

Un test PCR IS6110 en temps réel
pour renforcer la lutte contre la Tuberculose bovine

Introduction :

Mise en place d'un test PCR IS6110 en temps réel en Dordogne

Le test PCR IS6110 en temps réel, kit TaqVet[®] MTBC de LSI, est utilisé à titre expérimental en Dordogne depuis 2006.

En effet, il permet de compléter le diagnostic règlementaire basé sur l'histologie et la bactériologie. Cependant, les résultats de la PCR ne pouvaient alors être pris en compte dans la décision sanitaire, car ce test ne figurait pas dans les textes réglementaires et l'évaluation de ses performances (analytiques et diagnostiques) n'était que partielle (Figures II.1.3 et II.1.4).

Ainsi, l'objectif du travail exposé dans ce chapitre a été d'évaluer la sensibilité et la spécificité analytiques de ce test PCR IS6110 en temps réel. Cependant, cette approche analytique n'étant pas suffisante pour valider l'intégration du test dans les séquences diagnostiques opérationnelles de la Tb, il a fallu impérativement disposer d'éléments de confirmation sur le terrain. En effet, l'évaluation de la sensibilité et la spécificité diagnostiques de cette méthode PCR par comparaison aux techniques officielles de diagnostic de la Tb (histologie et bactériologie) devait permettre de déterminer si l'utilisation de cette méthode en complément des tests officiels pouvait améliorer le diagnostic de la Tb.

Les études de sensibilité et spécificité analytiques sont exposées dans le sous-chapitre 1 et celles de sensibilité et spécificité diagnostiques sont présentées dans le sous-chapitre 2.

Sous-Chapitre 1 :

Etude analytique du test PCR IS6110 en temps réel utilisé en Dordogne

Comme nous l'avons présenté dans la première partie de ce manuscrit, le kit PCR TaqVet[®] MTBC a été développé afin de permettre l'amplification et la détection exclusives d'un fragment de la séquence d'insertion IS6110 à l'aide d'un couple amorces et sonde Taqman[®] spécifiques. Sachant que l'IS6110 est rapportée comme présente uniquement dans le génome de toutes les mycobactéries du MTBC, il était nécessaire de vérifier la capacité de détection par ce test PCR de ces bactéries, c'est-à-dire sa sensibilité analytique.

La spécificité analytique d'un test PCR est sa capacité à distinguer de manière univoque l'agent cible d'autres agents proches génétiquement de la cible d'intérêt et/ou se trouvant dans le domaine d'application. Par conséquent, l'étude de la spécificité analytique du test a également été effectuée afin de vérifier s'il ne permettait pas l'amplification et la détection de bactéries autres que celles présentes dans le MTBC qui présenteraient une séquence analogue ou proche de la cible génétique IS6110.

Matériels et Méthodes

I. Description des échantillons pour les études de sensibilité et spécificité analytiques du test PCR IS6110

I.1. Etude de la sensibilité analytique du test PCR IS6110

Pour vérifier la sensibilité analytique du test PCR IS6110, les ADN des espèces bactériennes incluses dans le MTBC, présentant une concentration faible de 100 fg/μl, ont été analysés avec ce test.

Cette concentration correspond à 105 copies d'IS6110 pour *M. bovis* monocopie étudiée (Cf. Annexes XII et XIII), comme le recommande la norme AFNOR NF T 90-471 – relative à la détection et la quantification des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel – (AFNOR, 2010)). Nous avons tenu compte de cette norme car elle est à ce jour la seule norme AFNOR diffusée traitant de la technique PCR. En effet, au moment de la rédaction de ce manuscrit, la normalisation (AFNOR) de la technique PCR employée en santé animale

n'était encore qu'en projet (rédaction) (PR NF U 47-600 relative à la « Guide de bonnes pratiques pour la mise en œuvre de la PCR en biologie vétérinaire »).

Les mycobactéries du MTBC testées ont été les suivantes : *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. africanum* (souches sauvages caractérisées par l'Afssa par PCR RFLP (Annexe IV)) et *M. tuberculosis* (souche ATCC 27294). *M. canetti* n'était pas disponible.

I.2. Etude de la spécificité analytique du test PCR IS6110

Bien que la spécificité du couple amorces et sonde ait été auparavant vérifiée *in silico* par la société LSI, à partir du logiciel d'alignement de séquences NCBI BLAST, il était cependant nécessaire d'évaluer la spécificité analytique de ce test à partir de l'analyse d'ADN de bactéries (isolées) autres que celles présentes dans le MTBC.

I.2.1. Mycobactéries n'appartenant pas au MTBC

La liste des mycobactéries excluant celles appartenant au MTBC, à tester a été établie à partir d'une analyse approfondie de la littérature (Tableau II.2.1).

En effet, Jordao Junior C.M. et ses collègues ont démontré en 2009 la présence de mycobactéries non tuberculeuses (MNT) (*M. simiae*, *M. kansasii*, *M. flavescens*, *M. gordonae*) dans le lait cru de buffle d'eau, au Brésil. Ils ont également montré que ces résultats étaient en accord avec des publications antérieures, par exemples de Leite C.Q.F. *et al.* en 2003 (*M. fortuitum*, *M. marinum*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, identifiées dans des échantillons de lait (pasteurisé ou non) au Brésil), de Konuk M. *et al.* en 2007 (lait bovin pasteurisé ou non au Brésil), de Jha V.C. *et al.* en 2007 (*M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, isolées de lait cru de buffle au Népal), de Harris N.B. *et al.* en 2007 (*M. fortuitum* retrouvée dans du fromage en Californie).

De plus, Hughes M.S. *et al.* (2005) ont identifié par PCR *M. nonchromogenicum*, *M. malmoense*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *avium*, *M. kansasii* à partir de ganglions de bovins d'Irlande du Nord.

Par ailleurs, *M. smegmatis* possède une séquence similaire à l'IS6110 (Coros A., DeConno E. et Derbyshire K.M., 2008).

Tableau II.2.1. Etude de la spécificité analytique du test PCR IS6110 –
Liste des mycobactéries n'appartenant pas au MTBC à tester et effectivement disponibles

Mycobactéries autres que MTBC	Source (codification)	Références^c
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> ^b	ATCC 25291	0, 2, 4, 7, 8, 9
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> ^b	ATCC 19698	2, 9
<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> ^b	*	–
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i> ^a	ATCC (35752) ^T	0, 1, 3, 4, 7, 8, 10, 13, 14
<i>M. facinogenes</i>	Non disponible	–
<i>M. flavescens</i> ^b	CIP 104533	0, 1, 4, 8
<i>M. fortuitum fortuitum</i> ^a	ATCC (6841) ^T	0, 1, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15
<i>M. gastri</i> ^b	CIP 104530	0, 4, 8, 10
<i>M. gordonae</i> ^a	ATCC (14470) ^T	0, 1, 3, 4, 5, 4, 7, 8, 9, 10
<i>M. intermedium</i> ^b	*	–
<i>M. intracellulare</i> ^a	ATCC (15985) ^T	0, 4, 7, 8, 9, 13, 14, 15
<i>M. kansasii</i> ^a	ATCC (12478) ^T	0, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 13, 14, 15
<i>M. marinum</i> ^a	ATCC (927) ^T	1, 3, 4, 8, 9
<i>M. nonchromogenicum</i> ^b	*	2, 4, 6, 8
<i>M. malmoense</i>	Non disponible	2, 13, 14, 15
<i>M. paraffinicum</i> ^b	*	12
<i>M. scrofulaceum</i>	Non disponible	3, 4, 8
<i>M. simiae</i> ^a	ATCC (25275) ^T	0, 1, 3, 4
<i>M. smegmatis</i> ^a	ATCC (19420) ^T	3, 4, 7, 10, 11
<i>M. szulgai</i>	Non disponible	3, 4, 10
<i>M. phlei</i> ^b	ATCC 354	4, 7, 8
<i>M. terrae</i> complex ^b	*	2, 3, 4, 8
<i>M. triviale</i> ^b	*	4, 8
<i>M. ulcerans</i> ^a	CPS (CR08085632)	1, 3, 4, 8, 10
<i>M. vaccae</i>	Non disponible	0, 3, 4, 8, 10
<i>M. xenopi</i>	*	0, 1, 3, 7, 8, 9, 13, 14

^a/ ADN provenant du Laboratoire Eau Environnement et Systèmes Urbains, Ecole des Ponts, Paris (Radomski N., doctorant) ; ^b/ ADN provenant de ATCC/ American Type Culture Collection ; T/ Souche type ; CPS/ Collection de la Pitié-Salpêtrière (Paris, France) ; */ Identification bactérienne des isolats par séquençage ADN_r 16S, par l'Afssa-Lerpaz ;

^c/ Références des articles citant l'utilisation des mycobactéries pour vérifier la spécificité de PCR MTBC et/ou IS6110. 0/ Hénault S, Karoui C. et Boschirolu M.L., 2006 ; 1/ Jordao Junior C.M. *et al.*, 2009 ; 2/ Hugues M.S. *et al.*, 2005 ; 3/ Tasara T., Hoelzle L.E. et Stephan R., 2005 ; 4/ Rodriguez J.G. *et al.*, 1995 ; 5 : Skuce R.A. *et al.*, 1994 ; 6/ McCorry T.P. *et al.*, 2004 ; 7/ Bakshi C.S. *et al.*, 2005 ; 8/ Liébana E. *et al.*, 1996 ; 9/ Taylor G.M. *et al.*, 2007 ; 10/ Parra A. *et al.*, 2008 ; 11/ Coros A., DeConno E. et Derbyshire K.M., 2008 ; 12/ Wang S.H. *et al.*, 2008 ; 13/ Hellyer T.J. *et al.*, 1996 ; 14/ Kent L. *et al.*, 1995 ; 15/ McHugh T.D., Newport L.E. et Gillespie S.H., 1997.

Au total, 26 mycobactéries ont été sélectionnées mais en pratique, certaines souches n'étaient pas disponibles. Par conséquent, seules 21 mycobactéries ont été effectivement testées (Tableau II.2.1.).

Sachant que la norme AFNOR NF T 90-471 recommande que les essais d'exclusivité soient réalisés sur des extraits d'ADN de façon à obtenir au minimum 10 000 unités génomes (AFNOR, 2010), toutes les mycobactéries disponibles sauf *M. xenopi* (soit 20 échantillons, Tableau II.2.1) ont donc été testées pour une concentration en ADN de 0,01 ng/μl (soit 0,05 ng/puits) (Annexe XII). *M. xenopi* a été testée à partir du lysat d'une colonie (non purifiée et donc non quantifiée).

I.2.2. Bactéries n'appartenant pas au genre *Mycobacterium*

La liste des bactéries à tester n'appartenant pas au genre *Mycobacterium*, a été établie en tenant compte des critères suivants : Bactéries appartenant à l'ordre des Actinomycétales, et/ou engendrant des lésions similaires à celles dues à une infection par les mycobactéries du MTBC et/ou possédant une séquence d'insertion similaire à l'IS6110.

Seuls les échantillons d'ADN de 10 bactéries (10 échantillons) ont été testés par PCR à la concentration de 0,01 ng/μl (AFNOR, 2010) (Tableau II.2.2).

Tableau II.2.2. Etude de la spécificité analytique du test PCR IS6110 – Liste des bactéries testées n'appartenant pas au genre *Mycobacterium*.

