



Maisons-Alfort, le 16 octobre 2009

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif au test ELISA sur lait de mélange pour le dépistage de la brucellose bovine

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

Rappel de la saisine :

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le vendredi 17 avril 2009 par Direction Générale de l'Alimentation (DGAl) d'une demande d'avis relatif au test ELISA sur lait de mélange pour le dépistage de la brucellose bovine. L'avis de l'Afssa est plus précisément sollicité sur les solutions permettant de pallier les difficultés dues à un manque de spécificité apparent de ce test, sur la pertinence de la modification du seuil de positivité de la méthode et/ou celle du diagramme décisionnel de l'annexe 3 de la note de service du 16 septembre 2008, afin de limiter le temps de blocage des exploitations placées sous arrêté préfectoral de mise sous surveillance (APMS).

Avis du Comité d'experts spécialisé « Santé animale »

Le Comité d'experts spécialisé « Santé animale » (CES SA), réuni les 16 juin, 8 juillet et 9 septembre 2009, formule l'avis suivant :

« Contexte et questions posées »

La situation sanitaire de la France en termes de brucellose des ruminants, bovine notamment, est excellente. Aucun cas de brucellose bovine, ovine ou caprine n'a été rapporté sur le territoire national depuis 2003. La France a été déclarée officiellement indemne de brucellose bovine en 2005 (Décision 2005/764/CE, ^[2]) et devrait l'être pour la brucellose ovine et caprine en 2010 (trois ans après l'arrêt de la vaccination en juin 2007).

Les mesures techniques et administratives relatives à la prophylaxie collective et à la police sanitaire de la brucellose des bovinés ont été redéfinies en conséquence dans un arrêté ministériel en date du 22 avril 2008, afin d'adapter les mesures de lutte à la situation épidémiologique très favorable de la France. Les modalités techniques d'application de cet arrêté ont été précisées dans la note de service DGAl/SDSPA/N° 2008-8242 du 16 septembre 2008.

Dans ce cadre, le Ring test (RT) ou épreuve de l'anneau, employé pour la surveillance des cheptels laitiers, a été remplacé par un test ELISA indirect (iELISA). Le test iELISA est en effet considéré comme le plus sensible et le plus spécifique pour la détection des anticorps dans un lait de mélange. C'est le test le plus utilisé dans l'Union Européenne pour la surveillance de la brucellose bovine sur le lait en zone indemne.

En cas de résultat positif, un second prélèvement est réalisé au terme d'un délai de 15 jours. La confirmation de la positivité entraîne la mise sous APMS de l'exploitation, ce qui a pour conséquence le blocage de la commercialisation des animaux, du lait cru ainsi que des produits dérivés. Des analyses individuelles sur prises de sang effectuées sur les bovinés de plus de 24 mois (épreuve à l'antigène tamponné [EAT] avec épreuve de fixation du complément [FC] sur les sérums positifs en EAT) sont alors réalisées afin de déterminer le statut réel du cheptel. Au cours de la première campagne de prophylaxie reposant sur cette nouvelle procédure, plusieurs départements ont signalé un nombre excessif de résultats positifs a priori non spécifiques (réactions sérologiques sur le lait faussement positives, RLFP) sur les laits de tank, avec des conséquences économiques non négligeables, en particulier dans les zones de production fromagère AOC.

Méthode d'expertise

L'expertise collective a été réalisée sur la base d'un rapport initial, rédigé par trois rapporteurs, qui a été présenté, discuté en séance et validé par le CES SA réuni les 16 juin, 8 juillet et 9 septembre 2009.

Elle s'est appuyée sur :

- Les documents fournis par la DGAI :
 - L'arrêté du 22 avril 2008 et la note de service du 16 septembre 2008,
 - Les résultats d'une enquête de la DGAI réalisée auprès des Directions départementales des services vétérinaires (DDSV) afin de recueillir les résultats des investigations complémentaires menées pour préciser le statut des cheptels ayant présenté deux tests iELISA sur lait positifs,
- Les résultats d'une enquête menée par le Laboratoire national de référence (LNR), consécutivement à la saisine de l'Afssa, auprès des Laboratoires interprofessionnels du lait (LIAL) afin d'établir le taux de prévalence de ces RLFP, le(s) secteur (s) géographique(s) et laboratoire(s) concerné(s) ainsi que les caractéristiques des résultats (niveau de positivité, évolution dans le temps). Cette enquête a été envoyée aux LIAL par le LNR le 4 juin 2009 par mail. La dernière réponse à l'enquête a été reçue le 21 juillet 2009.
 Cette enquête demandait aux LIAL :
 - La marque et le numéro de lot du coffret utilisé pour la campagne 2008-2009,
 - Les départements desservis par le laboratoire (avec les effectifs relatifs aux cheptels par département si possible),
 - Le nombre de cheptels testés en iELISA lait de mélange depuis le début de la campagne 2008-2009 (avec les proportions de cheptels par département si possible),
 - Parmi ceux-ci, le nombre de cheptels trouvés positifs ou douteux une première fois (avec les proportions de cheptels par département si possible),
 - Parmi ces derniers, le nombre de cheptels retrouvés positifs ou douteux une nouvelle fois 15 jours plus tard (avec les proportions de cheptels par département si possible),
 - Pour chaque cheptel positif ou douteux, les index de positivité retrouvés.
 - Les documents fournis par le producteur du coffret iELISA utilisé par l'ensemble des LIAL enquêtés (IDEXX/Pourquier),
 - Il était enfin demandé aux LIAL si, devant un nombre jugé trop important de réactions non négatives, le fournisseur de coffret avait été contacté et (si oui) si celui-ci avait conseillé une modification de la mise en œuvre de la technique (laquelle ?) et, le cas échéant, si cette modification s'était traduite par une diminution de ce nombre de résultats positifs ou douteux sur le reste de la campagne,
- Les échanges téléphoniques ou télématiques entre les rapporteurs et certains Laboratoires interprofessionnels laitiers ainsi que les Laboratoires vétérinaires départementaux (LVD) des départements les plus touchés,
- La consultation des publications scientifiques ou des rapports traitant du sujet et qui sont cités en référence.

Argumentaire

1 Contexte réglementaire européen et national

L'annexe C de la directive 64/432/CEE ^[2] décrit les méthodes de diagnostic de la brucellose bovine devant être utilisées pour la surveillance et le contrôle de cette maladie, pour l'établissement et le maintien du statut de troupeau officiellement indemne de brucellose ainsi que pour la certification nécessaire aux échanges intracommunautaires d'animaux de l'espèce bovine. Ce texte prévoit précisément les conditions de standardisation des coffrets iELISA pour les mélanges de lait.

Brièvement, ce texte impose une détectabilité minimale¹ des sérums standards internationaux par les coffrets iELISA (sérum étalon de référence international de l'OIE -OIEISS-, sérum étalon ELISA fortement positif de l'OIE -OIEELISA_{SPSS}-, sérum étalon ELISA faiblement positif de l'OIE -OIEELISA_{WPSS}-) mais n'impose pas de limite inférieure de détection². En d'autres termes, un niveau minimal d'anticorps détectable est exigé, mais les coffrets peuvent être plus sensibles, sans qu'une limite soit fixée.

Il prévoit également que :

- le test doit être en mesure de détecter la présence d'une infection chez un seul animal du groupe d'animaux dont des échantillons de lait constituent le mélange,
- la sensibilité diagnostique de l'ELISA doit être égale ou supérieure à celle de l'épreuve de l'anneau sur le lait compte tenu non seulement de la situation épidémiologique mais également des effectifs moyens ou élevés des élevages considérés,
- les tests ELISA peuvent être appliqués à un échantillon de lait prélevé sur le lait collecté dans une exploitation comptant au moins 30 % de vaches en période de lactation. Si cette méthode est utilisée, des mesures doivent être prises afin que les échantillons prélevés pour être examinés puissent être rapportés de manière indiscutable aux différents animaux dont provient le lait,
- tout test de confirmation doit être effectué sur des échantillons de sérum individuels.

