



HAL
open science

Apport de l'épidémiologie dans le choix des outils d'aide à la prise de décision sanitaire en santé animale : évaluation des tests de dépistage en santé animale

Anne Praud

► **To cite this version:**

Anne Praud. Apport de l'épidémiologie dans le choix des outils d'aide à la prise de décision sanitaire en santé animale : évaluation des tests de dépistage en santé animale. Santé publique et épidémiologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA11T068 . tel-00783710

HAL Id: tel-00783710

<https://theses.hal.science/tel-00783710v1>

Submitted on 1 Feb 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

REMERCIEMENTS

A Mesdames et Messieurs les membres du jury,
Monsieur Pascal Hendrikx, président du jury,
Monsieur Christian Ducrot et Monsieur Jean-Pierre Ganière, rapporteurs,
Madame Jacquemine Vialard et Monsieur Yann Le Strat, examinateurs,
Pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse.

A Madame Laurence Meyer et Monsieur Bruno Garin-Bastuji,
Pour avoir accepté de diriger cette thèse,
Pour la liberté et la confiance qu'ils m'ont accordées au cours de mes travaux,
Pour leur gentillesse et leurs conseils avisés.

Aux membres de mon comité de suivi de thèse, aux personnels des laboratoires de référence
brucellose et tuberculose, des laboratoires vétérinaires départementaux et des directions
départementales de protection des populations de la Côte d'Or, de la Dordogne et de l'Hérault,
Pour leur aide et le temps qu'ils m'ont consacré.

Aux membres de l'Unité EpiMAI et de l'Unité Maladies Contagieuses,
Et en particulier à Madame Barbara Dufour,
Pour m'avoir permis de faire mes premiers pas dans le monde de la recherche et de l'enseignement.

... Un grand merci ...

Aux vet-girls : Amélie, Elodie, Hélène, Karen et Noémie,

Nous voilà à présent vétérinaires pour chiens et chats, chevaux, pandas ou autres bestioles improbables... en couple, parfois mariées ou mamans... Que de chemin parcouru depuis cette première semaine de P2 où nous avons sympathisé sur les bancs de l'amphi Bourgelat ! Merci pour votre soutien, votre humour, nos longues discussions sur des sujets un peu, beaucoup ou pas du tout sérieux, nos soirées-crêpes et nos chorégraphies aléatoires spéciales-mariages...

A ma mère,

Détentriche du titre de Super maman pour la 30^{ème} année consécutive, tu excelles à présent dans l'art d'être grand-mère,

Merci pour ton soutien à toute épreuve, ton amour et notre complicité.

A Patrick, l'Homme de ma vie, et à Raphaël notre trésor,

Patrick, merci pour ton amour, ta patience et ta présence à mes côtés au cours de ces trois années riches en événements personnels et professionnels pour nous deux. Je suis heureuse de partager ma vie avec toi.

Raphaël, tu es le plus beau de nos projets. Merci pour ta patience (relative) alors que je finissais de rédiger ce manuscrit. Redécouvrir le monde à travers tes grands yeux curieux de tout est un émerveillement quotidien.

VALORISATION DES TRAVAUX

❖ PUBLICATIONS DANS DES REVUES INTERNATIONALES A COMITE DE LECTURE

PRAUD A., GIMENEZ O., ZANELLA G., DUFOUR B., POZZI N., ANTRAS V., MEYER L., GARIN-BASTUJI B. (2012) Estimation of sensitivity and specificity of five serological tests for the diagnosis of porcine brucellosis. *Preventive Veterinary Medicine*, **104**: 94-100.
(cf. [Annexe 1](#))

PRAUD A., CHAMPION J.L., CORDE Y., DRAPEAU A., MEYER L., GARIN-BASTUJI B. (2012). Assessment of diagnostic sensitivity and specificity of an indirect ELISA kit for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *BMC Veterinary Research*, **8**: 68.
(cf. [Annexe 2](#))

❖ SOUSSIONS DANS DES REVUES INTERNATIONALES A COMITE DE LECTURE

PRAUD A., GIMENEZ O., ZANELLA G., DUFOUR B., POZZI N., ANTRAS V., MEYER L., GARIN-BASTUJI B. Evaluation of five serological tests for the diagnosis of porcine brucellosis in French Polynesia. *Tropical Animal Health and Production* (Accepté sous réserve de modifications).
(cf. [Annexe 3](#))