Bactéries n'appartenant pas au genre <i>Mycobacterium</i>	Source (codification)
<i>Escherichia coli</i> ^a	* (SC35)
<i>Mycoplasma bovis</i>	ATCC 25523
<i>Nocardia farcinica</i> ^a	IFM 10152
<i>Rhodococcus spp.</i> ^a	* (SC48)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 27956
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	ATCC 27957
<i>Streptococcus uberis</i>	ATCC 27958
<i>Streptomyces spp.</i> ^a	* (SC49)
<i>Pseudomonas spp.</i> ^a	* (SC32)

^a/ ADN provenant du Laboratoire Eau Environnement et Systèmes Urbains, Ecole des Ponts, Paris (Radomski N., doctorant) ; IFM/ Collection de Culture du Centre de Recherche sur les champignons pathogènes et les mycobactéries toxiques, Chiba, Japon.* Identification bactérienne des isolats par séquençage ADNr 16S.

D'autres mycobactéries telles que *Actinobacillus lignieresii*, *Actinomyces pyogenes*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Nocardia asteroides*, qui étaient prévues dans la liste auraient méritées d'être testées mais elles n'étaient malheureusement pas disponibles.

II. Protocole d'amplification et de détection par PCR IS6110 de la cible génétique et Méthode d'interprétation des résultats

L'étude analytique de ce test PCR a porté uniquement sur la cible génétique IS6110 du test. En effet, la cible génétique IPC (contrôle d'extraction) n'était pas utile pour cette étude puisque les échantillons d'ADN analysés ne contenaient pas d'IPC (Annexe IX).

II.1. Protocole d'amplification et de détection par PCR de la cible génétique IS6110

Pour cette approche analytique, nous avons donc préparé uniquement le mix nécessaire à la réaction PCR permettant l'amplification et la détection d'un fragment d'IS6110 (Mix IS6110). Le Mix IS6110 a été reconstitué à partir des réactifs suivants : Master mix et couple amorces et sonde Taqman[®] spécifiques du fragment d'IS6110 recherché (Annexe IX).

Pour chacune des études (sensibilité et spécificité analytiques du test, ainsi que pour sa limite inférieure de détection étudiée en (Annexe XIII)), le volume final de chaque réaction PCR était de 25 µl. Dans chaque puits (ou cupule) où une réaction PCR était à réaliser, 5 µl d'échantillon d'ADN ont été distribués dans les 20 µl de Mix IS6110 préalablement déposés. Par ailleurs, afin de valider l'analyse PCR, un contrôle positif d'amplification de la cible génétique IS6110 (EPC) distribué comme un échantillon, a été utilisé pour chacune des études de sensibilité et spécificité du test. De même, une cupule contenant 25 µl de Mix IS6110 réservée au contrôle négatif d'amplification (NC) a été également employée (Annexe IX).

L'amplification et la détection du fragment cible ont été réalisées avec le thermocycleur ABIPRISM™ 7500 et en utilisant le programme décrit en Annexe IX (avec un changement dans le nombre de cycles à l'étape 3, soit 50 répétitions au lieu de 45).

II.2. Méthode d'interprétation des résultats

Les résultats des témoins positif (EPC) et négatif (NC) d'amplification ont dû être préalablement validés avant d'interpréter les résultats des échantillons. En effet, la valeur du

Ct_{IS6110} obtenue pour l'EPC devait être comprise entre 25 et 28 et la valeur du Ct_{IS6110} obtenue pour le NC devait être supérieure à 50 (nombre de cycles réalisés).

Un système d'interprétation des résultats des échantillons analysés avec le test PCR basé uniquement sur la cible génétique IS6110, est décrit en Annexe XIII (établi suite à la détermination de la limite de détection du test à 3 copies correspondant à une valeur de Ct_{IS6110} de 38). Ainsi, le résultat d'un échantillon est interprété positif (positif MTBC) si la valeur du Ct_{IS6110} est inférieure à 38 ou négatif (négatif MTBC) si la valeur du Ct_{IS6110} est supérieure à 50 (aucun signal détecté). Il faut également tenir compte de l'aspect de la courbe (exponentielle).

Résultats et Discussion

Dans les deux études analytiques, l'analyse PCR a été validée par les témoins et les résultats des échantillons testés ont ainsi pu être interprétés.

I. Etude de la sensibilité analytique du test PCR IS6110

Les valeurs des Ct_{IS6110} obtenues pour les six ADN des mycobactéries du MTBC (*M. bovis*, *M. caprae*, *M. tuberculosis*, *M. microti*, *M. africanum* et *M. pinnipedii*) ont été inférieures à la valeur de Ct correspondant à la limite de détection (Ct_{IS6110} < 38). Ces résultats apportent la confirmation que ce test PCR permet la détection des espèces présentes dans le MTBC. Sa sensibilité analytique est donc excellente d'autant que la concentration des ADN testés étaient relativement faible (100 fg/μl).

II. Etude de la spécificité analytique du test PCR IS6110

Parmi les 21 échantillons testés, fortement concentrés en ADN de mycobactéries autres que MTBC, 5 ont présenté un signal positif (Ct_{IS6110} < 38). Il s'agissait de mycobactéries atypiques : *M. flavescens* (36,3), *M. gastri* (34,6), *M. gordonae* (35,0) et *M. paraffinicum* (34,3) et *M. xenopi* (28,8). Toutefois, les ADN des mycobactéries testés étaient 100 fois plus concentrés (0,01 ng/μl soit 10 000 fg/μl) que ceux des mycobactéries du MTBC.

De plus, ces mycobactéries ont été également analysées avec un autre test PCR IS6110 en temps réel développé par l'Afssa-Lerpaz (noté PCR-Afssa), (Hénault S., Karoui C. et Boschioli M.L., 2006) et les deux dernières mycobactéries (*M. paraffinicum* et *M. xenopi*)

ont présenté également un signal positif (Ct respectivement similaires à ceux obtenus avec le test PCR IS6110 étudié dans cet article) (résultats non présentés).

En outre, le test PCR IS6110 étudié n'a pas permis la détection des mycobactéries du complexe *M. avium* (MAC) (en particuliers *M. avium* subsp. *paratuberculosis* et *M. avium* subsp. *avium* couramment retrouvés chez les bovins) et des bactéries n'appartenant pas au genre *Mycobacterium*. En effet, parmi les 10 autres échantillons testés d'ADN de bactéries autres que *Mycobacterium* spp., aucun signal n'a été détecté ($C_{t_{IS6110}} > 50$).

Au regard de ces résultats, la spécificité analytique du test PCR IS6110 semble donc convenable.

Conclusion

L'objectif du travail exposé dans ce sous-chapitre était d'évaluer d'un point de vue analytique, le test PCR6110 de LSI développé pour détecter seulement les mycobactéries du MTBC. En effet, il s'agissait d'évaluer la sensibilité et la spécificité analytiques des amorces et sonde IS6110, créées pour être spécifiques d'un fragment d'IS6110 qui est, d'après la littérature, présent uniquement dans le génome des mycobactéries du MTBC.

Les résultats analytiques obtenus ont montré que ce test était très sensible puisqu'il a permis la détection des mycobactéries du MTBC, à partir de faibles quantités d'ADN extraits de souches isolées. De plus, sa spécificité analytique semblait acceptable puisque ni les mycobactéries du MAC, ni les bactéries autres que *Mycobacterium* spp. (testées) n'ont été détectées. Cependant, il a permis la détection de quelques mycobactéries atypiques (*M. flavescens*, *M. gastri*, *M. gordonae* et *M. paraffinicum* et *M. xenopi*) à partir de très grandes quantités d'ADN extraits de souches isolées, mais les signaux d'amplification obtenus pour les quatre mycobactéries quantifiées étaient faibles.

Sous-Chapitre 2 :

Etude de la valeur opérationnelle de cette méthode PCR IS6110 utilisée en Dordogne

Après cette approche analytique, une évaluation terrain de ce test PCR IS6110 en temps réel devait permettre d'apprécier son intérêt opérationnel (sensibilité et spécificité diagnostiques) notamment par rapport aux méthodes officielles de diagnostic de la Tb (bactériologie et histologie).

Dans ce sous-chapitre 2, deux versions du kit PCR TaqVet[®] MTBC ont été étudiées. La différence entre les versions reposait sur la nature du contrôle interne d'extraction (IPC endogène pour la 1^{ère} version et exogène pour la 2^{nde}).

Matériels et Méthodes

I. Description des échantillons et processus de sélection rétrospectif

Toutes les études ont été réalisées rétrospectivement à partir de bovins suspectés de Tb, car présentant des lésions macroscopiques évoquant des lésions de Tb, découvertes par l'inspection à l'abattoir. Ces bovins étaient tous issus de cheptels situés dans des régions infectées en France (Dordogne et/ou région Bourgogne, Côte d'Or notamment).

Les échantillons prélevés sur ces lésions suspectes, envoyés par les abattoirs entre fin 2006 et début 2010, ont été traités par le LDAR24 ; il s'agissait de ganglions (rétropharyngien, trachéobronchique, médiastinal, notamment) et d'organes (poumons, foie, notamment).

Tous les échantillons ont été soumis à un examen histologique avec coloration de Ziehl Neelsen (*Hist.* pour l'histologie), une culture et identification de souches (*Bact.* pour la bactériologie) et une PCR IS6110 en temps réel, (kit TaqVet[®] MTBC) (*PCR*).

Au fur et à mesure du travail de thèse, la technique *PCR* a évolué et différentes études de sensibilité diagnostique liées aux modifications ont ainsi été réalisées.

Deux versions du test *PCR* ont été évaluées.

En effet, nous avons réalisé une première étude de la sensibilité diagnostique de la 1^{ère} version de la *PCR* (*PCR1*) pour laquelle l'IPC était endogène et la détection des deux cibles génétiques (IS6110 et IPC endogène) était réalisée dans le même puits (monocupule).

Or, en raison d'un problème lié à cet IPC endogène (problème d'invalidité des résultats *PCR1* en l'absence d'inhibition), une seconde version du test *PCR* (*PCR2*) reposant sur l'utilisation d'un IPC exogène a été développée et utilisée pour la détection des deux cibles génétiques (IS6110 et IPC exogène) en monocupule (*PCR2m*) et cupules séparées ou bicupule (*PCR2b*). Une étude comparative entre *PCR1*, *PCR2m* et *PCR2b* a donc été nécessaire pour déterminer si les problèmes d'inhibition pouvaient, sans réduire la sensibilité de la méthode, être réduits avec cette nouvelle version (*PCR2*) et suivant quel système de détection (monocupule ou bicupule).

Enfin, il a été indispensable d'étudier la sensibilité diagnostique de la version *PCR* retenue (*PCR2b*).

Par ailleurs, la spécificité diagnostique « opérationnelle » du test *PCR* a été étudiée à partir de la *PCR1* et *PCR2b* qui ont été employées « en routine » en Dordogne (*PCR1* de fin 2006 à fin 2007 et *PCR2b* depuis 2008).

Pour compléter l'approche analytique de la spécificité de la cible génétique IS6110 du test, la spécificité de la *PCR2b* conditionnelle à l'identification de bactéries n'appartenant pas au MTBC (absence de bactérie du MTBC après recherche d'identification des colonies isolées) a été également étudiée rétrospectivement.