Il prévoit aussi les tâches des laboratoires nationaux de référence :

- a) approbation des résultats des études de validation démontrant la fiabilité du test utilisé dans l'État membre,
- b) détermination du nombre maximal d'échantillons pouvant constituer un mélange dans les coffrets ELISA utilisés,
- c) étalonnage des étalons de travail,
- d) contrôles de la qualité de tous les lots de coffrets ELISA et d'antigènes utilisés dans l'État membre,
- e) application des recommandations du laboratoire communautaire de référence pour la brucellose et coopération avec ce dernier.

2 Etude des résultats de l'enquête diligentée par la DGAI auprès des DDSV et de l'enquête du LNR auprès des LIAL

2.1 Importance du problème et répartition géographique

Les résultats globaux des deux enquêtes menées auprès des DDSV et des LIAL sont indiqués dans le tableau 1.

Tableau 1 : Pourcentages des résultats positifs aux premier et deuxième tests ELISA lait

	Taux de réponse	Nombre de cheptels testés	Résultats positifs					
			Premier ELISA			Second ELISA		
			Nombre	Taux (mini-maxi)	IC 95 %	Nombre	Taux (mini-maxi)	IC 95 %
Enquête DGAI	73/98 DDSV	43 787	166	0,38 % (0,00-6,15)	[0,32-0,44]	72	0,16 % (0,00-4,51)	[0,13-0,21]
Enquête LNR	16/17 LIAL	70 251 (64 351*)	343*	0,53 % (0,09-4,85)	[0,48-0,59]	204	0,32 % (0-0,99)	[0,28-0,36]

* Données manquantes pour un laboratoire pour le premier ELISA

¹ La **détectabilité minimale** correspond à la quantité d'anticorps qui doit systématiquement donner un résultat positif dans le test

² La **limite inférieure de détection** correspond à la quantité d'anticorps qui ne doit pas donner un résultat positif dans le test

Etant donné le statut officiellement indemne de brucellose de la France et en l'absence à ce jour de foyer rapporté sur notre territoire depuis mi-2003, on peut considérer en ne prenant en compte que les chiffres de l'enquête LNR, quasi-exhaustive, que la spécificité du premier test peut être estimée à 99,47 % (IC 95 % : 99,41-99,52 %). Après réalisation du second test sur le lait, la spécificité du test peut être estimée à 99,68 % (IC 95 % : 99,64-99,72 %). Ce résultat apparaît très satisfaisant et conforme aux chiffres relevés dans la littérature avec ce type de test immuno-enzymatique (cf. tableau 2) ainsi qu'aux chiffres annoncés par les fournisseurs dans leur dossier de validation soumis pour agrément initialement au LNR**.

Tableau 2 : Valeurs de spécificité de l'iELISA sur lait de mélange obtenues par différents auteurs

Référence bibliographique	Valeur de spécificité de l'ELISA indirect sur lait de mélange
Nielsen et al., 1996 ^[10]	98,76 % (N= 6 238)
Vanzini et al., 1998 ^[20]	99,1 % (N= 2 119 laits individuels)
Vanzini et al., 2001 ^[21]	88,1 % (N=42)
Nielsen et al., 2001 ^[11]	100 % (N=2 974)
Rivera et al., 2003 ^[15]	97,6 % (N=766)

**Pour le coffret Pourquier [seul sur le marché français actuellement] : sur un échantillonnage de 1 425 laits de tank issus de cheptels indemnes, aucun ne se trouve dans la zone positive et seuls six s'approchent de la zone douteuse.

Ceci ne doit toutefois pas occulter les conséquences de résultats faussement positifs, même s'ils sont en nombre très limité.

Les prévalences les plus élevées de faux positifs (pourcentage de cheptels positifs à la seconde analyse iELISA, rapporté au nombre total de cheptels testés) se concentrent dans plusieurs zones (plus de 0,5 % de cheptels à résultats positifs après le second iELISA) :

- en Auvergne (Puy-de-Dôme et Cantal),
- en Limousin (Corrèze, Creuse et Haute-Vienne),
- dans l'Est de la France (Alsace, Moselle, Meurthe-et-Moselle et Vosges),
- dans les Savoies,
- dans la Mayenne, le Maine-et-Loire et les Deux-Sèvres.

Dans quelques départements à forte prévalence de résultats faussement positifs, la localisation des cheptels concernés (commune) a été investiguée. Leur répartition apparaît totalement aléatoire.

Depuis le démarrage de la campagne, le nombre de laits de mélange testés a été très variable d'un laboratoire à l'autre, allant de 171 (LVD 05) à 9 872 (LILLAB 35). Lorsqu'on rapporte le taux de faux positifs identifiés lors du second ELISA au nombre de laits testés par le laboratoire, il apparaît très clairement une association inverse (Figure 1), le laboratoire observant d'autant plus de résultats positifs qu'il a traité peu d'échantillons.

Lorsqu'on fait la même analyse par département, la tendance est beaucoup moins nette quant au lien entre taux de faux-positifs et nombre de cheptels testés (Figure 2) :

- 27 départements ont un taux nul (2 à 3 827 cheptels testés par département),
- 19 ont un taux inférieur à la moyenne de 0,27 % (443 à 4 680 cheptels testés par département) et,
- 25 ont un taux supérieur (67 à 3 669 cheptels testés par département).

Certes quelques départements ayant un taux élevé de faux positifs ont peu de cheptels soumis à analyse mais ce n'est pas systématique. Ainsi 21 parmi les 27 départements n'ayant aucun faux-positif ont moins de 1 000 cheptels soumis à analyse (989 cheptels testés en moyenne par département en France sur la campagne 2008-2009). Inversement certains départements, pour lesquels plus de 1 000 cheptels ont été testés (Maine-et-Loire, Mayenne, Haute-Savoie par

exemple), ont un taux relativement élevé de résultats positifs et d'autres, avec un très grand nombre de cheptels testés (plus de 3 000), comme ceux de l'Ouest (Côtes-d'Armor, Finistère, Ille-et-Vilaine, Manche) présentent un taux très faible de résultats positifs.

Pour les laboratoires desservant plusieurs départements, c'est presque toujours dans le département principal dont est originaire la majorité des laits testés par le LIAL correspondant que se rencontre le plus grand nombre de résultats positifs.

Il est donc probable qu'il y ait, d'une part, un effet laboratoire (qualité du résultat pouvant être liée à l'organisation et à l'expérience des équipes) et, d'autre part, un effet département (influence du nombre de cheptels testés, valeur prédictive du test dépendant de la prévalence des agents induisant des réactions croisées).

2.2 Profil des résultats obtenus dans les exploitations touchées

L'analyse plus précise des résultats des LIAL couplés avec ceux des examens sanguins de confirmation (Figure 3 à 5) n'a pas permis de mettre en évidence une corrélation entre la valeur E/P [E/P = indice ou pourcentage de positivité = (DO Ech* – DO TN / DO TP* – DO TN)** 100] de l'iELISA lait et :

- l'importance du mélange (nombre de bovins en lactation évalué à partir du nombre d'animaux soumis au test EAT) (Figure 3),
- le nombre de bovins testés individuellement et trouvés positifs en EAT (*) (Figure 4),
- le nombre de bovins présentant une FC positive (Figure 5).()

Le nombre de bovins trouvés positifs en EAT par cheptel dans les 24 exploitations concernées apparaît limité. Il n'est supérieur à deux bovins que dans seulement cinq cheptels.

(*) DO Ech : Densité Optique de l'Echantillon ; DO TN : Densité Optique du Témoin Négatif ; DO TP : Densité Optique du Témoin Positif

(**) Correction faite des données fournies par la DGAI, après consultation du laboratoire départemental de Meurthe-et-Moselle (un EAT positif dans le cheptel 54469104 et non 68, comme l'indiquait le fichier fourni)

2.3 Evolution dans le temps

Le taux de négativation entre les deux tests iELISA effectués sur le lait à un intervalle théorique de 15 jours est de 44,9 % (189 sur 343). D'une manière générale, la plupart des indices de positivité (E/P) diminuent entre J1 et J15 (Figure 6). Les pourcentages de croissance ou décroissance des E/P sont pratiquement équivalents (jusqu'à 200 %).