PRAUD A., BOSCHIROLI M.L., BENET J.J., MEYER L., GARIN-BASTUJI B., DUFOUR B. Evaluation of the efficiency of the gamma interferon test used in series after SICCT for the diagnosis of bovine tuberculosis in Côte d'Or (France). *Transboundary and Emerging Diseases* (En revision).
(cf. [Annexe 4](#))

❖ AUTRES PUBLICATIONS

PRAUD A., GIMENEZ O., ZANELLA G., DUFOUR B., POZZI N., ANTRAS V., MEYER L., GARIN-BASTUJI B. (2010) Comparaison de deux méthodes d'évaluation des caractéristiques de cinq tests sérologiques de dépistage de la brucellose porcine. *Epidémiologie et santé animale*, **54** : 105-118.

PRAUD A., DHE J., DJAILEB I.D., MENDEZ GOMEZ J.L., BENET J.J., DUFOUR B. (2012) Rapport d'analyse des données de dépistage de la tuberculose bovine en vue d'une évaluation des caractéristiques de l'interféron gamma et de son utilisation dans les schémas décisionnels, Unité EpiMAI, ENVA/ANSES, 52 p.

❖ COMMUNICATIONS LORS DE CONGRES INTERNATIONAUX

PRAUD A., CHAMPION J.L., MEYER L., GARIN-BASTUJI B. Preliminary study towards the validation of an alternative serological test detecting *Brucella ovis* infection in sheep for trade. Brucellosis 2011, International Research Conference Including the 64th Brucellosis Research Conference, Buenos Aires (Argentine), 21-23 septembre 2011.

Prix du meilleur poster de la session "Innovations in Diagnostic Procedures"

PRAUD A., MEYER L., GARIN-BASTUJI B. Estimation of sensitivity and specificity of five serological tests for the diagnosis of porcine brucellosis. Brucellosis 2011, International Research Conference Including the 64th Brucellosis Research Conference, Buenos Aires (Argentina), 21-23 septembre 2011.

PRAUD A., DUFOUR B., BENET J.J., MEYER L., GARIN-BASTUJI B., BOSCHIROLI M.L. Assessment of the sensitivity and specificity of gamma–interferon test for the diagnosis of bovine tuberculosis and evaluation of its use in screening schemes in France. ISVEE 2012, Maastricht (Pays-Bas), 20-24 août 2012.

❖ COMMUNICATIONS LORS DE CONGRES FRANCOPHONES

PRAUD A., GIMENEZ O., ZANELLA G., DUFOUR B., POZZI N., ANTRAS V., MEYER L., GARIN-BASTUJI B. Dépistage de la brucellose porcine : évaluation des caractéristiques de cinq tests sérologiques par deux approches, Journées de l'AEEMA, Maisons-Alfort (France), 21 mai 2010.