I.1. Etude de la sensibilité diagnostique de la 1^{ère} version de la *PCR* (*PCR1*)

La sensibilité diagnostique de la première version de la *PCR* (*PCR1*) a été étudiée à partir de 149 tissus présentant des lésions macroscopiques suspectes de Tb, découvertes à l'inspection à l'abattoir (fin 2006 et 2007). Ces échantillons provenaient de 77 bovins issus de 44 cheptels déclarés infectés de Tb* par la suite (d'une région infectée, Dordogne).

Pour cette étude, les échantillons ont tous été analysés par histologie, bactériologie et *PCR1*. Dans le cas de résultat *PCR1* invalide, l'échantillon (*éluat*) était dilué au 1/10 puis ré-analysé. La particularité de cette 1^{ère} version de la *PCR* est que l'IPC est endogène (IPC_{endo}). De plus, l'amplification et la détection des cibles IS6110 et IPC_{endo} s'effectuent dans la même cupule (amplifications géniques en monocupule) (Annexe IX).

* **Cheptel infecté de Tb** : cheptel où au minimum 1 animal a fourni un résultat positif en bactériologie (*M. bovis*) laquelle est à ce jour le gold standard.

Cependant, l'absence de détection d'IPC_{endo} (résultat invalide) a été constatée à plusieurs reprises en l'absence d'inhibition et ceci constituait un problème à résoudre rapidement. Une seconde version de cette PCR (PCR2), utilisant un IPC exogène (ajouté après l'étape de décontamination à l'acide de façon à éviter sa dénaturation) a donc été développée et comparée à la PCR1.

I.2. Deux études comparatives entre les sensibilités diagnostiques de PCR1 et PCR2

I.2.1. Première étude comparative entre PCR1 et PCR2

42/149 échantillons « ribolysés » (§ II.2.2.2.), utilisés pour l'étude de la sensibilité diagnostique de la PCR1 (étude initiale), ont été ré-extraits et analysés deux fois par PCR2 avec un système d'amplification génique d'une part, en monocupule (notée PCR2m) et d'autre part, en cupules séparées ou bicupule (notée PCR2b). De plus, ces échantillons ont été ré-analysés par PCR1, avec le même système d'amplification génique, soit en monocupule. Dans le cas de résultat PCR invalide, l'échantillon (éluat) était dilué au 1/10 puis ré-analysé. Par ailleurs, 31 de ces 42 échantillons (éluates) ont été envoyés à l'Afssa-Lerpaz qui les a également analysés (PCR-Afssa) (Hénault *et al.*, 2006). Les résultats obtenus sont présentés en Annexe XV.

I.2.2. Deuxième étude comparative entre PCR1 et PCR2b

Une seconde étude comparative a été effectuée dans le but de vérifier les résultats obtenus lors de la première étude. Ainsi, 23 échantillons ribolysés supplémentaires, décrits au Tableau II.2.3, (parmi les 149 échantillons étudiés dans l'étude initiale de la sensibilité de la PCR1 (§ I.1.)), ont été choisis selon les résultats obtenus dans l'étude initiale, de façon à disposer d'un panel de résultats différents (cas A à F).

Tableau II.2.3. Caractéristiques des échantillons utilisés pour la seconde étude comparative entre PCR1 et PCR2b.

Cas	Nombre d'échantillons	Résultats PCR1 (étude initiale)	Résultats Bact.
A	10	$Ct_{IS6110} < 38$	Positif
B	2	$38 \leq Ct_{IS6110} < 40$	Positif
C	1	$Ct_{IS6110} > 40$	Négatif
D	1	$Ct_{IS6110} > 40$	Invalide
E	7	$Ct_{IS6110} < 38$	Négatif
F	2	$38 \leq Ct_{IS6110} < 40$	Négatif

Ensuite, ils ont tous été extraits et analysés simultanément par *PCR1* et *PCR2b*. Dans le cas de résultat *PCR* invalide, l'échantillon (*éluat*) était dilué au 1/10 puis ré-analysé.

I.3. Etude de la sensibilité diagnostique de la *PCR2b*

L'étude de la sensibilité diagnostique de la *PCR2b* a été effectuée à partir de 126 tissus présentant des lésions macroscopiques suspectes de Tb, découvertes à l'inspection à l'abattoir (en 2008). Ces échantillons provenaient de 67 bovins issus de 29 cheptels déclarés infectés¹ de Tb par la suite (des deux régions infectées, citées précédemment).

Dans cette étude, les échantillons ont tous été analysés par histologie, bactériologie et *PCR2b*. Dans le cas de résultat *PCR2b* invalide, l'échantillon (*éluat*) était dilué au 1/10 puis ré-analysé.

I.4. Etude de la spécificité diagnostique « opérationnelle » de la *PCR*

L'étude de la spécificité diagnostique de la *PCR* devait être réalisée à partir d'échantillons de bovins présentant à l'abattoir des lésions suspectes de Tb mais reconnus non infectés de Tb (bactériologie négative) par la suite. De plus, ces bovins auraient dû provenir de cheptels indemnes de Tb, d'une région elle-même indemne. Cependant, en raison des difficultés pour obtenir rapidement le nombre nécessaire d'échantillons (afin d'avoir des résultats statistiquement fiables) et pour réaliser les analyses dans le temps imparti, il n'a pas été possible de mesurer directement la spécificité diagnostique de la *PCR*.

Il a donc été convenu de s'appuyer sur l'approche analytique (souches de la liste d'exclusivité non détectées) mais il fallait impérativement disposer d'éléments de confirmation sur le terrain.

Pour cela, une estimation de la spécificité diagnostique « opérationnelle » du test a été effectuée. Cette spécificité a donc été évaluée à partir des résultats trouvés négatifs en *PCR* pour des cheptels qui par la suite avaient été reconnus non infectés (bactériologie négative pour tous les bovins testés du cheptel).

Par conséquent, la spécificité diagnostique opérationnelle de la *PCR* a été étudiée à partir de 47 tissus présentant des lésions macroscopiques suspectes de Tb, découvertes à l'inspection à l'abattoir (entre fin 2006 et début 2008). Ces échantillons provenaient de 38 bovins issus de 37 cheptels initialement classés indemnes de Tb* (des deux régions infectées, citées

* **Cheptel indemne de Tb** : cheptel où aucun animal n'a été retrouvé positif en bactériologie depuis 2001 (absence de donnée avant cette date).

précédemment) et pour lesquels la suite des observations (y compris tuberculinations) n'a pas permis de confirmer la suspicion initiale de tuberculose.

Dans cette étude, les échantillons ont tous été analysés par histologie, bactériologie et *PCR* (*PCR1* (25 échantillons soit 20 animaux) ou *PCR2b* (22 échantillons soit 18 animaux)). Dans le cas de résultat *PCR* invalide, l'échantillon (*éluat*) était dilué au 1/10 puis ré-analysé.

I.5. Etude complémentaire de la spécificité de la *PCR2b* conditionnelle à l'identification de bactéries n'appartenant pas au MTBC

Pour compléter l'approche analytique, la spécificité de la *PCR2b* conditionnelle à l'identification de bactéries n'appartenant pas au MTBC (absence de bactérie du MTBC après recherche d'identification des colonies isolées) a été étudiée rétrospectivement à partir de 65 tissus provenant de bovins (Dordogne) avec des lésions macroscopiques suspectes de Tb, analysés par histologie, bactériologie et *PCR2b* (pendant la période de janvier 2007 à juin 2010) et dont les résultats bactériologiques étaient tous négatifs (absence de bactérie du MTBC) après identification des colonies isolées.

De plus, pour élargir le spectre de discrimination de la *PCR2b*, il a été décidé d'inclure dans cette étude, 3 autres échantillons (également avec des lésions macroscopiques suspectes et négatifs en bactériologie après identification), car les résultats après identification des colonies isolées de ces échantillons avaient montré la mise évidence de trois mycobactéries non retrouvées chez les bovins étudiés en Dordogne (*M. intracellulare*, *M. szulgai* et *M. xenopi*) ; Parmi ces trois échantillons, l'un provenait d'un rat-kangourou (parc zoologique) et les deux autres de blaireaux (Côte d'Or).

L'étude a donc finalement compté 68 échantillons.

II. Description des techniques utilisées (Histologie, Bactériologie et Méthode PCR IS6110)

II.1. Histologie réalisée par les laboratoires agréés (LDA22 et ENV/Afssa-Lyon)

Les échantillons (ganglions ou organes) fixés au formol par le LDAR24 ont ensuite été envoyés à un des laboratoires agréés pour la recherche de Tb par examen histo-pathologique (LDA22 ou ENV/Afssa-Lyon en fonction de la provenance des échantillons).

Chaque échantillon a donc été analysé par examen microscopique de coupes histologiques (colorations au HE et de ZN). Ensuite, un résultat définitif global par animal (même si plusieurs échantillons traités pour un même animal) a été rendu au LDAR24.

De plus, l'ENV/Afssa-Lyon a utilisé, en complément, d'autres techniques spécifiques des mycobactéries telles que la coloration à l'AOR et l'IHC utilisant des Ac anti-*M. bovis*.

Toutefois, une étude comparative des méthodes employées par les deux laboratoires (Annexe XIV) a montré qu'il n'existait pas de différence significative entre les méthodes.

La méthode d'interprétation des résultats histologiques par animal a été la suivante : les résultats indiquant la présence de lésions évocatrices de Tb avec ou sans BAAR ont été interprétés positifs (*Hist.* +) tandis que les résultats montrant l'absence de lésion ou bien la présence de lésions non tuberculeuses ont été interprétés négatifs. (*Hist.* -).

II.2. Bactériologie (culture selon la méthode de référence & identification) et Méthode PCR

II.2.1. Préparation des échantillons : Décontamination & Broyage des échantillons

Préalablement à la mise en culture des échantillons et à l'étape d'extraction d'ADN (des échantillons) en vue de l'analyse PCR, les échantillons ont été préparés selon le protocole décrit dans la norme AFNOR NF U 47-104, version en vigueur de 2003 (AFNOR, 2003), (protocole détaillé en Annexe III).

Ainsi, quelques grammes de chaque échantillon analysé ont été coupés en petits morceaux puis homogénéisés par broyage péristaltique dans de l'acide sulfurique à 4% (solution de décontamination) (Hénault *et al.*, 2006). Ensuite, une solution de soude à 6% a été utilisée pour neutraliser la suspension.

II.2.2. Analyses des échantillons décontaminés

II.2.2.1. Recherche bactériologique des mycobactéries du MTBC

Le surnageant de chaque échantillon préalablement broyé et décontaminé a été inoculé dans plusieurs tubes de culture sur milieu solide (Löwenstein-Jensen[®] et Coletsos[®]) (norme NF U 47-104). Puis, les tubes ont été incubés à différentes températures (($30 \pm 2^\circ\text{C}$, $37 \pm 2^\circ\text{C}$ et $40 \pm 2^\circ\text{C}$) pendant trois mois (protocole détaillé en Annexe III).

L'identification des colonies isolées a été ensuite réalisée par l'Afssa-Lerpaz (Annexe IV).

La méthode d'interprétation des résultats bactériologiques par échantillon a été la suivante : les résultats indiquant l'isolement de mycobactéries appartenant au MTBC ont été interprétés positifs (*Bact. +*) et les résultats montrant l'absence de colonie en culture ou bien, l'identification de mycobactéries autres que celles du MTBC ou de bactéries n'appartenant pas au genre *Mycobacterium* ont été interprétés négatifs (*Bact. -*).