Le taux de non confirmation du second iELISA positif par les tests sérologiques individuels (EAT négatif) est de 67 % [IC 95 % : 55 – 77 %] (24 cheptels avec EAT positif sur 72 positifs en iELISA lait). Le pourcentage de cheptels non confirmés [négativité des tests sérologiques soit EAT toutes négatives ou bien FC négatives avec EAT positif(s)] est de 79,4 % (14 confirmés sur 68 résultats disponibles) [IC 95 % : 67,9 – 88,3 %].

En résumé, le problème observé de réactions positives par excès en iELISA sur mélange de lait bovin ne concerne qu'un nombre limité d'exploitations et de secteurs géographiques, sans qu'il y ait de lien entre le nombre de cas et la densité en élevages laitiers ou la taille du cheptel. Une enquête succincte réalisée auprès des LVD des dix principaux départements concernés n'a pas permis de mettre en évidence un phénomène similaire pour les analyses sur sérums de bovins. Le résultat positif initial est confirmé par un second test ELISA dans plus de la moitié des cas, ce qui entraîne un nombre non négligeable de mises sous APMS des exploitations, avec des conséquences importantes en production laitière (suspension de la collecte ou de la commercialisation, obligation de pasteurisation avec difficultés de transformation et modifications organoleptiques des produits fabriqués).

3 Hypothèses sur les origines potentielles des résultats obtenus

Les réactions considérées comme faussement positives peuvent résulter :

- d'un problème lié à un lot de fabrication de coffret d'iELISA lait,
- de problèmes techniques lors de la réalisation de l'analyse,

- d'un défaut de spécificité lié à des communautés antigéniques entre *Brucella* et d'autres agents infectieux,
- d'infections à *Brucella* provenant de la faune sauvage (lièvres ou suidés).

3.1 Lot de fabrication d'iELISA lait

Tous les LIAL ayant répondu à l'enquête (soit tous sauf un) utilisent un coffret provenant du même fournisseur (Pourquier ELISA Brucellose Bovine Lait Monocupule). Un seul lot (n° 757 – ou 757 B, selon la présentation de deux ou dix plaques) a été très largement employé. Ainsi que le prévoit la réglementation nationale et européenne, ce lot a fait l'objet d'un contrôle officiel avec résultat favorable par le LNR avant mise sur le marché.

A cet égard, il est important de rappeler qu'outre des exigences en terme de répétabilité intra-plaques et de sensibilité et spécificité sur un panel de sérums de référence, une détectabilité minimale du sérum standard, la détection systématique d'une dilution déterminée du sérum standard (standard national aligné sur le sérum international OIEELISA_{SPSS}) est exigée (détectabilité minimale).. En revanche, aucune limite inférieure en termes de détectabilité n'est imposée par la réglementation européenne (ni par la norme AFNOR correspondante U 47-308).

Cela étant, les coffrets circulant en France présentent une détectabilité limitée (égale ou moins poussée) par rapport à ceux utilisés dans le reste de l'Union européenne (coffrets britannique, italien, néerlandais et suédois - données Laboratoire communautaire de référence brucellose (LCR Brucellose).

3.2 Modalités de réalisation de la technique iELISA

Le lait est une matrice très particulière dont la concentration en lipides peut être très variable. Un taux élevé de matières grasses est observé avec certaines races (Normande, Pie Rouge des Plaines, Jersiaise) ainsi que lors de l'allongement de la durée de la lactation. Cette dernière pratique est en développement actuellement, [probablement en raison de l'augmentation des quotas accordés aux exploitations]. Ces matières grasses ont tendance à se coller sur les parois des cupules réactives et la qualité des rinçages opérés est alors un point fondamental, même si les liquides utilisés pour cette opération contiennent généralement du Tween (pouvoir détergent). Il est important qu'aucun reliquat de lipides ne persiste, afin d'éviter des accrochages non spécifiques, notamment du conjugué.

Ainsi, à la suite de la mise en place de l'iELISA brucellose dans certains LIAL et la survenue d'un grand nombre de résultats positifs, le fournisseur a conseillé aux laboratoires de prélever l'échantillon en dessous de la couche de graisse du lait (ou de l'écraimer) et de maintenir un temps de contact de la solution de lavage avec les cupules d'au moins deux à trois minutes par lavage. Ceci est précisé dans la notice d'utilisation, mais mériterait sans doute d'être davantage souligné.

Il est à noter que d'autres fournisseurs prévoient une centrifugation préalable des échantillons pour éliminer le maximum de crème dans l'échantillon testé avec leur coffretELISA (données LCR brucellose).

L'hypothèse d'un effet « race » peut être éliminée : les RLFP ne sont pas observées dans les régions où se trouvent les races produisant les laits avec le plus haut taux butyreux (Normandie, Bretagne).

Une enquête rapide menée au sein de quelques laboratoires effectuant des analyses sur le lait a permis de constater l'application de mesures à même de réduire les risques de souillure des cupules par les lipides.

Cependant, les données fournies par le producteur du coffret utilisé en France (test de reproductibilité d'un lait positif en fonction du type de lavage) montrent un coefficient de variation plus important lors de l'emploi d'un laveur de plaque (8 %) par rapport au lavage manuel (2,1 %).

Il est donc utile de rappeler :

- l'importance de la réalisation de l'analyse avec un lait correctement écrémé (par décantation ou centrifugation), en particulier lors d'emploi d'automates de pipetage,
- le respect du nombre de lavages préconisés, avec de préférence l'insertion d'un temps de contact avec le liquide de lavage de deux ou trois minutes minimum,

- l'intérêt d'un contrôle visuel de la plaque réactive à la fin du premier cycle de lavages et le rajout éventuel de lavages supplémentaires en cas de persistance de traces, surtout lors de l'emploi d'un automate.

3.3 Défaut de spécificité du test iELISA (croisements antigéniques)

Durant la campagne de prophylaxie 1991-1992, un certain nombre de départements ont été confrontés à un nombre anormalement élevé de réactions sérologiques faussement positives (RSFP)^[1], en l'absence de toute situation à risque au plan épidémiologique. Ces RSFP, dont la prévalence est très variable d'une année à l'autre et d'une région à l'autre, qui sont identifiées dans de nombreux pays européens et qui concernent tant les bovins que les ovins, caprins et porcins, sont dues à l'existence de communautés antigéniques étroites entre *Brucella* et *Yersinia enterocolitica* O:9 (même structure du lipopolysaccharide LPS)^[4, 5, 6, 18].

D'autres communautés antigéniques ont été également signalées entre *Brucella* et *E. coli* O 157:H7, *Francisella tularensis* ou encore certaines salmonelles, mais elles sont sans conséquence sur les tests de dépistage employés actuellement.

L'antigène utilisé pour les coffrets iELISA disponibles sur le marché français est un LPS entier. Il est certain que, si leur titre sérique est important, une partie au moins des anticorps non spécifiques de type IgG passent du sang dans le lait.

Yersinia enterocolitica O:9 étant présent dans l'environnement des bovins et parfois porté au moins temporairement par ces derniers dans l'intestin, on comprend pour quelles raisons un petit nombre de réactions non spécifiques peuvent être constatées, y compris sur le lait^[4, 13].

L'hypothèse de réactions croisées est donc tout à fait plausible pour expliquer les observations faites cet hiver sur les analyses de lait.

Le profil des examens sériques dans les cheptels concernés va d'ailleurs dans ce sens : le nombre d'EAT positives constatées est généralement peu élevé (majoritairement un ou deux animaux), ce qui correspond à la situation qui est observée depuis 1991-1992 dans les cheptels allaitants^[1, 4-6, 13, 14].

Pour autant, après enquête auprès des LVD, il n'a pas été constaté d'augmentation particulière du nombre de sérologies « atypiques » RSFP durant cette campagne 2008–2009 dans les élevages suivis par sérologie sur le sang, qu'il s'agisse de suivis par iELISA (mélange de 10) ou par EAT individuelle. Cette apparente contradiction peut s'expliquer par un niveau de détectabilité plus bas des tests sur lait ou/et par le fait que les analyses sur sérums ne portent que sur 20 % des animaux de plus de 24 mois du cheptel (alors que l'analyse sur lait de mélange concerne tous les adultes en lactation et donc, probablement, en moyenne, plus d'animaux sujets aux RSFP^[12]). Le nombre d'animaux présentant des réactions croisées étant généralement très faible, la probabilité de ne pas les détecter sur un échantillon limité d'individus est, en effet, élevée (c'est d'ailleurs pour cette raison — limiter les RSFP observées —, que la surveillance en territoire officiellement indemne porte sur un échantillon limité d'animaux par troupeau).