INDEX DES FIGURES

FIGURE 1 : EVOLUTION DE LA SENSIBILITE TROUPEAU D'UN TEST EN FONCTION DE SA SENSIBILITE INDIVIDUELLE (Se_i) ET DU NOMBRE D'INDIVIDUS INFECTES TESTES	- 34 -
FIGURE 2 : EVOLUTION DE LA SPECIFICITE TROUPEAU D'UN TEST EN FONCTION DE SA SPECIFICITE INDIVIDUELLE (Sp_i) ET DU NOMBRE D'INDIVIDUS INDEMNES TESTES.....	- 35 -
FIGURE 3 : DISTRIBUTION DES RESULTATS DANS LE CAS D'UN TEST « REEL » EN FONCTION DU STATUT INFECTIEUX DES INDIVIDUS..	- 37 -
FIGURE 4 : VARIATIONS DE SENSIBILITE ET DE SPECIFICITE D'UN TEST SELON LE SEUIL DE POSITIVITE CHOISI	- 37 -
FIGURE 5 : COURBE ROC	- 38 -
FIGURE 6 : AUC ET COMPARAISON DE L'EFFICACITE DE TESTS.....	- 39 -
FIGURE 7 : ASSOCIATION DE DEUX TESTS EN SERIE (SCHEMA DECISIONNEL « ET »).....	- 40 -
FIGURE 8 : ASSOCIATION DE DEUX TESTS EN PARALLELE (SCHEMA DECISIONNEL « OU »)	- 40 -
FIGURE 9 : UTILISATION DU TEST ET MISE EN ŒUVRE DE LA DECISION SANITAIRE SELON LA PROBABILITE PRE-TEST DE LA MALADIE ..	- 52 -
FIGURE 10 : RESULTATS D'UNE ENQUETE DE DEPISTAGE SEROLOGIQUE DE LA BRUCELLOSE PORCINE CHEZ LE SANGLIER REALISEE DANS CINQ DEPARTEMENTS FRANÇAIS EN 2009 ET 2010 (NOMBRE D'ANIMAUX ET POURCENTAGES D'ANIMAUX INFECTES). (D'APRES PAYNE <i>ET AL.</i> , 2011)	- 60 -
FIGURE 11 : REPARTITION GEOGRAPHIQUE DES FOYERS DE BRUCELLOSE PORCINE EN ELEVAGE PORCIN ENTRE 1993 ET 2010 (D'APRES BRONNER <i>ET AL.</i> , 2011).....	- 61 -
FIGURE 12 : SENSIBILITES ET SPECIFICITES DES CINQ TESTS ETUDIES EN FRANCE METROPOLITAINE	- 78 -
FIGURE 13 : SENSIBILITES ET SPECIFICITES DES CINQ TESTS ETUDIES EN POLYNESIE FRANÇAISE.....	- 78 -
FIGURE 14 : EVOLUTION DES CONCORDANCES DES RESULTATS POSITIFS ET NEGATIFS AUX TESTS FC ET I-ELISA SELON LE SEUIL DE POSITIVITE CHOISI POUR L'I-ELISA (% DO)	- 97 -
FIGURE 15 : EVOLUTION DE L'INCIDENCE, DE LA PREVALENCE ET DES TAUX D'INCIDENCE ET DE PREVALENCE DE LA TUBERCULOSE BOVINE EN FRANCE, DE 1995 A 2010 (D'APRES FEDIAEVSKY <i>ET AL.</i> , 2011)	- 107 -
FIGURE 16 : INCIDENCE DES FOYERS DE TUBERCULOSE BOVINE DANS LES DEPARTEMENTS FRANÇAIS DURANT L'ANNEE 2010 (D'APRES FEDIAEVSKY <i>ET AL.</i> , 2011)	- 108 -
FIGURE 17 : RYTHME DE DEPISTAGE DE LA TUBERCULOSE BOVINE DANS LES DEPARTEMENTS DE FRANCE METROPOLITAINE AU COURS DE L'ANNEE 2010 (D'APRES FEDIAEVSKY <i>ET AL.</i> , 2011).....	- 110 -
FIGURE 18 : COURBE ROC POUR LE TEST BOVIGAM® ETUDIE EN COTE D'OR	- 131 -
FIGURE 19 : COURBE ROC POUR LE TEST BOVIGAM® ETUDIE EN CAMARGUE.....	- 132 -
FIGURE 20 : COURBE ROC POUR LE TEST ESAT ETUDIE EN COTE D'OR.....	- 132 -