II.2.2.2. Méthode PCR IS6110 pour la recherche des mycobactéries du MTBC

La méthode PCR IS6110 pour la recherche des mycobactéries du MTBC comprenait plusieurs étapes : la purification du surnageant de l'échantillon broyé et décontaminé suivi d'une lyse mécanique (sous agitation avec des microbilles) ou ribolyse[®] puis, de l'extraction d'ADN à partir de l'échantillon *ribolysé* et enfin, de l'analyse PCR (*PCR1* ou *PCR2m* ou *PCR2b*) des échantillons d'ADN extrait.

II.2.2.2.1. Purification du surnageant puis Ribolyse[®]

Le surnageant de chaque échantillon préalablement broyé et décontaminé a été également purifié en suivant le protocole décrit ci-après.

Ainsi, 1500 µl de surnageant ont été transférés dans un microtube DNase/RNase free.

Puis, ce microtube a été centrifugé pendant 2 min à 12 000 g et le surnageant éliminé. Ensuite, le culot a été remis en suspension dans 1 ml de tampon Tris-EDTA et, le microtube a été à nouveau centrifugé pendant 2 min à 12 000 g.

Ce procédé de lavage du culot a été renouvelé au minimum deux fois (jusqu'à l'obtention d'un culot clair stable).

Après, le culot a été remis en suspension dans 600 µl de PBS puis, transféré dans un microtube (pour ribolyser[®]) contenant des microbilles (de 0,5 mm de diamètre).

Enfin, l'échantillon a été *ribolysé* (à l'aide d'un ribolyser[®] de type FastPrep[®] 120 programmé à 6 m/sec 45 sec ou Precess 24TM programmé à 5000 rpm 2 fois 20 sec) puis centrifugé quelques secondes (afin d'éviter les aérosols).

II.2.2.2.2. Extraction d'ADN à partir de l'échantillon *ribolysé*

L'extraction d'ADN à partir de l'échantillon *ribolysé* a été réalisée en utilisant le kit QIAamp[®] DNA de QIAGEN.

Un mélange contenant 20 µl de protéinase K, 200 µl de tampon AL, 200 µl d'échantillon *ribolysé* et, 5 µl d'IPC_{exo} (si analyse *PCR2* réalisée) a été incubé à 56 ± 2°C pendant une nuit (16 à 18 h).

Après refroidissement du microtube, le mélange a été centrifugé rapidement puis déposé sur colonne QIAamp[®] DNA afin de purifier l'ADN. Après les deux lavages et le séchage de la colonne, l'ADN a été finalement élué dans 100 µl de tampon AE.

L'échantillon était alors prêt pour être amplifié par PCR.

Remarque : Comme la quantité d'échantillon ribolysé était d'environ 600 µl, il était aisément possible de réaliser deux extractions d'ADN (quantité requise par extraction, 200 µl) par échantillon (ceci a été réalisé en particulier pour les études comparatives entre PCR1 et PCR2).

II.2.2.2.3. Analyse *PCR* des échantillons d'ADN extraits

II.2.2.2.3.1. Test *PCR* version 1, *PCR1*

Comme nous l'avons dit précédemment, la particularité de la première version de la *PCR* repose sur l'utilisation d'un IPC endogène. Le protocole d'analyse de la *PCR1* est décrit en Annexe IX. De même, les méthodes de validation de l'analyse *PCR1* par les témoins (NC, EPC et NCS) et d'interprétation des résultats (Tableau I.1.5) sont présentées au paragraphe III.2.2.2.1 du Chapitre I de la Partie I, de ce manuscrit.

II.2.2.2.3.2. Test *PCR* version 2, *PCR2*

➤ Caractéristiques de l'analyse *PCR2*

Comme nous l'avons vu précédemment, la particularité de la deuxième version de la *PCR* repose sur l'utilisation d'un IPC exogène (IPC_{exo}). Il s'agit d'un ADN viral inactivé ajouté au début de l'étape de lyse (en même temps que la protéinase K) et extrait ensuite comme l'ADN cible (IS6110).

Par ailleurs, le système d'amplification et détection des deux cibles génétiques (IS6110 et IPC_{exo}) par *PCR2* a été réalisé dans une seule cupule (*PCR2m*) et/ou deux cupules séparées (*PCR2b*) à la différence de la *PCR1* pour laquelle nous avons utilisé seulement un système en monocupule.

Par conséquent, dans le cas d'une analyse *PCR2m*, le mix réactionnel PCR (auquel l'échantillon ou les témoins à analyser sont ajoutés) appelé « mix 2 » comprenait le Master mix (identique à celui de la *PCR1*), et un mélange de séquences spécifiques du fragment d'IS6110 (identiques à celles de la *PCR1*) et de séquences spécifiques de l'IPC_{exo}.

Dans le cas d'une analyse *PCR2b*, deux mix réactionnels PCR ont été réalisés afin de les déposer dans deux cupules séparées : un « mix IS6110 » composé de Master mix (identique à celui des *PCR1* et *PCR2m*) et d'un mélange de séquences spécifiques du fragment d'IS6110 (identiques à celles des *PCR1* et *PCR2m*) et, d'un « mix IPC_{exo} » composé de Master mix (identique à celui des *PCR1* et *PCR2m*) et d'un mélange de séquences spécifiques de l'IPC_{exo} (identiques à celles de la *PCR2m*).

Comme pour la *PCR1*, les témoins EPC, NC et NCS ont été également utilisés. En effet, l'EPC constituait le témoin positif d'amplification de l'IS6110 et le NC représentait le témoin négatif d'amplification de l'IS6110 et de l'IPC_{exo}. Enfin, le NCS constituait un contrôle négatif pour l'IS6110 permettant de vérifier l'absence de contamination par l'IS6110 (MTBC) lors de l'extraction. Cependant, à la différence de la *PCR1*, il était aussi un témoin positif pour l'IPC_{exo}, c'est-à-dire permettant de vérifier l'efficacité de l'extraction de l'IPC_{exo} (car IPC_{exo} également ajouté au NCS (PBS) avant l'étape de lyse).

Le programme nécessaire à la réaction *PCR2* était identique à celui utilisé pour la réaction *PCR1* (Annexe IX).

➤ Méthodes de validation de l'analyse *PCR2* et d'interprétation des résultats

Les résultats du témoin positif d'amplification de l'IS6110 (EPC), du témoin négatif d'amplification de l'IS6110 et de l'IPC_{exo} (NC) et, du témoin d'extraction positif pour l'IPC_{exo} mais négatif pour l'IS6110 (NCS) ont dû être préalablement validés pour pouvoir procéder à l'interprétation des résultats des échantillons.

En effet, de manière analogue à la *PCR1*, la valeur du Ct_{IS6110} obtenue pour l'EPC devait être comprise entre 25 et 28 (et Ct_{IPC_{exo}} > 40). Les valeurs des Ct_{IS6110} et Ct_{IPC_{exo}} obtenues pour le NC devaient être supérieures à 45 (nombre de cycles réalisés).

Pour le NCS, la valeur du Ct_{IS6110} devait être supérieure à 40 mais à la différence de la *PCR1*, la valeur du Ct_{IPC_{exo}} devait être inférieure ou égale à 29 (valeur attendue du Ct_{IPC_{exo}} (27) majorée de 2 Ct).

Le système d'interprétation des résultats des échantillons analysés avec le test *PCR2* (Tableau II.2.4) était quelque peu différent de celui de la *PCR1* (les différences reposant sur les valeurs de Ct obtenues avec les détecteurs IPC).

Tableau II.2.4. Système d'interprétation des résultats des échantillons (analysés avec la *PCR2*) en fonction des valeurs de Ct obtenues avec les détecteurs IS6110 (Ct_{IS6110}) et IPC_{exo} (Ct_{IPCexo}).

Interprétation des résultats de l'échantillon	Valeur du Ct IS6110 obtenue pour l'échantillon	Valeur du Ct IPC _{exo} obtenue pour l'échantillon
Positif MTBC	≤ 40	≤ 40
Négatif MTBC	> 40	≤ Valeur du Ct IPC _{exo} obtenue pour NCS ^(a) + 3 Ct
Invalide ^(b)	> 40	> Valeur du Ct IPC _{exo} obtenue pour NCS ^(a) + 3 Ct

^(a)/ La valeur du Ct_{IPCexo} obtenue pour le NCS doit être inférieure ou égale à 27 majorée de 2 Ct, soit 29 (soit 1 des 3 critères de validation de l'analyse avant interprétation des résultats des échantillons);

^(b)/ Dans le cas d'un résultat invalide, il est nécessaire de diluer l'échantillon au 1/10 et de recommencer l'analyse *PCR2*. Pour l'interprétation, la valeur du Ct_{IPCexo} obtenue doit être inférieure ou égale à la valeur du Ct_{IPCexo} obtenue pour le NCS majorée de 6 Ct.

Ainsi, le résultat d'un échantillon a été :

- interprété positif (positif MTBC) si la valeur du Ct_{IS6110} était inférieure à 40 et que la valeur du Ct_{IPCexo} était inférieure ou égale à la valeur du Ct_{IPCexo} obtenue pour le NCS majorée de 3 Ct. Toutefois, si la valeur du Ct_{IPCexo} était supérieure à la valeur du Ct_{IPCexo} obtenue pour le NCS majorée de 3 Ct mais inférieure ou égale à 40, il s'agissait d'une inhibition partielle et par conséquent, l'échantillon a été également interprété comme positif.

- interprété négatif (négatif MTBC) si la valeur du Ct_{IS6110} était supérieure à 40 et que la valeur du Ct_{IPCexo} était inférieure ou égale à la valeur du Ct_{IPCexo} obtenue pour le NCS majorée de 3 Ct.

- reconnu invalide si la valeur du Ct_{IS6110} était supérieure à 40 et que la valeur du Ct_{IPCexo} était supérieure à la valeur du Ct_{IPCexo} obtenue pour le NCS majorée de 3 Ct.

II.3. Méthode d'analyse des différents résultats obtenus par animal dans les études de sensibilité diagnostique des *PCR1* et *PCR2b* et de spécificité diagnostique opérationnelle de la *PCR*

Les résultats des deux études de sensibilité diagnostique de la *PCR* (*PCR1* et *PCR2b*) et de l'étude de spécificité diagnostique opérationnelle de la *PCR* ont été exprimés par animal dans le but d'établir des comparaisons avec les résultats des autres tests (histologie, bactériologie).

En effet, les résultats histologiques ont été exprimés globalement par animal et non pour chaque échantillon d'un animal donné.

Les critères employés pour interpréter les résultats bactériologiques et *PCR* des échantillons par animal, sont décrits au Tableau II.2.5.

Tableau II.2.5. Critères d'interprétation des résultats bactériologiques et *PCR* des échantillons par animal, employés pour les études de sensibilité et spécificité diagnostiques de la *PCR*.

Tests	Résultat par animal	Critères
Bactériologie	Positif	Au moins un échantillon positif
	Négatif	Tous les échantillons négatifs
<i>PCR</i>	Positif	Au moins un échantillon positif
	Négatif	Tous les échantillons négatifs
	Invalide	Tous les échantillons invalides
		Au moins un échantillon invalide et les autres négatifs

Résultats et Interprétations

Dans la mesure où les différentes études diagnostiques ont été réalisées de manière rétrospective, seuls les échantillons dont les analyses *PCR* étaient validées (par les témoins) ont été sélectionnés pour nos études. Ainsi, les résultats de tous échantillons étudiés étaient interprétables (négatifs, positifs ou invalides).

