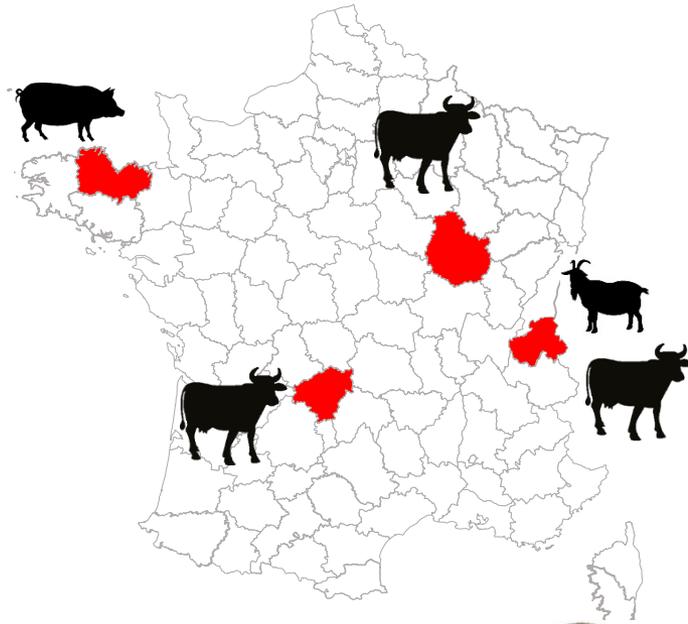
Possibilité de différentiation avec d'autres tuberculoses non réglementées