INDEX DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : PRINCIPALES MALADIES DONT LA FRANCE A ETE DECLAREE OFFICIELLEMENT INDEMNIE AU COURS DES VINGT DERNIERES ANNEES (1990 - 2010)	- 26 -
TABLEAU 2 : COMBINAISONS POSSIBLES A L'ISSUE D'UN TEST DE DEPISTAGE, SELON LE RESULTAT AU TEST ET LE STATUT DU SUJET VIS-A-VIS DE LA MALADIE.....	- 33 -
TABLEAU 3 : SENSIBILITE ET SPECIFICITE DE L'ASSOCIATION DE DEUX TESTS EN SERIE, SELON L'EXISTENCE (OU NON) D'UNE RELATION DE DEPENDANCE CONDITIONNELLE ENTRE LES TESTS.....	- 41 -
TABLEAU 4 : SENSIBILITE ET SPECIFICITE DE L'ASSOCIATION DE DEUX TESTS EN PARALLELE, SELON L'EXISTENCE (OU NON) D'UNE RELATION DE DEPENDANCE CONDITIONNELLE ENTRE LES TESTS.....	- 41 -
TABLEAU 5 : CONTEXTES D'UTILISATION DES OUTILS D'AIDE A LA DECISION SANITAIRE : APPLICATIONS CHOISIES DANS LA THESE	- 54 -
TABLEAU 6 : ESTIMATION PAR META-ANALYSE DE LA SENSIBILITE ET DE LA SPECIFICITE DE QUATRE TYPES DE TESTS DE DEPISTAGE DE LA BRUCELLOSE PORCINE (D'APRES EFSA, 2009).....	- 63 -
TABLEAU 7 : PROBABILITES CONDITIONNELLES POUR UN MODELE INCLUANT CINQ TESTS DEPENDANTS	- 69 -
TABLEAU 8 : VALEURS MOYENNES DE SENSIBILITE ET DE SPECIFICITE DISPONIBLES DANS LA LITTERATURE* POUR LES QUATRE CATEGORIES DE TESTS ETUDIEES.....	- 71 -
TABLEAU 9 : PARAMETRES DES DISTRIBUTIONS BETA(A,B) UTILISEES COMME HYPOTHESES A PRIORI POUR LES SENSIBILITES ET LES SPECIFICITES DES TESTS ETUDIES.....	- 71 -
TABLEAU 10 : RESULTATS CROISES AUX CINQ TESTS DE DEPISTAGE DE LA BRUCELLOSE PORCINE CHEZ 5725 PORCS METROPOLITAINS DANS CHACUNE DES DEUX SOUS-POPULATIONS ETUDIEES.....	- 72 -
TABLEAU 11 : RESULTATS D'ESTIMATION DES SENSIBILITES ET SPECIFICITES DES TESTS ETUDIES EN FRANCE METROPOLITAINE PAR UNE APPROCHE BAYESIENNE.....	- 73 -
TABLEAU 12 : RESULTATS CROISES AUX CINQ TESTS DE DEPISTAGE DE LA BRUCELLOSE PORCINE CHEZ 1471 PORCS POLYNESIENS DANS CHACUNE DES DEUX SOUS-POPULATIONS ETUDIEES.....	- 76 -
TABLEAU 13 : RESULTATS D'ESTIMATION DES SENSIBILITES ET SPECIFICITES DES TESTS ETUDIES EN POLYNESIE FRANÇAISE PAR UNE APPROCHE BAYESIENNE.....	- 77 -
TABLEAU 14 : PARAMETRES DES DISTRIBUTIONS BETA(A,B) UTILISEES COMME PRIORS POUR L'ESTIMATION DES PARAMETRES D'INTERET	- 95 -