3.4 Infections dues à *Brucella* provenant de la faune sauvage

Bien que cette hypothèse soit théoriquement recevable, la probabilité d'infection de bovins, voire d'ovins ou de caprins par *B. suis* biovar 2 est totalement liée à la probabilité d'exposition à cette bactérie, dont le réservoir est constitué en France par les sangliers (très forts taux d'infection dans certaines régions) et qui peut contaminer le lièvre (dont on sait qu'il est sensible mais dont on ne sait pas s'il joue un réel rôle de réservoir). Or, compte tenu des habitudes des sangliers, d'une part, et des ruminants domestiques, d'autre part, les contacts étroits permettant la transmission entre les deux types d'animaux sont a priori rarissimes. A cet égard, à ce jour, *B. suis* biovar 2 n'a été isolé qu'à deux reprises à partir de ruminants en France (un bovin en 2000 et un ovin en 2009 pour lesquels une exposition rapprochée à des sangliers a été rapportée – données LNR) alors qu'une partie importante des ovins ou caprins mais aussi des bovins détectés positifs en sérologie brucellose de manière prolongée font l'objet d'un abattage diagnostique systématique avec mise en culture de ganglions lymphatiques pour recherche de *Brucella*. D'autre part, dans le cas d'une réaction spécifique, après infection expérimentale de bovins par *B. suis* biovar 2, il n'a pas été observé de « négativation » à une fréquence aussi importante sur base d'un suivi sérologique à l'aide d'un test iELISA^[6]. Aucun autre isolement de *B. suis* biovar 2 chez les ruminants domestiques ou sauvages n'est enfin rapporté dans la littérature.

L'infection par *B. suis* biovar 2 n'est ainsi pas considérée aujourd'hui comme une source probable de RSFP chez les ruminants.

En résumé, l'origine la plus probable des problèmes constatés avec le test iELISA réalisé sur lait de tank est l'existence de réactions croisées liées aux communautés antigéniques entre *Brucella* et *Yersinia enterocolitica* O:9. On ne peut toutefois pas exclure la possibilité d'incidents dans la réalisation proprement dite de l'analyse, en raison de la nature de la matrice testée.

4 Etude des différentes solutions envisageables

Plusieurs possibilités peuvent être envisagées pour tenter d'apporter une solution lorsque l'on est confronté à des problèmes de spécificité.

4.1 La recherche directe de l'agent (*Brucella*)

Cette recherche pourrait être effectuée, par culture ou par PCR, sur le second prélèvement de lait de tank positif en iELISA, afin de gagner du temps par rapport au schéma actuellement en vigueur (bactériologie sur lait individuel d'une partie des animaux seulement, après la réalisation des tests sérologiques individuels).

Le risque d'un résultat faussement négatif sur un prélèvement de mélange n'est cependant pas négligeable. L'excrétion dans le lait des *Brucella* est inconstante chez les bovins notamment en l'absence de signes cliniques (avortement)^[7, 17, 19]. Elle peut, en outre, être d'un faible niveau et donc détectable de manière aléatoire, en particulier par la culture. La PCR pourrait constituer une alternative intéressante en raison d'une détectabilité théoriquement supérieure à celle de l'isolement bactérien. En fait, la sensibilité de la PCR sur le lait n'est que de 87,5 % par rapport à la culture, probablement en raison de la présence de substances inhibitrices de la Taq polymérase^[16]. En outre, la technique PCR n'est pas validée sur lait de tank et n'est pas encore disponible en routine dans les laboratoires d'analyses.

4.2 L'augmentation de l'intervalle entre les deux tests ELISA lait

Seul un des LIAL enquêtés a précisé les dates exactes de réalisation des deux prélèvements soumis aux tests ELISA. Sur cet échantillon restreint (57 cheptels), il n'a pas pu être mis en évidence de corrélation entre la durée réelle de l'intervalle entre les deux prélèvements (en moyenne 25 jours) et la probabilité de « négativation ».

Certains cheptels, dont le résultat était voisin du seuil de positivité (55 %), restent à ce niveau, d'autres très fortement positifs (jusqu'à 300 %), se négativent en moins de trois semaines.

Il n'a donc pas été possible, avec les données dont nous disposons, d'évaluer la dynamique des RLFP. Cette information serait pourtant utile pour tenter de fixer au mieux un intervalle optimal entre les deux tests iELISA.

Si l'on se réfère à ce qui a été constaté avec les RSFP^[1, 13, 14], il paraît raisonnable de fixer un délai de six à huit semaines versus les 15 jours appliqués actuellement. Cet intervalle de 15 jours a probablement été choisi par analogie avec ce qui se pratiquait lors de l'utilisation du Ring Test (RT).

Cependant, les réactions faussement positives avec le RT ne sont généralement pas liées à la présence d'anticorps non spécifiques et ont donc une origine très différente de ce qui est évoqué avec le test iELISA (présence de lait colostrale, de lait de mammité ou de lait de vache en cours de tarissement). On comprend alors aisément que le renouvellement du test quinze jours plus tard s'accompagne, dans la très grande majorité des cas, d'une « négativation ».

Avec le test iELISA, la cause la plus probable d'une réaction faussement positive est la présence d'anticorps non spécifiques. Le test immuno-enzymatique étant beaucoup plus sensible, la probabilité que la situation reste inchangée (test toujours positif) lors d'une seconde analyse seulement une quinzaine de jours plus tard, est élevée. Augmenter le délai entre les deux tests iELISA pour éliminer des réactions non spécifiques est une pratique appliquée couramment, et généralement avec succès, avec les autres tests de type immuno-enzymatique (exemple du test IBR). Les anticorps non spécifiques disparaissent plus rapidement que les anticorps spécifiques. L'inconvénient de cette solution est le risque d'une détection tardive d'un vrai foyer de brucellose, pour peu que l'évènement se produise à une période où aucune vache n'est en gestation (absence d'avortement).

Mais on ne peut occulter le fait qu'aujourd'hui la probabilité de survenue d'un vrai foyer de brucellose bovine est quasi-nulle, compte tenu du statut indemne actuel du territoire et des principaux pays voisins, tant chez les bovins que chez les ovins-caprins, seules sources historiques

avérées de brucellose bovine. Seule, en effet, l'importation d'un bovin à partir d'une zone infectée – Espagne, Grèce, Italie du Sud, Portugal, pour ce qui concerne l'Union européenne (UE) – constitue un réel risque, mais elle n'a qu'une probabilité très faible de survenir et elle est vérifiable par le contrôle des mouvements d'animaux dans l'exploitation concernée.

4.3 La modification du seuil de positivité (augmentation)

Toute augmentation du seuil de positivité en vue d'éliminer des réactions non spécifiques aurait pour conséquence une baisse de la sensibilité.

Or, c'est un des critères majeurs qui a conduit au remplacement du RT par l'ELISA lait de mélange.

De plus, les résultats quantitatifs (Indice de positivité ou E/P) observés pour les RLFP sont souvent très au dessus du seuil de positivité défini par le fournisseur (55 % avec une zone douteuse entre 45 et 55 %). Les données collectées vont de 56 à plus de 363 %. Remonter le seuil de positivité à 80 % ne permettrait de « négativer » qu'à peine la moitié des réactions considérées comme faussement positives. Ceci ne pourrait être obtenu qu'au prix d'une baisse probable de la sensibilité et du risque que le coffret ne réponde plus aux exigences de détectabilité minimale imposées au niveau européen. Cependant, en l'absence de courbes ROC pour le test actuellement sur le marché, il n'est pas possible de rechercher un nouveau seuil qui permettrait d'obtenir un compromis satisfaisant entre gain optimal de spécificité et perte minimale de sensibilité. Compte tenu néanmoins des résultats observés depuis plusieurs années lors du contrôle des coffrets soumis au LNR, il apparaît que des résultats dans la zone douteuse pourraient sans risque de perte de sensibilité diagnostique être assimilés à des résultats négatifs.