Par ailleurs, les différents pourcentages présentés ont été calculés avec un intervalle de confiance à 95 % (IC 95 %).

I. Etudes de la sensibilité diagnostique de la *PCR*

I.1. Etude de la sensibilité diagnostique de la *PCR1*

Les résultats bruts indiquent plus d'animaux positifs en histologie ($82 \pm 9\%$) et *PCR1* ($77 \pm 10\%$) qu'en bactériologie ($60 \pm 11\%$) (Tableau II.2.6).

De plus, la combinaison des résultats des différentes techniques (par animal) montre des concordances de $84 \pm 8\%$ ($65/77$), $74 \pm 10\%$ ($57/77$), $73 \pm 10\%$ ($56/77$) et $66 \pm 11\%$ ($51/77$) respectivement entre la *PCR1* & l'histologie, la *PCR1* & la bactériologie, la bactériologie & l'histologie et, la *PCR1*, la bactériologie & l'histologie (Tableau II.2.6).

Tableau II.2.6. Résultats de la *PCR1*, de l'histologie (*Hist.*) et de la bactériologie (*Bact.*) obtenus dans l'étude de la sensibilité diagnostique de la *PCR1* (n=77).

		<i>Hist.</i> +	<i>Hist.</i> –	Total <i>Hist.</i>
<i>PCR1</i> +	<i>Bact.</i> +	42 (55 ± 11 %)	2	44 (57 ± 11 %)
	<i>Bact.</i> –	14	1	15 (19 ± 9 %)
	<i>Bact.</i> + & –	56 (73 ± 10 %)	3	59 (77 ± 10 %)
<i>PCR1</i> –	<i>Bact.</i> +	1	0	1
	<i>Bact.</i> –	4	9 (12 ± 7 %)	13 (17 ± 9 %)
	<i>Bact.</i> + & –	5	9	14
<i>PCR1</i> invalide	<i>Bact.</i> +	1	0	1
	<i>Bact.</i> –	1	2	3
	<i>Bact.</i> + & –	2	2	4
<i>Bact.</i> +		44 (57 ± 11 %)	2	46 (60 ± 11 %)
<i>Bact.</i> –		19	12 (16 ± 8 %)	31
Total <i>Bact.</i>		63 (82 ± 9 %)	15	77 (100 %)

Concernant les résultats discordants entre les différents tests, un animal a été détecté positif en bactériologie et histologie (sans BAAR) mais négatif en *PCR1*. A l'inverse, un animal a eu des résultats négatifs en bactériologie et histologie (lésions non tuberculeuses) mais positif en *PCR1*.

Par contre, 15 animaux ont été retrouvés positifs en *PCR1* et négatifs en bactériologie. La *PCR1* a donc apporté une amélioration de la détection de Tb par rapport à la bactériologie.

De plus, 16 animaux positifs en *PCR1* ont présenté des résultats bactériologiques et histologiques discordants : 2 animaux *Bact.* + & *Hist.* – (avec des lésions non tuberculeuses) et 14 animaux *Bact.* – & *Hist.* + dont 1/14 avec BAAR. Par conséquent, la bactériologie seule n'avait pas permis la détection d'un animal infecté, à partir d'échantillons trouvés positifs en *PCR1* et ayant présenté des lésions évocatrices de Tb avec des BAAR.

En outre, aucun animal n'a été confirmé positif en bactériologie alors qu'il était négatif en *PCR1* & histologie. De plus, 4 animaux avec des lésions évocatrices de Tb (sans BAAR) ont été trouvés négatifs en *PCR1* & bactériologie.

Par ailleurs, seulement 9 animaux ont présenté des résultats négatifs pour l'ensemble des tests (*PCR 1*, *Bact.* et *Hist.* (5/9 avec des lésions non tuberculeuses)). Au contraire, 60/77 animaux (soit 78 ± 9 %) ont présenté des résultats positifs à au moins 2 des 3 tests.

Enfin, la *PCR1* a donné 4 résultats invalides parmi lesquels un seul animal était positif en bactériologie (et histologie). Toutefois, deux de ces quatre animaux ont été trouvés négatifs par les tests officiels (*Hist.* & *Bact.*).

I.2. Etudes comparatives entre les sensibilités diagnostiques de *PCR1* et *PCR2*

Dans le but de résoudre les problèmes liés aux nombreux résultats invalides en *PCR1* (monocupule), la *PCR2* (en monocupule et en bicupule), a été comparée à la *PCR1* à partir de deux études successives.

➤ Etude comparative 1 entre *PCR1* et *PCR2*

Tout d'abord, les sensibilités de la *PCR2m* et la *PCR2b* ont été comparées à celle de la *PCR1* à partir de 42 échantillons utilisés dans l'étude de la sensibilité de la *PCR1* (Tableau II.2.8).

L'analyse des résultats positifs obtenus avec ces trois *PCR* montre que la *PCR1* a permis de détecter beaucoup plus d'échantillons positifs (16/42) que la *PCR2m* (9/42) (Tableaux II.2.7 et II.2.8). L'utilisation de la *PCR2* en monocupule a donc entraîné une baisse importante de sensibilité (7 échantillons) par rapport à la *PCR1*, alors qu'en bicupule, la *PCR2* a permis de détecter deux fois plus d'échantillons (18/42) qu'en monocupule, soit deux échantillons supplémentaires par rapport à la *PCR1* (monocupule) (Tableaux II.2.7 et II.2.8).

Tableau II.2.7. Résultats bactériologiques (*Bact.*) en fonction des résultats positifs ($Ct_{IS6110} < 40$) des différents tests *PCR* (*PCR1*, *PCR2m* et *PCR2b*) dans l'étude comparative 1 entre *PCR1* et *PCR2* (monocupule et bicupule) (n=42).

	<i>PCR1</i> +	<i>PCR2m</i> +	<i>PCR2b</i> +
<i>Bact.</i> +	13	9	15
<i>Bact.</i> -	3	0	3
<i>Total</i>	16	9	18

Par ailleurs, la comparaison entre les résultats des 42 échantillons obtenus avec la *PCR1* et la *PCR2m* montre que parmi les 7 échantillons positifs en *PCR1* mais négatifs en *PCR2m*, 3 avaient un résultat invalide ($Ct_{IS6110} > 40$ et $Ct_{IPCexo} > 30$) en *PCR2m* et 4 étaient négatifs ($Ct_{IS6110} > 40$ et $Ct_{IPCexo} \leq 30$). Concernant ces 4 cas, 3/4 ont été positifs en bactériologie (Tableau II.2.7). De plus, les valeurs des Ct_{IS6110} obtenues en *PCR1* étaient comprises entre 37,0 et 39,4 (37,0 ; 37,9 ; 38,8 et 39,4). En outre, ces 4 échantillons ont été positifs en *PCR2b* ($34,5 < Ct_{IS6110} < 38,4$).

Par ailleurs, l'analyse des différences entre les valeurs de Ct_{IS6110} des 9 échantillons positifs en *PCR1* et *PCR2m* montre que la valeur du Ct_{IS6110} obtenue avec la *PCR2m* était supérieure de 2 Ct à celle de la *PCR1* et dans les 7 autres cas, les valeurs de Ct_{IS6110} étaient similaires.

La *PCR2m* apparaît donc beaucoup moins sensible que la *PCR1*.

En outre, alors que 14 échantillons ont été invalides en *PCR1* ($Ct_{IS6110} > 40$ et $Ct_{IPCendo} > 40$), seulement 5 l'ont été également en *PCR2m* en raison d'une inhibition totale ($Ct_{IS6110} > 40$ et $Ct_{IPCexo} > 40$) (Tableau II.2.8). Néanmoins, 12 échantillons ont présenté une inhibition partielle en *PCR2m* ($Ct_{IS6110} > 40$ and $30 < Ct_{IPCexo} \leq 40$) (Tableau II.2.8). Ainsi, 17 échantillons ont eu un résultat invalide en *PCR2m* (Tableau II.2.8).

Par conséquent, la *PCR2m* comptabilisait beaucoup plus de résultats invalides que la *PCR1*.

Tableau II.2.8. Résultats des échantillons analysés par *PCR1* ($Ct_{IPCendo}$ & Ct_{IS6110}) et par *PCR2m* et *PCR2b* (Ct_{IPCexo} & Ct_{IS6110}) avant toute dilution au 1/10 (si nécessaire), dans l'étude comparative 1 entre *PCR1* (monocupule) et la *PCR2* (monocupule et bicupule) (n=42).

		$Ct_{IS6110} \leq 40$	$Ct_{IS6110} > 40$	Total
<i>PCR1</i> : $Ct_{IPCendo} \leq 40$ (validité) (a)		5	12	<u>17</u>
<i>PCR1</i> : $Ct_{IPCendo} > 40$ (invalidité) (b)		11	14	25
Total (a+b)		16	26	42
<i>PCR2m</i> : $Ct_{IPCexo} \leq 30^*$ (validité) (c)		5	16	<u>21</u>
<i>PCR2m</i> : (invalidité)	$30 < Ct_{IPCexo} \leq 40$ (inhibition partielle)	4	12	16
	$Ct_{IPCexo} > 40$ (inhibition totale)	0	5	5
	$Ct_{IPCexo} > 30$ (d)	4	17	21
Total (c+d)		9	33	42
<i>PCR2b</i> : $Ct_{IPCexo} \leq 30^*$ (validité) (e)		10	16	<u>26</u>
<i>PCR2b</i> : (invalidité)	$30 < Ct_{IPCexo} \leq 40$ (inhibition partielle)	8	3	11
	$Ct_{IPCexo} > 40$ (inhibition totale)	0	5	5
	$Ct_{IPCexo} > 30$ (f)	8	8	16
Total (e+f)		18	24	42

*Remarque concernant ce tableau II.2.8 : la valeur limite supérieure « 30 » correspond à la valeur du Ct_{IPCexo} obtenue pour le NCS majorée de 3 Ct.

Concernant la comparaison des résultats des 42 échantillons analysés avec la *PCR1* et la *PCR2b*, la *PCR2b* a permis la détection de deux échantillons supplémentaires (Ct_{IS6110} de 39,5 & Ct_{IPCexo} de 36,2 et Ct_{IS6110} de 39,9 & Ct_{IPCexo} de 33,6 (inhibition partielle de l' IPC_{exo}), Tableau II.2.8) qui étaient invalides en *PCR1* ($Ct_{IS6110} > 40$ & $Ct_{IPCendo} > 40$, Tableau II.2.8) même après avoir été dilués (seconde analyse $Ct_{IPCendo} > 40$, inhibition de l' IPC_{endo} , Tableau II.2.9). De plus, ces deux échantillons étaient également positifs en bactériologie (Tableaux II.2.7 et II.2.9).

En outre, la combinaison des résultats de bactériologie et de *PCR* par échantillon indique une concordance meilleure entre la *PCR2b* & la bactériologie ($88 \pm 10\%$ (37/42)) qu'entre la *PCR1* & la bactériologie ($76 \pm 13\%$ (32/42)) (Tableau II.2.9).

Tableau II.2.9. Résultats de *PCR1* & *PCR2b*, *PCR1* & *Bact.* et *PCR2b* & *Bact.* dans l'étude comparative 1 entre *PCR1* (monoculture) et *PCR2* (n=42).