TABLEAU 15 : RESULTATS CROISES AUX DEUX TESTS CHEZ 4 599 BELIERS DU SUD DE LA FRANCE	- 97 -
TABLEAU 16 : LISTE DES ETATS MEMBRES DE L'UE OFFICIELLEMENT INDEMNES DE TUBERCULOSE BOVINE	- 107 -
TABLEAU 17 : DEFINITION REGLEMENTAIRE D'UN TROUPEAU BOVIN SUSPECT D'ETRE INFECTE DE TUBERCULOSE : OBSERVATION DES RESULTATS SUIVANTS SUR UN ANIMAL DU TROUPEAU.....	- 111 -
TABLEAU 18 : DEFINITION REGLEMENTAIRE D'UN TROUPEAU BOVIN INFECTE DE TUBERCULOSE : OBSERVATION DES RESULTATS SUIVANTS SUR UN MEME ANIMAL DU TROUPEAU	- 111 -
TABLEAU 19 : INTERPRETATION DES RESULTATS DU DOSAGE DE L'INTERFERON GAMMA AU LABORATOIRE VETERINAIRE DEPARTEMENTAL (LVD) DE COTE D'OR.....	- 118 -
TABLEAU 20 : VALEURS DE SENSIBILITE ET DE SPECIFICITE DISPONIBLES DANS LA LITTERATURE* POUR LES TROIS TESTS ETUDIES (INTERVALLES DE CONFIANCE A 95%).....	- 125 -
TABLEAU 21 : PARAMETRES DES DISTRIBUTIONS BETA (A,B) A PRIORI	- 126 -
TABLEAU 22 : RESULTATS DE SENSIBILITE OBTENUS PAR ESTIMATION DIRECTE EN COTE D'OR	- 128 -
TABLEAU 23 : RESULTATS DE SPECIFICITE OBTENUS PAR ESTIMATION DIRECTE EN COTE D'OR	- 128 -
TABLEAU 24 : RESULTATS DE SENSIBILITE OBTENUS PAR ESTIMATION DIRECTE EN DORDOGNE	- 129 -
TABLEAU 25 : RESULTATS DE SPECIFICITE OBTENUS PAR ESTIMATION DIRECTE EN DORDOGNE	- 130 -
TABLEAU 26 : RESULTATS DE SENSIBILITE OBTENUS PAR ESTIMATION DIRECTE EN CAMARGUE	- 130 -
TABLEAU 27 : RESULTATS DE SPECIFICITE OBTENUS PAR ESTIMATION DIRECTE EN CAMARGUE	- 130 -
TABLEAU 28 : RESULTATS CROISES D'IDC ET D'IFN DE 2871 ANIMAUX DE COTE D'OR	- 133 -
TABLEAU 29 : RESULTATS CROISES D'IDS ET D'IFN DE 1788 ANIMAUX DE COTE D'OR.....	- 134 -
TABLEAU 30 : RESULTATS CROISES D'IDS ET D'IDC DE 1787 ANIMAUX DE COTE D'OR	- 134 -
TABLEAU 31 : ESTIMATION DES SENSIBILITES DE L'IDS, DE L'IDC ET DE L'IFN GAMMA, DE LEURS COVARIANCES ET DE LA SPECIFICITE DE L'IFN PAR UNE APPROCHE BAYESIENNE : ETUDE EN COTE D'OR	- 134 -
TABLEAU 32 : SENSIBILITES ET RISQUES D'ERREUR PAR DEFAUT COMPARES DES DEUX SCHEMAS DECISIONNELS ETUDIES (ETUDE DU PROTOCOLE APPLIQUE EN COTE D'OR).....	- 135 -
TABLEAU 33 : RESULTATS CROISES D'IDS ET D'IFN DE 1500 ANIMAUX DE DORDOGNE	- 136 -