4.4 La confirmation ou l'infirmité à l'aide d'un autre test de diagnostic indirect réalisé sur lait

Pour cela, il est souhaitable que le test ou la technique retenu(e) :

- ait une spécificité supérieure grâce à l'emploi, par exemple, d'un antigène différent ou grâce à une conception différente, ou,
- ne présente pas de défaut de spécificité lié aux mêmes causes.

Un gain de spécificité peut être envisagé en employant un autre antigène que le LPS ou bien en utilisant un ELISA de conception différente.

A notre connaissance, il n'existe pas de test le dépistage de la Brucellose sur le lait utilisant un antigène autre que le LPS et disposant des mêmes niveaux combinés de sensibilité et de spécificité que l'ELISA indirect ^[6, 8, 13].

Des résultats faussement positifs sont constatés régulièrement avec le Ring-Test ^[3]. Ils sont essentiellement liés à la présence de colostrum et/ou de lait de mammite et/ou provenant de vaches en fin de lactation ou encore traitées aux prostaglandines et surviennent plus volontiers sur des laits de petit mélange. La présence d'anticorps non spécifiques n'intervient que très peu, comme en témoignent les observations faites lors des épisodes de RSFP en 1991-1992. A l'époque, il n'avait pas été constaté d'augmentation du taux de faux positifs sur les laits ^[1]. Le faible nombre d'animaux présentant une RSFP (un ou deux par élevage), la faible teneur en anticorps non spécifiques dans le lait, ainsi que l'effet de dilution dans le lait de tank, expliquent en grande partie ce constat.

Si les réactions croisées sont bien à l'origine des résultats faussement positifs constatés sur le lait durant la campagne de prophylaxie qui vient de s'achever, la sensibilité inférieure du RT par rapport à l'ELISA (environ 20 fois moins selon ^[6]) peut alors être mise à profit. Les laits positifs en ELISA ont en effet une forte probabilité d'être négatifs en RT, sauf s'il proviennent d'animaux réellement infectés de brucellose. Dans une exploitation infectée, le risque d'un résultat faussement négatif avec le test de l'anneau en raison de sa plus faible sensibilité peut être minimisé par une réalisation du RT seulement sur le second prélèvement de lait positif en iELISA. Toutefois, le test immuno-enzymatique pouvant être positif jusqu'à six mois avant le RT ^[8], il apparaît nécessaire de mener en parallèle une enquête épidémiologique, afin de vérifier l'absence de facteurs de risque et/ou de signes cliniques. Au besoin, il peut être envisagé de procéder à des analyses dans les exploitations en lien épidémiologique avec l'exploitation suspecte. Le risque de « passer à côté » d'une brucellose peut être largement minimisé par un suivi de l'exploitation sur le lait de tank (iELISA et RT), par précaution.

Quelques analyses ont été effectuées avec le test iELISA sur des laits présentant un RT faussement positif (Données IDEXX/Pourquier). Sur les 454 laits testés, 19 (4,2 %) se sont révélés positifs également en iELISA. Il faut donc s'attendre à ce que, dans un faible nombre de cas, le RT donne un résultat similaire au test immuno-enzymatique.

La réalisation d'un RT ne devrait pas poser de problème de mise en application sur le plan pratique. En effet, dans le cadre de la détection des inhibiteurs, la très grande majorité des LIAL récupèrent un échantillon de lait à chaque collecte de chaque élevage. Il n'y a donc aucune difficulté particulière à réaliser un RT sur un échantillon frais, très rapidement après le constat de la positivité du second iELISA.

Réglementairement, rien ne s'oppose à l'emploi du RT, même s'il ne fait plus partie nominativement de la liste des méthodes préconisées. L'alinéa 4 de l'article 11 de l'arrêté du 22 avril 2008 permet en effet le recours possible à toute autre méthode autorisée par le ministère chargé de l'agriculture. Néanmoins il sera souhaitable de restreindre son emploi à cet objectif de confirmation/infirmité de l'iELISA, afin d'éviter la tentation d'un remplacement systématique de l'ELISA par le RT, en raison du coût beaucoup plus faible de ce dernier.

Il existe néanmoins un frein à l'utilisation du RT qui est la disponibilité de l'antigène. Cet antigène n'est plus produit en France et est peu disponible au plan européen. Le LNR a néanmoins la possibilité d'en obtenir en faible quantité. Ce test pourrait donc être réalisé par le LNR, si nécessaire, les enquêtes montrant par ailleurs que ce re-contrôle concernerait un nombre limité d'échantillons (200 à 300).

4.5 La confirmation ou infirmité de l'iELISA lait à l'aide d'un autre test de diagnostic indirect réalisé sur sérum

La procédure actuelle prévoit déjà cette possibilité, mais l'analyse des résultats indique que ce n'est pas la solution à retenir. Un ou plusieurs individus positifs en EAT et FC sont retrouvés dans près de 30 % des cheptels contrôlés par sérologie à la suite d'un second test iELISA positif sur le lait. Ce constat n'est pas surprenant dans la mesure où ce sont, selon toute vraisemblance, les mêmes anticorps non spécifiques qui sont à l'origine des RLFP et des RSFP. La mise sous APMS seulement après constat d'EAT positifs et non plus dès l'obtention du second iELISA lait positif (première proposition du courrier du 11 juin 2009) est une solution envisageable mais qui est loin d'être suffisante au regard des conséquences économiques que génèrent ces APMS. Un nombre non négligeable d'exploitations resteraient en effet bloquées pour une suspicion de brucellose d'autant moins justifiée que la France est officiellement indemne de brucellose et que la détection d'éventuels foyers est plus liée à la surveillance renforcée des avortements qu'au contrôle annuel des cheptels par sérologie sur laits de mélange.

4.6 L'emploi de tests permettant d'objectiver une réaction croisée (exemple ELISA Yersinia ou autre)

Si théoriquement cette solution apparaît particulièrement élégante, elle ne peut être retenue que si on a la certitude que la communauté antigénique est bien à l'origine du problème et si l'on dispose des outils adéquats. Ce n'est pas le cas à l'heure actuelle^[6].

En résumé, de toutes les solutions qui peuvent être proposées face au défaut de spécificité de l'ELISA sur lait de mélange, la plus cohérente consiste en l'augmentation du délai entre les deux ELISA sur lait de mélange et en l'utilisation du RT en confirmation. Il doit être pratiqué après un second prélèvement positif en ELISA et être accompagné d'une enquête épidémiologique permettant de statuer sur les facteurs de risque d'un foyer réel de brucellose.

Conclusions et recommandations

Considérant,

- *L'absence de brucellose bovine, ovine et caprine en France depuis 2003,*
- *Le statut Officiellement indemne de la France vis-à-vis de la brucellose bovine depuis 2005,*
- *L'absence de brucellose bovine, ovine et caprine dans les principaux pays membres de l'UE (ou leurs régions) limitrophes de la France ou depuis lesquels la France importe des bovins,*
- *La très faible prévalence des défauts de spécificité constatés avec le test ELISA indirect sur lait durant cette première campagne d'utilisation,*
- *Que le taux de « négativation » en ELISA indirect constaté cette année avec un intervalle (théorique) de 15 jours est de près de 45 %,*
- *Que le test immuno-enzymatique peut permettre la détection d'une infection brucellique plus précocement que l'épreuve de l'anneau,*
- *Le caractère particulier du lait comme matrice en raison de sa teneur importante en matières grasses,*
- *Le fait que les résultats faussement positifs ont fréquemment une intensité très nettement au-dessus des seuils de positivité fixés par les producteurs des tests, en conformité avec les exigences réglementaires européennes et les normes nationales,*
- *La très forte probabilité que ces résultats faussement positifs sur lait soient dus le plus souvent à des réactions croisées, qui s'observent aussi bien avec le lait qu'avec les sérums, et la difficulté qui en découle de lever le doute par des examens sérologiques individuels avec pour conséquence un maintien de l'exploitation sous APMS,*
- *Les conséquences économiques très préjudiciables de cette situation administrative de blocage pour les exploitations concernées, en particulier en zone de productions au lait cru,*