		<i>PCR2b</i> +	<i>PCR2b</i> -	Total
<i>PCR1</i> +	<i>Bact.</i> +	13	0	13
	<i>Bact.</i> -	3	0	3
	<i>Bact.</i> + & -	16	0	16
<i>PCR1</i> -	<i>Bact.</i> +	0	1	1
	<i>Bact.</i> -	0	19	19
	<i>Bact.</i> + & -	0	20	20
<i>PCR1</i> invalide	<i>Bact.</i> +	2	1	3
	<i>Bact.</i> -	0	3	3
	<i>Bact.</i> + & -	2	4	6
<i>Bact.</i> +		15	2	17
<i>Bact.</i> -		3	22	25
<i>Bact.</i> + & -		18	24	42

Par ailleurs, la comparaison entre les valeurs de Ct_{IS6110} des échantillons testés avec la *PCR1* et la *PCR2b*, montre des différences significatives : seulement 1/16 des échantillons ont eu des résultats similaires aux deux *PCR* alors que les autres échantillons ont eu des valeurs de Ct_{IS6110} inférieures avec la *PCR2b* (différence d'un Ct).

L'ensemble des ces résultats montre que la *PCR2b* est plus sensible que la *PCR1*.

De plus, 14 échantillons ont été considérés invalides en *PCR1* ($Ct_{IS6110} > 40$ & $Ct_{IPCendo} > 40$) alors que seulement 8 échantillons ont été reconnus invalides en *PCR2b* ($Ct_{IS6110} > 40$ & $Ct_{IPCexo} > 30$), soit 5 avec une inhibition totale ($Ct_{IPCexo} > 40$) et 3 avec une inhibition partielle ($30 < Ct_{IPCexo} \leq 40$), (Tableau II.2.8). Toutefois, ces 3 derniers (3/8) ont été également trouvés invalides en *PCR1*. Après dilution au 1/10, ces 3 échantillons ont été ré-analysés par *PCR2b* et *PCR1* et retrouvés négatifs à ces deux tests (résultats de la *PCR2b* : $Ct_{IS6110} > 40$ & $Ct_{IPCexo} \leq 30$ et résultats de la *PCR1* : $Ct_{IS6110} > 40$ & $Ct_{IPCendo} < 40$) alors que 1/3 a été détecté positif en bactériologie (Tableau II.2.9).

Concernant les 5 autres échantillons (5/8) avec une inhibition partielle en *PCR2b*, ils ont été également reconnus invalides en *PCR1* – l'ensemble des échantillons invalides en *PCR2b* (14) a donc été reconnu invalide en *PCR1* -. Néanmoins, après dilution au 1/10, ces 5 échantillons ont été ré-analysés par *PCR2b* et *PCR1*. Les résultats obtenus ont tous été négatifs en *PCR2b* (résultats concordants avec la bactériologie), alors que 4/5 échantillons ont été trouvés négatifs en *PCR1* ($Ct_{IS6110} > 40$ & $Ct_{IPCendo} < 40$) et 1 seul a été de nouveau rendu invalide en *PCR1* ($Ct_{IS6110} > 40$ & $Ct_{IPCendo} > 40$).

Enfin, les 6 échantillons restant (6/14), invalides seulement en *PCR1*, ont été dilués au 1/10 puis ré-analysés par *PCR1*. Cependant, seulement un échantillon, négatif en *PCR2b* et bactériologie, a été retrouvé négatif à la seconde *PCR1*. Les 5 autres échantillons ont été de nouveau considérés invalides en *PCR1*. Or, parmi ces 5 échantillons invalides en *PCR1*, 2 ont été détectés comme positifs en *PCR2b* (même si inhibition partielle de l'IPC_{exo} ($Ct_{IS6110} < 40$ et $30 < Ct_{IPC_{exo}} \leq 40$) et en bactériologie (Tableau II.2.9) et, 3 ont été détectés négatifs en *PCR2b* alors que 1/3 a été identifié positif en bactériologie (Tableau II.2.9).

En conclusion, par contraste avec la *PCR1*, très peu de résultats *PCR2b* ont été reconnus invalides avant dilution et aucun après dilution.

➤ Etude comparative 2 entre *PCR1* et *PCR2b*

Les deux versions de la *PCR*, *PCR2b* et *PCR1*, ont été comparées à partir de 23 échantillons supplémentaires sélectionnés suivant une gamme de résultats variés (Tableau II.2.3).

Dans le cas C (1 échantillon : *Bact.* positive et *PCR1* négative), nous avons obtenu des résultats négatifs à la fois en *PCR1* et en *PCR2b*. Les deux types de *PCR* n'ont donc pas pu approuver le résultat bactériologique.

Dans le cas D (1 échantillon : *Bact.* positive et *PCR1* invalide), l'échantillon a été trouvé positif en *PCR2b* (Ct de 37,6) mais encore invalide en *PCR1*. Seule la *PCR2b* a alors pu confirmer le résultat de la bactériologie.

Au contraire, dans le cas F (2 échantillons : *Bact.* négative et *PCR1* positive), un échantillon sur deux a été trouvé positif en *PCR2b* (Ct de 36,1) tandis que ces deux échantillons ont été détectés positifs à la seconde *PCR1* (Ct de 38,5 & 38,0). La *PCR1* a donc permis de rendre un diagnostic positif sur un échantillon non confirmé par les autres tests (*PCR2b* et *Bact.*).

Cependant, la *PCR2b*, en accord avec la *PCR1* a permis de déceler un échantillon positif alors qu'il était négatif en bactériologie.

Enfin, dans les autres cas étudiés (A, B et E), les comparaisons entre les valeurs de Ct_{IS6110} des 19 échantillons testés en *PCR2b* et *PCR1*, montrent toutes des différences significatives comme précédemment constatés dans l'étude comparative 1. En effet, la valeur du Ct_{IS6110} de la *PCR2b* était inférieure à celle de la *PCR1* pour un même échantillon (différence d'un Ct).

I.3. Etude de la sensibilité diagnostique de la *PCR2b*

Les résultats bruts indiquent davantage d'animaux positifs en histologie ($88 \pm 8 \%$) et *PCR2b* ($87 \pm 8 \%$) qu'en bactériologie ($82 \pm 10 \%$) (Tableau II.2.10).

La combinaison des résultats des différentes techniques (par animal) montre des concordances de $90 \pm 7 \%$ (60/67), $90 \pm 7 \%$ (60/67), $85 \pm 9 \%$ (57/67) et $82 \pm 10 \%$ (55/67) respectivement entre la *PCR2b* & l'histologie, la *PCR2b* & la bactériologie, la bactériologie & l'histologie, la *PCR2b*, la bactériologie & l'histologie (Tableau II.2.10).

Tableau II.2.10. Résultats de la *PCR2* bicupule (*PCR2b*), de l'histologie (*Hist.*) et de la bactériologie (*Bact.*) obtenus dans l'étude de la sensibilité diagnostique de la *PCR2b* (n=67).

		<i>Hist.</i> +	<i>Hist.</i> -	Total <i>Hist.</i>
<i>PCR2b</i> +	<i>Bact.</i> +	50 ($75 \pm 11 \%$)	3	53 ($79 \pm 10 \%$)
	<i>Bact.</i> -	5	0	5
	Total <i>Bact.</i>	55 ($82 \pm 10 \%$)	3	58 ($87 \pm 8 \%$)
<i>PCR2b</i> -	<i>Bact.</i> +	2	0	2
	<i>Bact.</i> -	2	5 ($8 \pm 6\%$)	7
	Total <i>Bact.</i>	4	5	9
<i>Bact.</i> +		52 ($78 \pm 10 \%$)	3	55 ($82 \pm 10 \%$)
<i>Bact.</i> -		7	5	12
Total <i>Bact.</i>		59 ($88 \pm 8 \%$)	8	67 (100 %)

Remarque : Aucun résultat *PCR2b* invalide après ré-analyse des échantillons invalides (3 animaux) dilués au 1/10.

Concernant les résultats discordants entre les différents tests, 2 animaux ont été détectés positifs en bactériologie et histologie (1/3 avec BAAR) mais négatifs en *PCR2b*. A l'inverse, 5 animaux ont eu des résultats positifs en *PCR2b* mais négatifs en bactériologie (Tableau II.2.10). De plus, 8 animaux positifs en *PCR2b* ont présenté des résultats bactériologiques et histologiques discordants : 3 animaux *Bact.* + & *Hist.* - (1/3 avec des lésions non tuberculeuses et 2/3 sans lésion) et 5 animaux *Bact.* - & *Hist.* + dont 2/5 avec BAAR. Par conséquent, la bactériologie seule n'avait pas permis la détection de deux animaux infectés à partir d'échantillons trouvés positifs en *PCR2b* et ayant présenté des lésions évocatrices de Tb avec des BAAR.

Par contraste, aucun animal n'a été détecté positif en *PCR2b* lorsque les résultats bactériologique & histologique étaient simultanément négatifs. De même, aucun animal n'a été identifié comme positif en bactériologie alors qu'il était simultanément négatif en *PCR2b* & histologie. La *PCR2b* a donc permis de détecter autant d'animaux infectés que la bactériologie.

Par ailleurs, 5 animaux ont obtenu des résultats négatifs aux trois tests (*PCR2b*, *Bact.* et *Hist.*). On peut également remarquer que l'histologie a permis de détecter 2 animaux alors que les autres tests étaient négatifs (*PCR2b* et bactériologie). Au total 60 animaux ($90 \pm 7 \%$) ont eu des résultats positifs à au moins deux des trois tests.

Enfin, aucun résultat de la *PCR2b* n'a été reconnu invalide (après ré-analyse des échantillons invalides dilués au 1/10, si nécessaire).

II. Etudes de la spécificité diagnostique de la PCR

II.1. Etude de la spécificité diagnostique opérationnelle de la PCR

L'analyse des résultats bruts (Tableau II.2.11) permet de vérifier que tous les animaux ont été retrouvés négatifs en bactériologie (100 %), (négativité de la bactériologie directement liée au statut indemne des cheptels).

La PCR a détecté davantage d'animaux négatifs ($97 \pm 5 \%$) que l'histologie ($76 \pm 13 \%$) (Tableau II.2.11).

La combinaison des résultats des différentes techniques (par animal) indique des concordances de $97 \pm 5 \%$ (37/38), $79 \pm 13 \%$ (30/38), $76 \pm 13 \%$ (29/38) et $76 \pm 13 \%$ (29/38) respectivement entre la PCR & la bactériologie, la PCR & l'histologie, la bactériologie & l'histologie et la PCR, la bactériologie & l'histologie (Tableau II.2.11).

Tableau II.2.11. Résultats de la PCR (*PCR1* ou *PCR2b*), de l'histologie (*Hist.*) et de la bactériologie (*Bact.*) obtenus dans l'étude de la spécificité diagnostique opérationnelle de la PCR (n=38).