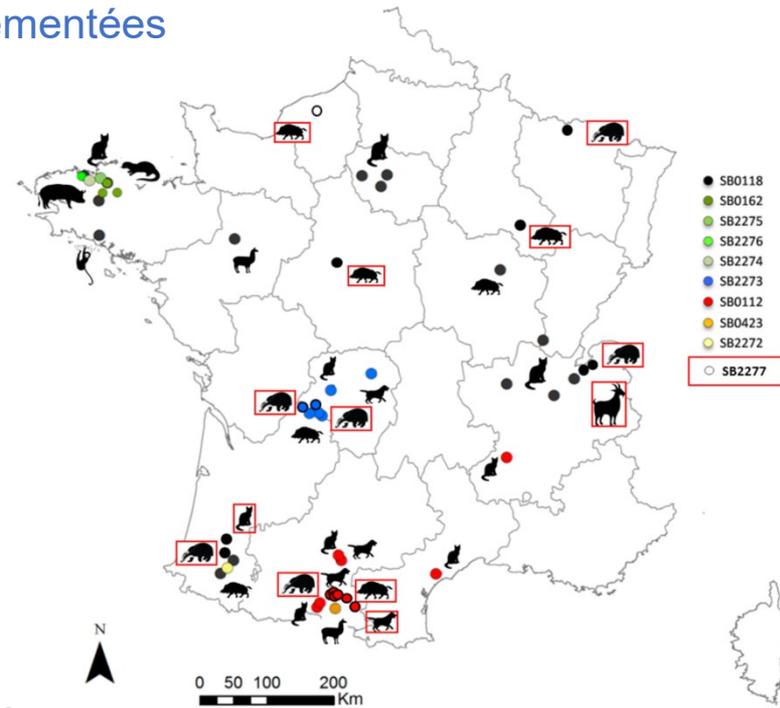
Mycobacterium microti

Amélioration du diagnostic: la PCR et le diagnostic moléculaire

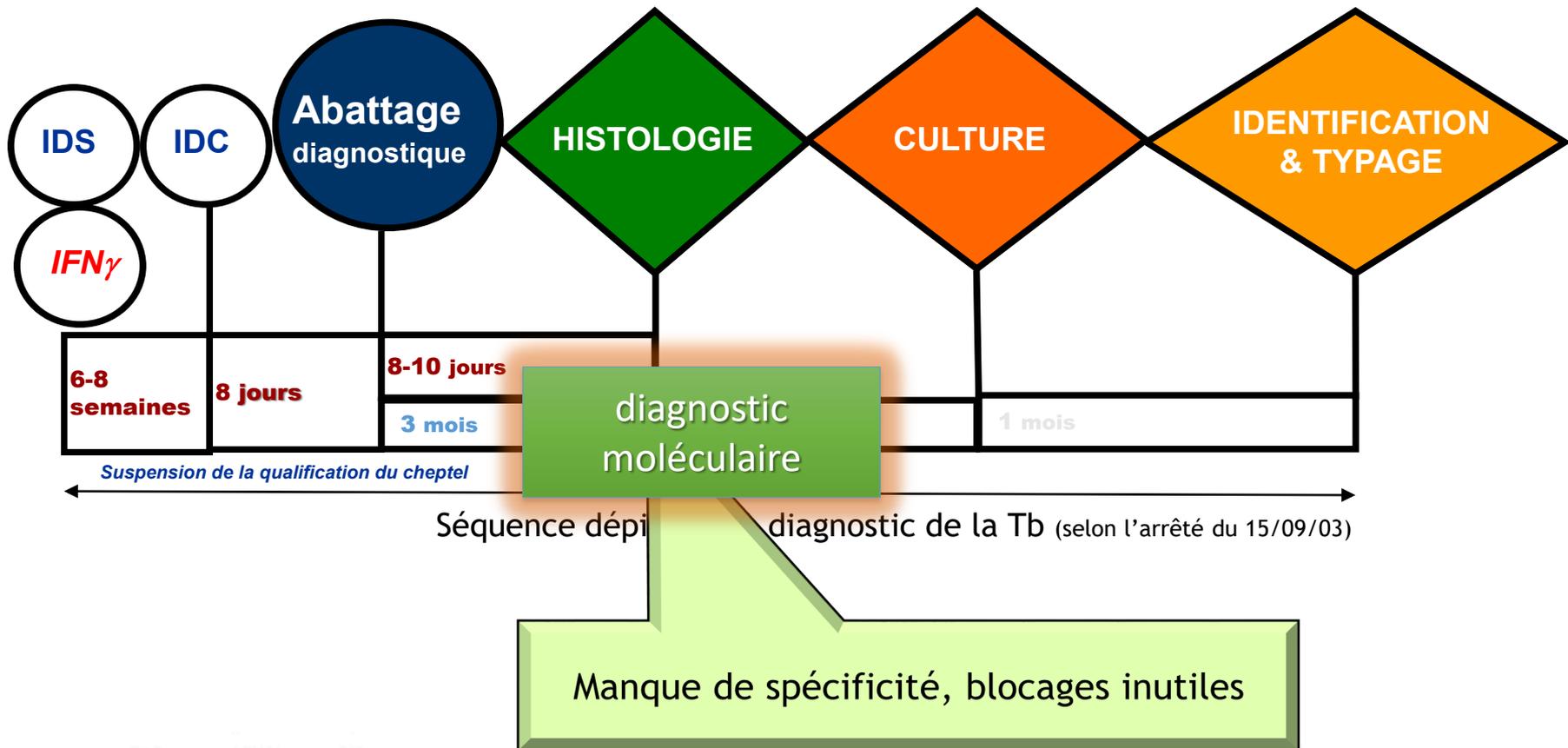
Possibilité de différenciation avec d'autres tuberculoses non réglementées



Mycobacterium microti



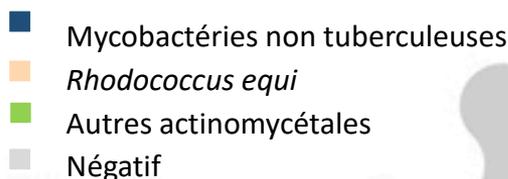
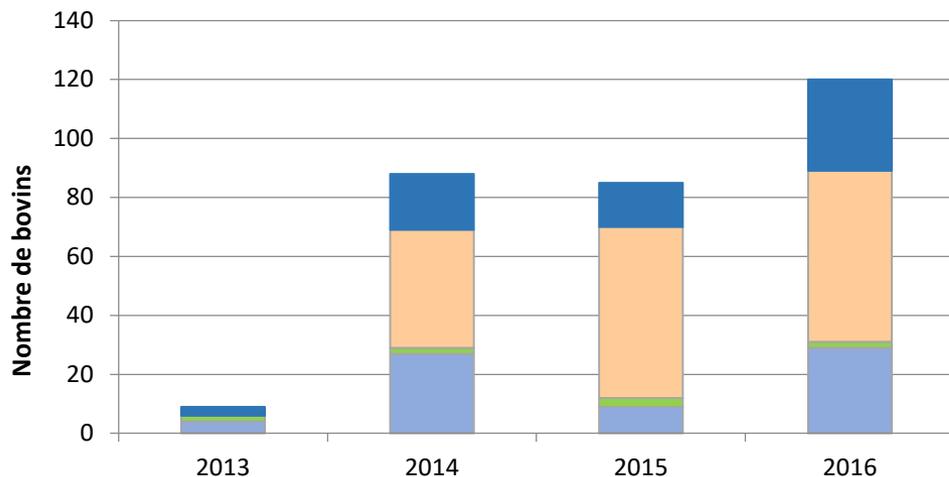
Amélioration du diagnostic: histologie Vs diagnostic moléculaire



Amélioration du diagnostic: histologie Vs diagnostic moléculaire

Caractérisation moléculaire des prélèvements **histo+/PCR-** pour identifier les organismes responsables de réactions aspécifiques