Le CES SA recommande

- *D'indiquer ou de rappeler clairement sur les notices des coffrets ELISA lait utilisés par les laboratoires agréés l'importance d'une réalisation soignée des lavages, et du contrôle de leur efficacité lors de la mise en œuvre de tests ELISA sur le lait, de manière à réduire, autant que possible, la part des réactions non spécifiques liées à un défaut dans la mise en œuvre du test,*
- *De maintenir la procédure de confirmation du premier ELISA positif par la réalisation d'un nouveau test ELISA sur un nouveau prélèvement de lait, mais d'allonger à six à huit semaines la période de temps requise pour réaliser un second ELISA lors de l'observation d'un premier résultat positif, sauf sur décision du DDSV en cas de situation à risque (cheptel ou zone en lien épidémiologique avec un foyer ou un cas avéré de brucellose bovine),*
- *De ne pas modifier le seuil de positivité des tests ELISA actuellement disponibles sur le marché français, mais de ne plus considérer les résultats « douteux » comme positifs, quitte à ce que ce type de résultat fasse l'objet d'un suivi dans le temps (six à huit semaines plus tard par exemple) de manière à vérifier l'absence d'apparition de résultats positifs,*

- *En cas de positivité des deux tests ELISA successifs sur lait réalisés dans les conditions ci-dessus :*
 - *qu'un échantillon de lait de mélange de l'exploitation concernée soit transmis au LNR, sans délai et dans les conditions appropriées, pour analyses complémentaires, incluant le cas échéant la réalisation d'un ring-test, et avis,*
 - *qu'une enquête épidémiologique soit diligentée par la DDSV de manière à rechercher la présence de signes cliniques évocateurs de brucellose ou l'existence de facteurs de risque tels que l'introduction d'animaux en provenance de pays à risque ou l'existence d'une autre source notable de Brucella, issue de la faune sauvage notamment,*
- *De ne recourir à la réalisation de tests sérologiques individuels sur les bovins de plus de 24 mois du cheptel, prévus actuellement dans l'arbre décisionnel de la note de service DGAL/SDSPA/N° 2008-8242 du 16 septembre 2008, que sur avis du LNR au terme de ses investigations complémentaires,*
- *De ne recourir à la mise sous APMS que si les examens sérologiques sanguins individuels s'avèrent positifs ou que l'enquête révèle l'existence de facteurs de risque patents vis-à-vis de la brucellose.*

Principales références bibliographiques

1. *Benet JJ, Massard C, Garin-Bastuji B, Moutou F, Dufour B, Schaeffer C, Coton T (1991). Réactions sérologiques atypiques dans le dépistage de la brucellose bovine : Enquête épidémiologique dans les départements concernés. *Epidémiol Santé Anim.*, 19: 97-130.*
2. *Commission Européenne (2008). Décision 2008/984/CE du 10 décembre 2008 modifiant l'annexe C de la directive 64/432/CEE du Conseil et la décision 2004/226/CE en ce qui concerne les tests de diagnostic de la brucellose bovine [notifiée sous le numéro C(2008) 7642]. Publié au JOUE le 31 décembre 2008, L 352/38- L 352/45.*
3. *Durand B, Garin-Bastuji B, Dufour B, Moutou F, Coton T, Broardelle M, Damour. M. , (1992). Enquête nationale sur l'épreuve de l'anneau sur lait de mélange destinée au dépistage de la brucellose bovine. juin-novembre 1991. *Epidémiol. Santé Anim.*, 22: 83-102.*
4. *Garin-Bastuji B, Hummel N, Gerbier G, Cau C, Pouillot R, Da Costa M, Fontaine JJ (1999). Non specific serological reactions in the diagnosis of bovine brucellosis: experimental oral infection of cattle with repeated doses of Yersinia enterocolitica O:9. *Vet. Microbiol.*, 66: 223-233.*
5. *Gerbier G, Garin-Bastuji B, Pouillot R, Véry P, Cau C, Berr V, Dufour B, Moutou (1997). False positive serological reactions in bovine brucellosis: evidence of the role of Yersinia enterocolitica serotype O:9 in a field trial. *Vet. Res.*, 28: 375-383.*
6. *Godfroid J, Saegerman C, Wellemans V, Walravens K, Letesson JJ, Tibor A, Mc Millan A, Spencer S, Sanna M, Bakker D, Pouillot R, Garin-Bastuji B (2002). How to substantiate the freedom of bovine brucellosis when aspecific serological reactions emerge in brucellosis tests? *Vet. Microbiol.*, 90: 461-477.*
7. *Heck FC, Williams JD, Pruett J, Sanders R, Zink DL (1980). An enzyme linked immunosorbent assay for detecting antibodies to Brucella abortus in bovine milk and serum. *Am. J. Vet. Res.*, 41: 2082-2084.*

8. Kerkhofs P, Botton Y, Thiange P, Dekeyser P, Limet JN (1990). *Diagnosis of bovine brucellosis by enzyme immunoassay of milk*. *Vet. Microbiol.*, 24: 73-80.
9. Kittelberger R, Hilbink F, Hansen MF, Penrose M, De Lisle GW, Letesson JJ, Garin-Bastuji B, Searson J, Fossati CA, Cloeckaert A, Schurig G (1995). *Serological crossreactivity between Brucella abortus and Yersinia enterocolitica O:9: I. Immunoblot analysis of the antibody response to Brucella protein antigens in bovine brucellosis*. *Vet. Microbiol.*, 47: 257-270.
10. Nielsen K, Smith P, Gall D, Perez B, Cosma C, Mueller P, Trottier J, Cote G, Boag L, Bosse J(1996). *Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to Brucella abortus in milk*. *Vet. Microbiol.*, 52: 165-173.
11. Nielsen K, Smith P, Gall D, Perez B, Samartino L, Nicoletti P, Dajer A, Rojas X, Kelly W. (2001) *Validation of the fluorescence polarization assay for detection of milk antibody to Brucella abortus*. *J. Immunoassay Immunochem.*, 22: 203-11.
12. Nielsen K Smith P, Widdison J, Gall D, Kelly L, Kelly W, Nicoletti P (2004). *Serological relationship between cattle exposed to Brucella abortus, Yersinia enterocolitica O:9 and Escherichia coli O157:H7*. *Vet. Microbiol.*, 100: 25-30.
13. Pouillot R, Garin-Bastuji B, Dufour B (1998). *Quelques clés pour le diagnostic de brucellose bovine dans un contexte de réactions sérologiques faussement positives*. *Point Vét.* 29, (193) : 728-731.
14. Pouillot R, Gerbier G, Garin-Bastuji B (1999). *Synthèse des travaux épidémiologiques sur les réactions sérologiques faussement positives en brucellose bovine*. *Epidémiol. Santé Anim.* 35: 1-10.
15. Rivera DY, Rueda OE, Calderon CP, Marino OC, Gall D, Nielsen K (2003). *Comparative evaluation of the indirect enzyme linked immuno-sorbent assay in milk for the detection of cattle infected with Brucella abortus in herds located in the province of Cundinamarca, Colombia*. *Rev. Sci. Tech. OIE*, 22: 1065–1075.
16. Romero C, Pardo M, Grillo MJ, Diaz R, Blasco JM, Lopez-Goñi I (1995). *Evaluation of PCR and indirect enzyme-linked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy cattle*. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 3198-3200.
17. Saegerman C, Weynants V, Vo TKO, Mattot MN, De Waele L, Tibor A, De Noel PA, Gilson D, Godfroid J, Michel P, Dubray G, Letesson JJ, Limet JN (1994). *Evaluation de l'activité protectrice de la fraction de la paroi de Brucella insoluble dans le SDS et identification d'antigènes de Brucella utilisables pour le diagnostic*. In : *Aupelf-Uref, Ed. Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales*. Paris, John Libbey Eurotext, 221-233.
18. Saegerman C, Thiange P, Limbourg B, Conotte G, Petit N, Thiry G, Botton Y, Pelzer P, Mullier P, Godfroid J, Dufey J. (1997). *Etude épidémiologique descriptive et identification de facteurs de risque des réactions sérologiques faussement positives en brucellose bovine dans le sud de la province de Namur (Belgique)*. In: *Proceedings of the VIIIth ISVEE, Paris, 8-11 July 1997*. *Epidémiol. Santé Anim.*, 32:08.04.1-08.04.3.
19. Saegerman C De Waele L, Gilson D, Godfroid J, Thiange P, Limbourg B, Vo TKO, Limet JN, Letesson JJ, Berkvens D. (2004). *Field evaluation of three serum ELISA using monoclonal antibodies or protein G as peroxidase conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis*. *Vet. Microbiol.*, 100: 91-105.