		<i>Hist.</i> +	<i>Hist.</i> -	Total <i>Hist.</i>
<i>PCR</i> +	<i>Bact.</i> +	0	0	0
	<i>Bact.</i> -	1 ¹	0	1
	Total <i>Bact.</i>	1	0	1
<i>PCR</i> -	<i>Bact.</i> +	0	0	0
	<i>Bact.</i> -	8 ² ($21 \pm 13 \%$)	29 ³	37
	Total <i>Bact.</i>	8	29	37 ($97 \pm 5 \%$)
<i>Bact.</i> +		0	0	0
<i>Bact.</i> -		9	29	38 (100 %)
Total <i>Bact.</i>		9	29 ($76 \pm 13 \%$)	38

¹/ Animal initialement analysé en *PCR1* et a posteriori également trouvé positif en *PCR2b* ;

²/ 5 et 3 animaux analysés respectivement en *PCR1* et *PCR2b* (+ isolement de *M. avium* sur un animal) ;

³/ 14 et 15 animaux analysés en *PCR1* et *PCR2b* respectivement ;

Remarque : 2/38 animaux ont eu des résultats invalides en PCR (*PCR1*) puis ont été retrouvés négatifs après ré-analyse (après dilution) en *PCR1* et *PCR2b*. Ces 2 animaux correspondent à 2 échantillons qui étaient également négatifs en *Hist.* (lésions non tuberculeuses) & *Bact.*

Concernant les résultats discordants entre les différents tests, 8 animaux ont été retrouvés négatifs en bactériologie et *PCR* mais positifs en histologie (2/3 avec BAAR). En outre, 1 seul animal a été détecté positif en *PCR* et histologie. Par ailleurs, aucun animal n'a été trouvé positif en *PCR* alors que négatif en bactériologie et histologie (Tableau II.2.11).

II.2. Etude de la spécificité de la *PCR2b* conditionnelle à l'identification de bactéries n'appartenant pas au MTBC

Les résultats des 68 échantillons (sélectionnés pour l'étude de la spécificité de la *PCR2b* conditionnelle à l'identification de bactéries n'appartenant pas au MTBC) analysés en *PCR2b* sont présentés dans le Tableau II.2.12, en fonction des résultats bactériologiques détaillés obtenus. Ainsi, 100 % des résultats des échantillons de l'étude ont été rendus négatifs en *PCR2b* (Tableau II.2.12). La *PCR2b* n'a donc pas détecté directement à partir de ganglions infectés, de mycobactéries du MAC (*M. avium avium* ou *M. intracellulare*), de mycobactéries atypiques telles que *M. intermedium*, *M. nonchromogenicum*, *M. szulgai* et *M. xenopi*, des bactéries n'appartenant pas au genre *Mycobacterium*, comme *Streptomyces albus*. Au regard de ces 68 résultats négatifs, la spécificité de la *PCR2b* conditionnelle à l'identification de bactéries n'appartenant pas au MTBC semble excellente.

Tableau II.2.12. Résultats des échantillons analysés par *PCR2b* en fonction des différents résultats bactériologiques (janvier 2007-mai 2010) pour l'étude de la spécificité de la *PCR2b* conditionnelle à l'identification de bactéries n'appartenant pas au MTBC (n=68).

		Années					Nombre de Résultats <i>PCR2b</i> Négatifs
		2007	2008	2009	2010*	Total	
47 Mycobactéries	Mycobactéries du complexe <i>M. avium</i> (MAC)	0	1	8	2	11 ²	11
	Mycobactéries atypiques n'appartenant ni à MTBC ni à MAC	0	3	23	12	38 ¹	38
Bactéries n'appartenant pas au genre <i>Mycobacterium</i>		0	0	10	9	19 ³	19
Total		0	4	41	23	68	68

¹/ 1 *M. szulgai* et 1 *M. xenopi* (isolés de blaireaux) ; 1 *M. intermedium* et 13 *M. nonchromogenicum* ;

²/ 1 *M. intracellulare* (isolé d'un rat-kangourou) et 3 *M. avium avium* ; ³/ 1 *Streptomyces albus* ; * : au 25/05/10.

Discussion

I. La sensibilité diagnostique de la PCR

I.1. Etude de la sensibilité de la PCR1

La combinaison des différents résultats obtenus par animal montre que les meilleures concordances étaient constatées entre la PCR1 et l'histologie ($84 \pm 8 \%$). De plus, l'analyse des résultats indique que la PCR1 permet une amélioration (de $33 \pm 14 \%$) de la détection de la Tb, par comparaison à la bactériologie.

De même, le niveau observé de sensibilité de la PCR1 permet de disposer d'une bonne valeur prédictive négative (VPN) de la combinaison PCR1 & histologie car aucun animal n'est positif en *Bact.* et négatif en PCR1 & *Hist.* ; comme d'une bonne VPN de la PCR1 car seulement 1/77 animal positif en *Bact.* & *Hist.* est négatif en PCR1 (également négatif en PCR-Afssa, résultat non présenté).

En outre, 1 animal a été détecté positif en PCR1 mais n'a pas été confirmé positif par la bactériologie et l'histologie. Toutefois, l'échantillon provenant de cet animal a été analysé avec le test PCR IS6110 de l'Afssa-Lerpaz (résultats non présentés) et a été également identifié comme positif. Au regard de ces résultats, la valeur prédictive positive (VPP) de la PCR1 semble satisfaisante.

Comme 60/77 animaux ($78 \pm 9 \%$) ont été retrouvés positifs à au moins deux des trois tests (PCR1, *Hist.* et *Bact.*), ce constat laisse présager que la PCR1 pourrait dans des conditions particulières, participer aisément au processus de prise de décisions réglementaires. En effet, son utilisation conjointe à l'histologie présente une excellente VPN ce qui permettrait une requalification sous huit jours des cheptels suspects suite à la découverte d'une lésion.

Concernant les 9 animaux restants, 4 d'entre eux ont été positifs en histologie et négatifs en PCR1 (également négatifs en PCR-Afssa, résultats non présentés) et bactériologie. Ceci peut s'expliquer soit par un manque de spécificité de l'examen histologique ou soit par un effet échantillon. En effet, quand un échantillon avec une lésion très petite (miliaire) est coupé en deux morceaux (l'un pour l'analyse histologique et l'autre pour les analyses bactériologiques & PCR), il arrive que la lésion n'ait pas été divisée en deux parties similaires et que subséquemment, l'un des morceaux de tissus ne présente pas bactérie détectable. Par conséquent, il est concevable de supposer (pour ces 4 cas) que le morceau d'échantillon

portant la lésion ait été analysé par histologie et que l'autre morceau sans lésion ait été analysé par *PCR1* et bactériologie.

Enfin, les 4 animaux avec des résultats *PCR1* invalides sont restés invalides après une dilution au 1/10. Celui qui était positif en bactériologie et histologie a été également trouvé négatif par PCR-Afssa (résultat non présenté). Il en est de même pour celui qui était seulement positif en histologie (mais sans BAAR). Bien que ces échantillons aux résultats invalides aient été retrouvés négatifs par PCR-Afssa, ces inhibitions de la *PCR1* demeurent un problème à résoudre.

I.2. Etude comparative entre *PCR1* et *PCR2*

Afin de résoudre les problèmes liés aux invalidités incertaines de la *PCR1*, une nouvelle version de la *PCR* utilisant un IPC exogène, la *PCR2* basée sur deux systèmes différents d'amplification l'un en monocupule (*PCR2m*) et l'autre bicupule (*PCR2b*), a été développée, puis comparée à la *PCR1* (monocupule) à partir de deux études successives.

L'étude comparative 1 (entre la *PCR1* et la *PCR2*) a montré que la *PCR2m* engendrait plus de résultats invalides que la *PCR1*. De plus, elle apparaît beaucoup moins sensible que la *PCR1*. De ce fait et comme, de surcroît, elle n'améliore pas la sensibilité de détection du MTBC, elle ne peut pas être utilisée comme test de diagnostic.

Par contre, les résultats combinés de l'étude comparative 1 ont montré que la meilleure concordance était constatée entre la *PCR2b* et la bactériologie ($88 \pm 10\%$). De même, la *PCR2b* permet d'améliorer la sensibilité de détection du MTBC puisqu'elle a permis de détecter deux échantillons supplémentaires, également positifs en bactériologie, par comparaison avec la *PCR1*. De plus, pour un échantillon positif en *PCR1* et en *PCR2b*, le Ct_{IS6110} obtenu avec la *PCR2b* est inférieur d'une unité à celui obtenu avec la *PCR1* dans 15/16 cas. La *PCR2b* semble donc plus sensible que la *PCR1*. De plus, il apparaît moins de résultats invalides en *PCR2b* qu'en *PCR1*. Ces résultats montrent que l'IPC est plus robuste s'il est exogène (par rapport à l'endogène). Enfin, l'IPC exogène permet la mise en évidence des inhibitions partielles grâce au contrôle de la valeur attendue.

Par conséquent, la *PCR2b* pourrait donc remplacer la *PCR1* afin d'améliorer la sensibilité de l'analyse *PCR* et permettre de réduire le pourcentage d'inhibitions voire de les éliminer totalement (dans le cadre de mon étude) après dilution.

Par ailleurs, les résultats de l'étude comparative 2 permettent de confirmer ceux de la première étude. En effet, l'analyse des 23 échantillons supplémentaires a montré que le Ct_{IS6110} obtenu avec la *PCR2b* était inférieur d'une unité pour les 20 échantillons positifs aux deux tests (*PCR* et *Bact.*).

En conclusion, la *PCR2b* nécessitait d'être retenue et utilisée à la place de la *PCR1*. En outre, l'étude comparative entre la *PCR2b* et la PCR-Afssa présentée en Annexe XV, a également montré que ces tests PCR IS6110 étaient tous deux aussi sensibles que la bactériologie.

Toutefois, ces résultats (entre la *PCR2b* et la bactériologie) obtenus à partir d'un nombre réduit d'échantillons devaient être confirmés par une étude plus complète de sensibilité diagnostique de cette *PCR2b*.

I.3. Etude de la sensibilité de la *PCR2b*

La combinaison des différents résultats obtenus par animaux a montré que les meilleures concordances sont retrouvées entre la *PCR2b* (version retenue) et, la bactériologie ou l'histologie (90 ± 7 % dans les deux cas).

De plus, les résultats indiquent que la *PCR2b* détecte autant d'animaux infectés que la bactériologie. De même, la sensibilité de la *PCR2b* est élevée (5 animaux positifs en *PCR2b* mais négatifs en *Bact.*) et permet une bonne VPN de la combinaison *PCR2b* & histologie car aucun animal n'est positif en *Bact.* et négatif en *PCR2b* & *Hist.* ; comme une bonne VPN de la *PCR2b* car seulement 2 animaux positifs *Bact.* & *Hist.* sont négatifs en *PCR2b* (et PCR-Afssa, résultats non présentés).

En outre, comme les résultats *PCR2b* positifs, obtenus dans cette étude, ont toujours été confirmés par l'un et/ou l'autre des tests officiels (*Bact.* ou *Hist.*) – aucun animal négatif en *Bact.* & *Hist.* et positif en *PCR2b* –, alors la VPP de la *PCR2b* est excellente. Par ailleurs, la combinaison des trois tests semble excellente pour améliorer le diagnostic de la Tb car 90 ± 7 % des animaux (60 animaux) ont été détectés positifs à au moins deux des trois tests.

Concernant, les 10 ± 9 % d'animaux restants (soit 10 animaux), deux d'entre eux ont été positifs uniquement en histologie (présence de lésions évocatrices de Tb sans BAAR et négatifs en *PCR2b* & *Bact.* et PCR-Afssa (résultats non présentés)). Ceci peut s'expliquer par un effet échantillon ou un manque de spécificité de l'histologie.