Résultats des expertises histo+/PCR-



Sur 292 bovins (2013-2016) :

- 68 NTM dont 27 *M. avium* complex
- 165 actinomycétales dont 155 *Rhodococcus equi*
- 70 négatifs

RESEARCH ARTICLE

Second line molecular diagnosis for bovine tuberculosis to improve diagnostic schemes

Lorraine Michelet¹, Krystal de Cruz¹, Claudine Karoui¹, Jennifer Tambosco¹, Jean-Louis Moyen², Sylvie Hénault¹, Maria Laura Boschioli^{1*}

PLOS ONE | <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207614> November 26, 2018

Amélioration du diagnostic: histologie Vs diagnostic moléculaire

Caractérisation moléculaire des prélèvements **histo+/PCR-** pour identifier les organismes responsables de réactions aspécifiques

100% des suspicions **histo+/PCR-** auraient pu être levées avec la méthode moléculaire du LNR :

- ✓ Sur **76% des suspicions** **histo+/PCR-** (222/292 bovins)
→ identification d'une autre bactérie
- ✓ Sur les 24% restants → bactériologie également négative
(et aucun autre animal bTB positif dans le cheptel)

279 cheptels bloqués inutilement

Surveillance et police sanitaire : des délais réduits

Les « nouveaux » tests :

✓ **PCR et diagnostic moléculaire :**

- diminue la durée de confirmation / infirmation des prélèvements post-mortem
- Suspensions en abattoir plus rapidement infirmées ou confirmées et gestion plus rapide (idem pour les issues de foyers)



Surveillance et police sanitaire : des délais réduits

Les « nouveaux » tests :

✓ **PCR et diagnostic moléculaire :**

- diminue la durée de confirmation / infirmation des prélèvements post-mortem
- Suspensions en abattoir plus rapidement infirmées ou confirmées et gestion plus rapide (idem pour les issues de foyers)

✓ **IFN- γ en série :**

- résultat du recontrôle en quelques jours versus 6 semaines,
 - permet d'affiner la suspicion (et de décider si abattage, levée suspicion ou attente recontrôle)
 - Permet de limiter les réactions anergiques au recontrôle à J42
 - Valeur de laboratoire objective : meilleure acceptabilité et visibilité de la suspicion
- 

Surveillance et police sanitaire : des délais réduits

Les « nouveaux » tests :

✓ **PCR et diagnostic moléculaire :**

- diminue la durée de confirmation / infirmation des prélèvements post-mortem
- Suspensions en abattoir plus rapidement infirmées ou confirmées et gestion plus rapide (idem pour les issues de foyers)

✓ **IFN- γ en série :**

- résultat du recontrôle en quelques jours versus 6 semaines,
- permet d'affiner la suspicion (et de décider si abattage, levée suspicion ou attente recontrôle)
- Permet de limiter les réactions anergiques au recontrôle à J42
- Valeur de laboratoire objective : meilleure acceptabilité et visibilité de la suspicion

⇒ **Réduction de la durée des APMS, réduction du délai de gestion des foyers**

⇒ **Améliore l'acceptabilité de la surveillance et des mesures de police sanitaire ?**



Vers des reconnaissances réglementaires internationales de ces avancées

- ✓ OIE : le Manuel intègre l'IFN γ dans les tests de dépistage de la tuberculose...
mais ne l'intègre pas encore dans les modalités de surveillance
Manuel OIE en révision néanmoins test difficilement standardisable
- ✓ Le LR européen pour la tuberculose endosse l'équivalence entre PCR et culture
Recommandations LRUE pour les textes de la LSA
- ✓ LSA : test dépistage et diagnostic **selon recommandations LRUE**
 - IDS
 - IDC
 - IFN γ

Ces tests peuvent être indifféremment utilisés dans le cadre de la qualification des cheptels **néanmoins besoin de reconnaissance de test français**

Des questions de recherche liées au dépistage/diagnostic toujours d'actualité

- ✓ Quelle est la sensibilité de l'abattage diagnostic ?
 - ✓ Comment maîtriser l'interférence des tests de dépistage avec la vaccination contre la paratuberculose ? **Test IFNg Esat-6/ CFP10 ... mais reconnaissance du test pour cet utilisation**
 - ✓ Comment dépister les autres animaux sensibles : sérologie, IDC, INFg ?
 - ✓ Quelles bactéries provoquent des réactions croisées? Comment reconnaître les sources d'exposition et les éviter ?
 - ✓ Quelles réponses immunitaires des animaux selon les souches de mycobactéries et la résistance des animaux ?
- 

Peut-être que vous aussi avez
des questions ?!



Merci de votre attention