20. Vanzini VR, Aguirre N, Lugaresi CI, De Echaide ST, De Canavesio VG, Guglielmo AA, Marchesino MD, Nielsen K (1998). Evaluation of an indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle in Argentina. *Prev. Vet. Med.*, 36: 211-217
21. Vanzini VR, Aguirre NP, Valentini BS, Torioni de Echaide S, Lugaresi CI, Marchesino MD, Nielsen K (2001). Comparison of an indirect ELISA with the Brucella milk ring test for detection of antibodies to *Brucella abortus* in bulk milk samples. *Vet. Microbiol.*, 82: 55-60.

Mots clés : test ELISA, dépistage, brucellose bovine »

Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments

Tels sont les éléments d'analyse que l'Afssa est en mesure de fournir en réponse à la saisine de la Direction générale de l'alimentation sur la demande d'avis relatif au test ELISA sur lait de mélange pour le dépistage de la brucellose bovine.

Le Directeur général de l'Agence française
de sécurité sanitaire des aliments

Marc MORTUREUX

Annexes

Figure 1 : Relation entre le taux de faux-positifs lors du second ELISA et le nombre de laits testés dans la campagne 2008-2009 par chaque laboratoire laitier.

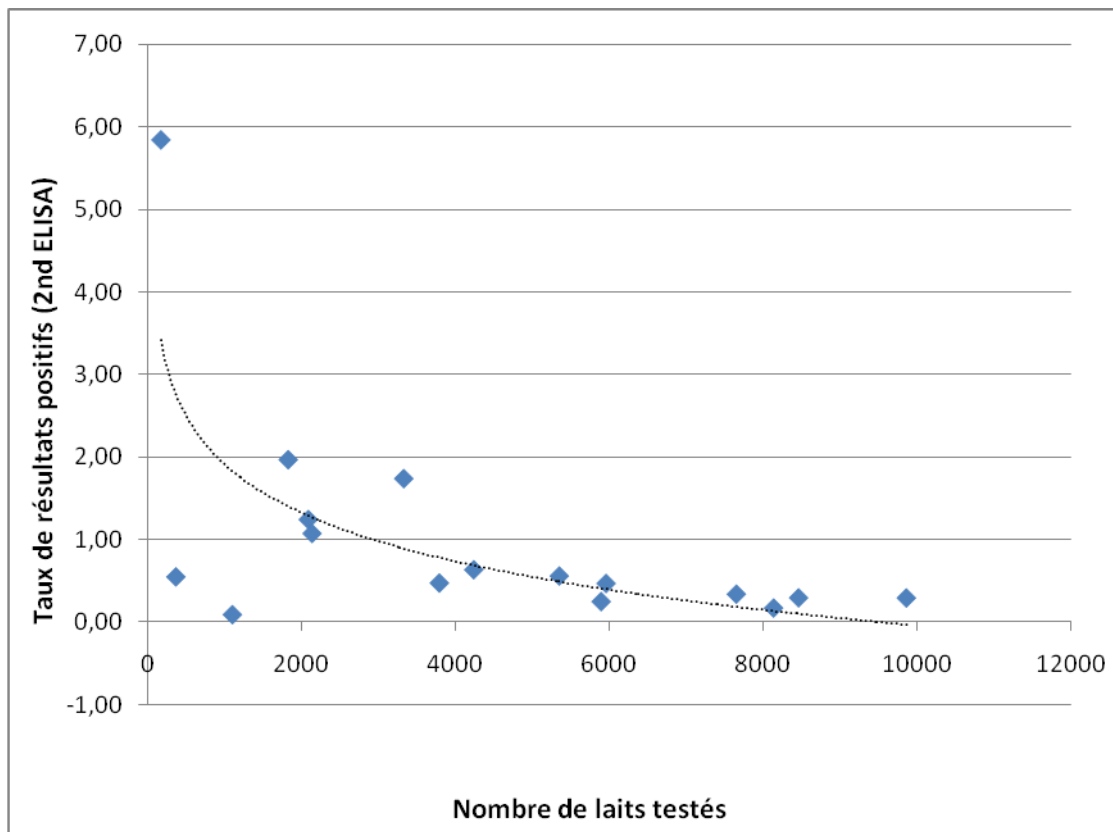


Figure 2 : Relation entre le taux de faux-positifs lors du second ELISA et le nombre de cheptels testés dans la campagne 2008-2009 pour chaque département.

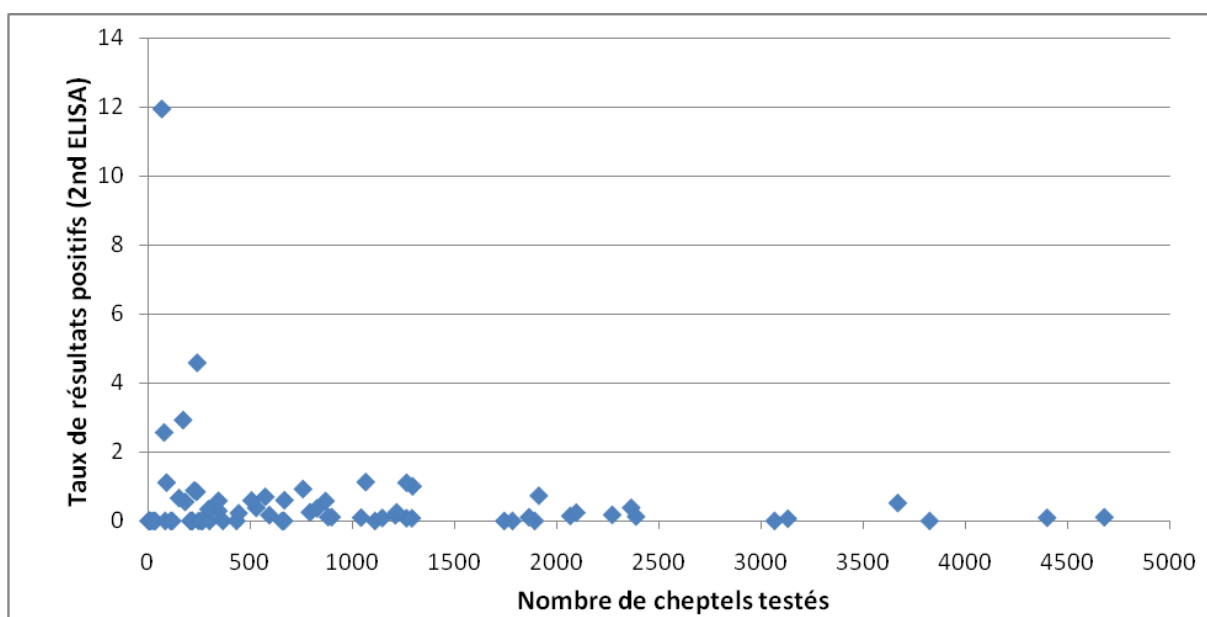


Figure 3 : Corrélation entre l'indice de positivité de l'ELISA lait et la taille du cheptel