En conclusion, la *PCR2b* semble être une bonne méthode complémentaire de diagnostic de la Tb. Son utilisation en tant que troisième test permettrait de confirmer les résultats histologiques dans le cas de résultats concordants ou d'inciter d'autres processus d'investigations (Cf. § III. relatif aux avantages diagnostiques de la *PCR2b* après évaluation de ses performances (ci-après, page 208)) sans attendre le résultat bactériologique, dans le cas de résultats discordants.

I.4. Evaluation des études de sensibilités diagnostiques des *PCR1* et *PCR2b*

Les deux études de sensibilité diagnostique de la *PCR* ont montré que sa sensibilité était bonne puisque comprise entre celles de l'histologie (la plus sensible) et de la bactériologie. Par ailleurs, les concordances entre les trois techniques ont été significativement meilleures avec la *PCR2b* ($81 \pm 10\%$) plutôt qu'avec la *PCR1* ($66 \pm 11\%$). De même, les pourcentages d'animaux positifs en *PCR* dans chacune des études respectives ont été estimés à $85 \pm 9\%$ pour la *PCR2b* et seulement à $77 \pm 10\%$ pour la *PCR1*. De plus, $73 \pm 11\%$ des animaux (49/67) de l'étude de la sensibilité de la *PCR2b* ont été reconnus positifs par les trois techniques par comparaison avec l'étude de la sensibilité de la *PCR1* où seulement $55 \pm 11\%$ des animaux (42/77) avaient été découverts par les trois techniques.

L'utilisation de la *PCR2* comme troisième test permet donc de découvrir davantage d'animaux infectés.

L'ensemble de ces résultats permet de confirmer que la *PCR2b* est plus sensible que la *PCR1*. De plus, aucun résultat n'ayant été rendu invalide en *PCR2b*, celle-ci engendre moins d'inhibition de l'analyse PCR.

II. La spécificité diagnostique de la *PCR*

II.1. Etude de la spécificité opérationnelle de la *PCR*

Dans cette étude de la spécificité diagnostique opérationnelle de la *PCR*, la combinaison des différents résultats obtenus par animal montre que les meilleures concordances sont retrouvées entre la *PCR* et la bactériologie ($97 \pm 3\%$ (37/38)). En effet, la *PCR* et la bactériologie ont présenté largement plus de résultats concordants que les tests officiels (*Hist.* & *Bact.*, $79 \pm 13\%$ (30/38)).

En outre, comme seulement un animal a été trouvé positif en *PCR* et que de surcroît, il a été confirmé en histologie (aucun animal positif en *PCR* et négatif en *Bact.* et *Hist.*), cela signifie

que la spécificité de la *PCR* ainsi que sa VPP sont excellentes par rapport aux deux tests officiels combinés.

De plus, cet animal positif en *PCR* et histologie mais non confirmé par la bactériologie (en 2006), a été également détecté positif par PCR-Afssa (même valeur de Ct, résultat non présenté). Toutefois, aucune autre recherche n'a été effectuée *a posteriori* dans ce cheptel et, de plus, ce cheptel n'existe plus depuis 2008. Nous pouvons alors suspecter une déficience de détection de la bactériologie. En conséquence, cet animal devrait être ôté de l'effectif de l'étude et la spécificité du test *PCR2b* serait parfaite, de 100 % (37/37).

Enfin, concernant les 8 animaux négatifs en *PCR* et bactériologie mais présentant pourtant des lésions évocatrices de Tb, ces divergences de résultats pourraient s'expliquer soit par un effet échantillon ou soit par un manque de spécificité de l'histologie puisque ces 8 animaux ont été également détectés négatifs par PCR-Afssa (résultats non présentés) et que, de surcroît, *M. avium* a été isolé sur un de ces animaux (Tableau II.2.10).

En conclusion, la *PCR* (*PCR1* ou *PCR2b*) pourrait d'un point de vue diagnostique, être considérée comme très spécifique.

II.2. Etude de la spécificité de la *PCR2b* conditionnelle à l'identification de bactéries n'appartenant pas au MTBC et comparaison avec l'étude de sa spécificité analytique

Les résultats de cette étude montrent que tous les échantillons trouvés négatifs pour le MTBC après identifications bactériologiques, entre janvier 2008 et mai 2010 en Dordogne, ont été également retrouvés négatifs en *PCR2b*.

La spécificité de la *PCR2b* conditionnelle à l'identification de bactéries n'appartenant pas au MTBC (telles que des mycobactéries du MAC (*M. intracellulare*, *M. avium avium*), des mycobactéries atypiques (*M. nonchromogenicum*, *M. szulgai*, *M. intermedium*, *M. xenopi*), et des bactéries n'appartenant pas au genre *Mycobacterium* (*Streptomyces albus*)) semble donc excellente.

De même, l'étude de spécificité analytique du test montre que certaines de ces mycobactéries testées comme *M. intracellulare*, *M. avium avium*, *M. nonchromogenicum*, *M. intermedium* ne sont pas non plus détectées par *PCR2b* à partir de souches isolées. Seule *M. xenopi* a été détectée à partir d'une souche isolée d'un blaireau (PCR « sur souche »).

Concernant les 5 mycobactéries atypiques (*M. flavescens*, *M. gastri*, *M. gordonae*, *M. paraffinicum* et *M. xenopi*) issues d'isolements qui ont été détectées par *PCR2b*, elles

n'ont encore jamais été isolées de tissus bovins en France. De plus, si cela était le cas, leur quantité limite détectable devrait être forte à la différence de *M. bovis*. En effet, pour une même valeur de Ct, la concentration de génome utilisée était beaucoup plus forte (100 fois plus) que celle de *M. bovis* monocopie (par ex., pour un Ct d'environ 35, 10^{-4} ng/ μ l (10^2 fg/ μ l) de *M. bovis* monocopie et 10^{-2} ng/ μ l de mycobactéries atypiques (sauf *M. xenopi*, non quantifiée)). Or, comme la quantité de bacille dans les tissus bovins est largement moins forte qu'après isolement, il est donc improbable que ces mycobactéries soient détectées par *PCR2b*. Cette forte présomption est en partie appuyée par le fait que *M. xenopi* a été détectée par *PCR2b* (et PCR-Afssa) à partir d'une souche isolée d'un ganglion de blaireau mais pas directement à partir du ganglion.

Par conséquent, nous pouvons attester que cette PCR IS6110 présente une excellente spécificité puisqu'elle ne détecte pas les mycobactéries du MAC. Néanmoins, sa spécificité est moins bonne concernant l'absence de détection des mycobactéries atypiques lorsqu'elle est utilisée pour la détection de souche isolée.

Sa spécificité terrain, pour le diagnostic des bovidés semble donc excellente.

III. Les avantages diagnostiques de la *PCR2b* après évaluation de ses performances

Le jugement ne vise pas à comparer la *PCR* à la bactériologie dans le but de la remplacer purement et simplement dans le cadre de la lutte contre la tuberculose bovine, mais de voir quel gain on peut obtenir en y ayant recours tout en combinant judicieusement les méthodes déjà disponibles.

La sensibilité de la *PCR2b* est excellente puisqu'elle est au moins aussi bonne que celle de la bactériologie. De même, sa spécificité est très satisfaisante (pour une utilisation chez les bovins) puisque ce travail a montré l'absence de résultat « faussement positif » dans un contexte réellement « indemne ». Enfin, les résultats de nos études ont montré que la VPP de la *PCR2b* était très satisfaisante vis-à-vis des tests officiels (toutes les PCR+ confirmées par *Hist.* et/ou *Bact.*).

Ainsi, dans le cas d'un résultat positif en *PCR2b*, en accord avec le résultat histologique, l'utilisation de la *PCR2b* comme test de diagnostic complémentaire permettrait d'accélérer la notification d'infection de Tb et par conséquent, un gain de temps d'au moins 2,5 mois par rapport à la bactériologie sur les prises de décision.

De même, un animal non-négatif en IDS et/ou en IDC et sans lésion histologique évocatrice de Tb mais positif au test *PCR2b*, pourrait être déclaré infecté avant même la fin de l'analyse bactériologique.

Par conséquent, l'inclusion de la méthode *PCR2b* pour la gestion des suspicions à l'abattoir ou dans le cadre d'abattage diagnostique, permettrait de raccourcir considérablement les délais de confirmation ce qui constitue un avantage opérationnel crucial.

En outre, dans le cas d'un animal, suspecté à l'abattoir mais négatif en histologie, issu d'un cheptel qualifié indemne de Tb et en l'absence d'animaux complémentaires positifs en IDT dans ce cheptel, la méthode *PCR2b* serait fortement utile afin d'éviter d'attendre le résultat bactériologique pour prendre une décision sur l'état sanitaire du cheptel au regard de la Tb (restitution de sa qualification ou déclaration d'infection). Toutefois, la VPN de la méthode *PCR* n'est pas suffisante pour qu'un résultat négatif en *PCR2b* soit utilisable seul quel que soit le contexte épidémiologique : nécessité impérieuse d'un contexte très favorable*.

De plus, ce résultat négatif en *PCR2b* devrait obligatoirement concorder avec celui de l'histologie puisque *M. bovis* n'a jamais été mise en évidence dans cette étude chez un animal négatif en histologie et *PCR* (*PCR2b* ou *PCR1*). Ainsi, la combinaison de résultats négatifs en *PCR2b* & histologie pourrait, seulement dans un contexte très favorable*, rendre possible la requalification du cheptel sans attendre le résultat bactériologique.

Par conséquent, la *PCR2b* permettrait en complément de l'histologie et de la bactériologie, d'améliorer le diagnostic règlementaire actuel de la Tb (AM du 15 septembre 2003 modifié* ; (Cf. Figures II.1.3 et II.1.4, arbres décisionnels)).

Cependant, la bactériologie reste un outil indispensable en épidémiologie moléculaire (typage des souches isolées) ainsi qu'un outil de confirmation définitive de l'infection par *M. bovis* irréfutable en cas de litige.

* **Contexte très favorable** : soit un cheptel indemne de Tb depuis plusieurs années (aucun animal déclaré infecté (bactériologie positive) depuis 2001), provenant d'une zone indemne de Tb et ne présentant aucun lien épidémiologique (voisinage, introduction) avec un cheptel infecté.

Conclusion

L'objectif du travail exposé dans ce sous-chapitre était d'évaluer sur le terrain la sensibilité et la spécificité opérationnelle de la méthode PCR IS6110 de LSI par comparaison avec la bactériologie et l'histologie.

La version finale de cette *PCR* fondée sur l'utilisation d'un IPC exogène et d'un système d'amplification en bicupule (*PCR2b*) a été démontrée comme la plus sensible et celle qui permet d'éviter des résultats invalides en *PCR* en l'absence d'inhibition de l'analyse.

En outre, la *PCR2b* permet de détecter autant d'animaux infectés que la bactériologie et sa VPP est excellente. De même, elle présente une excellente spécificité diagnostique.

En conclusion, au regard de ces résultats, cette méthode *PCR* apparaît être un outil rapide et fiable de diagnostic de la Tb qui, utilisée en complément des tests officiels, pourrait améliorer considérablement le diagnostic règlementaire (AM du 15 septembre 2003 modifié*). Ainsi, la méthode *PCR* permettrait des prises de décisions plus précoces, dans des cas particuliers définis. Néanmoins, la bactériologie reste essentielle pour les enquêtes épidémiologiques et en cas de litige.