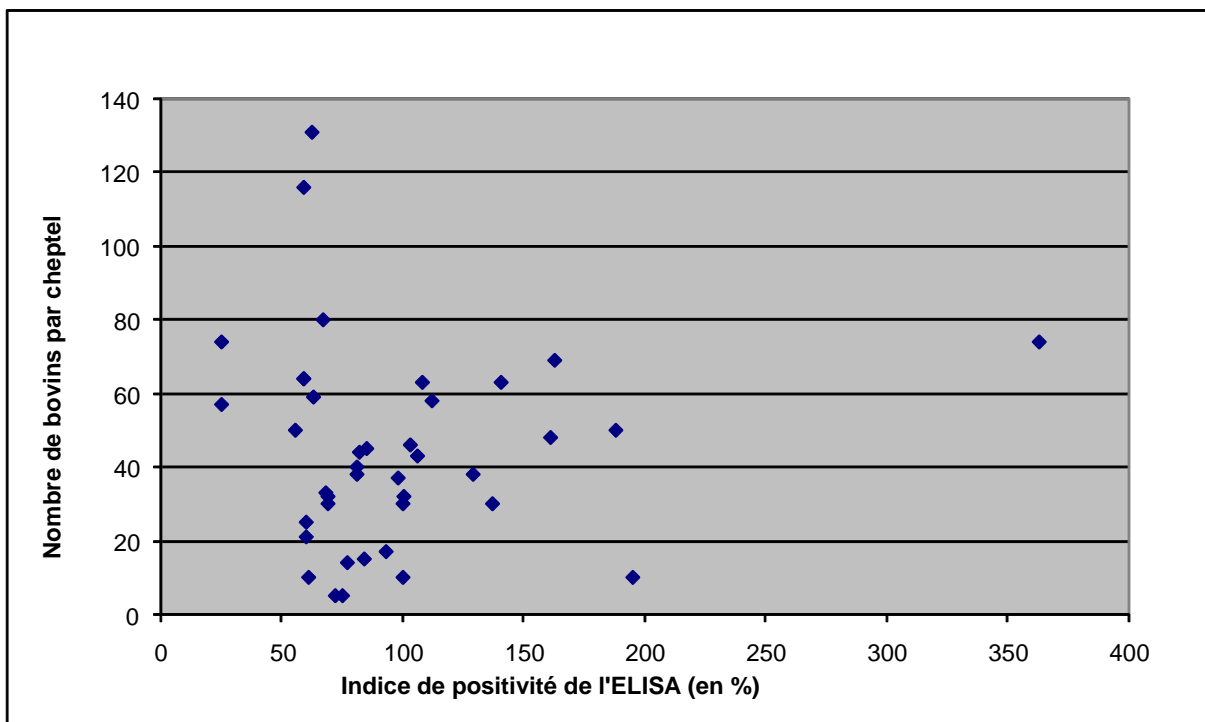


Figure 4 : Corrélation entre l'indice de positivité de l'ELISA lait et le nombre de tests EAT positifs

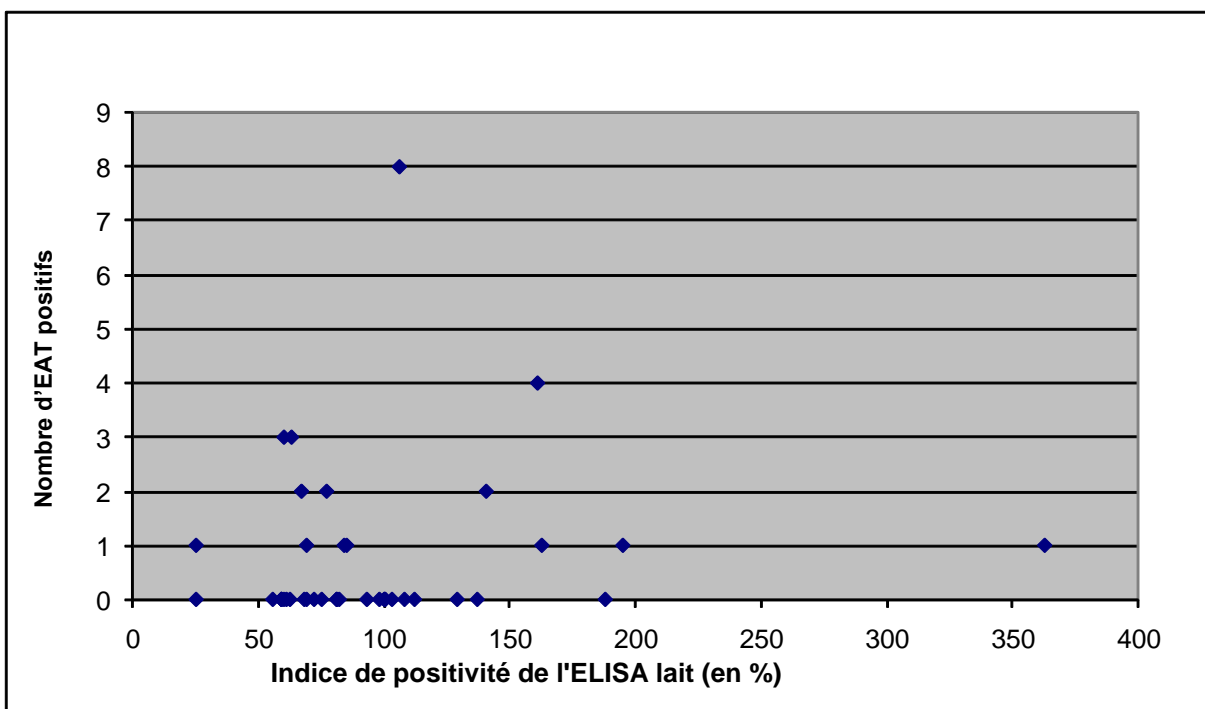


Figure 5 : Corrélation entre l'indice de positivité de l'ELISA lait et le nombre de tests de FC positifs

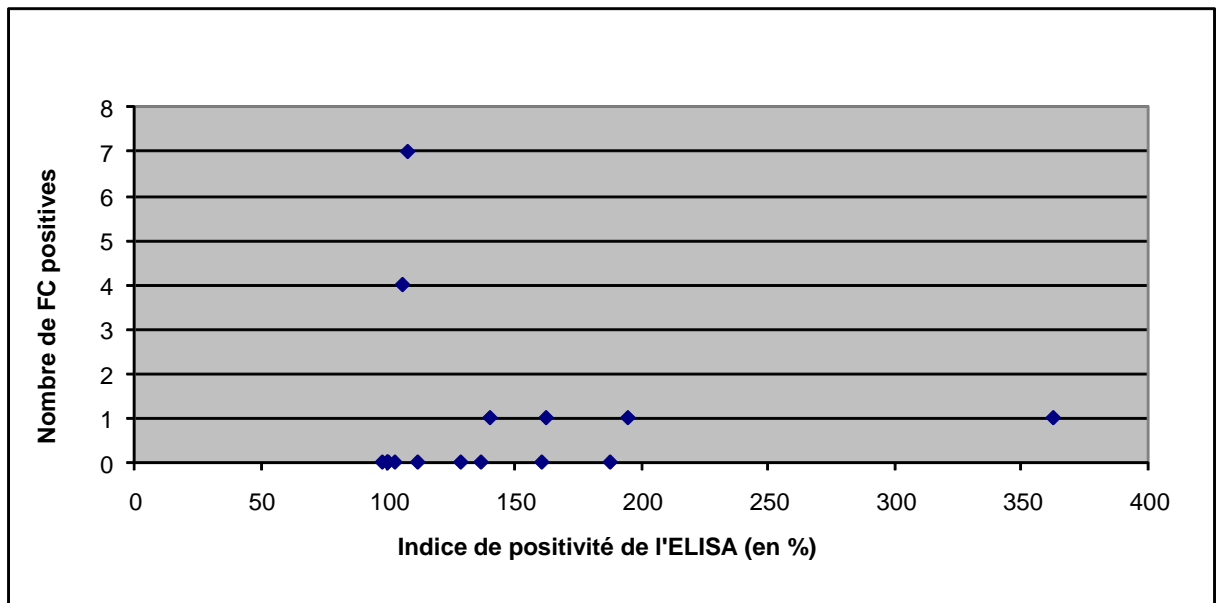


Figure 6 : Histogramme de fréquence du pourcentage de positivité de l'ELISA brucellose sur 299 couples de laits de mélange prélevés aux jours 0 et 15