TABLEAU 34 : ESTIMATION DES SENSIBILITES DE L'IDS ET DE L'IFN GAMMA, DE LEUR COVARIANCE ET DE LA SPECIFICITE DE L'IFN PAR UNE APPROCHE BAYESIENNE : ETUDE EN DORDOGNE	- 136 -
TABLEAU 35 : SENSIBILITE ET RISQUE D'ERREUR PAR DEFAUT LIES A L'UTILISATION DU PROTOCOLE APPLIQUE EN DORDOGNE	- 136 -
TABLEAU 36 : RESULTATS DE DEUX ETUDES RECENTES PORTANT SUR LA COMPARAISON DES CARACTERISTIQUES DE L'IFN ET DES INTRADERMOTUBERCULINATIONS PAR UNE APPROCHE BAYESIENNE	- 143 -

TABLE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : PRAUD A., GIMENEZ O., ZANELLA G., DUFOUR B., POZZI N., ANTRAS V., MEYER L., GARIN-BASTUJI B. (2012) ESTIMATION OF SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF FIVE SEROLOGICAL TESTS FOR THE DIAGNOSIS OF PORCINE BRUCELLOSIS. <i>PREVENTIVE VETERINARY MEDICINE</i> , 104: 94-100.....	- 179 -
ANNEXE 2 : PRAUD A., CHAMPION J.L., CORDE Y., DRAPEAU A., MEYER L., GARIN-BASTUJI B. (2012). ASSESSMENT OF DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF AN INDIRECT ELISA KIT FOR THE DIAGNOSIS OF <i>BRUCELLA OVIS</i> INFECTION IN RAMS. <i>BMC VETERINARY RESEARCH</i> , 8: 68.....	- 186 -
ANNEXE 3 : PRAUD A., GIMENEZ O., ZANELLA G., DUFOUR B., POZZI N., ANTRAS V., MEYER L., GARIN-BASTUJI B. EVALUATION OF FIVE SEROLOGICAL TESTS FOR THE DIAGNOSIS OF PORCINE BRUCELLOSIS IN FRENCH POLYNESIA. <i>TROPICAL ANIMAL HEALTH AND PRODUCTION (ACCEPTÉ SOUS RESERVE DE MODIFICATIONS)</i>	- 193 -
ANNEXE 4 : PRAUD A., BOSCHIROLI M.L., BÉNET J.J., MEYER L., GARIN-BASTUJI B., DUFOUR B. EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF THE GAMMA INTERFERON TEST USED IN SERIES AFTER SICCT FOR THE DIAGNOSIS OF BOVINE TUBERCULOSIS IN CÔTE D'OR (FRANCE). <i>TRANSBOUNDARY AND EMERGING DISEASES (EN REVISION)</i>	- 199 -
ANNEXE 5 : RECAPITULATIF AU 1 ^{ER} JANVIER 2012 DES ETUDES D'ÉVALUATION DE TESTS DE DEPISTAGE DE MALADIES ANIMALES INFECTIEUSES PAR UNE APPROCHE BAYESIENNE.....	- 215 -
ANNEXE 6 : PRINCIPES GENERAUX DES TESTS SEROLOGIQUES DE DEPISTAGE DE LA BRUCELLOSE ETUDIÉS.....	- 216 -
ANNEXE 7 : PROBABILITES DE SURVENUE DES COMBINAISONS DE RESULTATS A CINQ TESTS DEPENDANTS DANS UNE POPULATION.....	- 219 -
ANNEXE 8 : EXPRESSION DES PARAMETRES D'UN MODELE PERMETTANT L'ESTIMATION DES CARACTERISTIQUES DE CINQ TESTS DEPENDANTS DANS UNE POPULATION EN FONCTION DES PROBABILITES CONDITIONNELLES DES COMBINAISONS DE RESULTATS AUX CINQ TESTS.....	- 220 -
ANNEXE 9 : EXPRESSION DES COVARIANCES DES SENSIBILITES DE CINQ TESTS DEPENDANTS ETUDIÉS PAR PAIRES DANS UNE POPULATION.....	- 221 -
ANNEXE 10 : EXPRESSION DES COVARIANCES DE SPECIFICITES DE CINQ TESTS DEPENDANTS ETUDIÉS PAR PAIRES DANS UNE POPULATION.....	- 222 -
ANNEXE 11 : CODE WINBUGS UTILISE POUR L'ESTIMATION DES CARACTERISTIQUES DE CINQ TESTS DEPENDANTS DANS UNE POPULATION.....	- 223 -
ANNEXE 12 : ESTIMATION DES COVARIANCES DE SENSIBILITE ET DE SPECIFICITE DES CINQ TESTS DE DEPISTAGE DE LA BRUCELLOSE PORCINE ETUDIÉS PAR PAIRES EN FRANCE METROPOLITAINE.....	- 226 -
ANNEXE 13 : ESTIMATION DES SENSIBILITES ET DE SPECIFICITES DE CINQ TESTS DE DEPISTAGE DE LA BRUCELLOSE PORCINE ETUDIÉS EN FRANCE METROPOLITAINE APRES INCLUSION DES RESULTATS DOUTEUX EN I-ELISA ET/OU EN FPA DANS L'ÉTUDE.....	- 227 -
ANNEXE 14 : ESTIMATION DES SENSIBILITES ET DE SPECIFICITES DE CINQ TESTS DE DEPISTAGE DE LA BRUCELLOSE PORCINE ETUDIÉS EN POLYNESIE FRANÇAISE APRES INCLUSION DES RESULTATS DOUTEUX EN I-ELISA ET/OU EN FPA DANS L'ÉTUDE.....	- 228 -
ANNEXE 15 : CODE WINBUGS UTILISE POUR L'ESTIMATION DES CARACTERISTIQUES DE DEUX TESTS DEPENDANTS DANS UNE POPULATION.....	- 229 -
ANNEXE 16 : ESTIMATION DES CARACTERISTIQUES DE DEUX TESTS DE DEPISTAGE DE L'ÉPIDIDYMITTE CONTAGIEUSE DU BELIER (FC ET I-ELISA) EN INTERPRETANT LES RESULTATS DE L'I-ELISA SELON LES SEUILS RECOMMANDES PAR LE FABRICANT.....	- 230 -
ANNEXE 17 : PRINCIPE DES TESTS ALLERGIQUES DE DEPISTAGE DE LA TUBERCULOSE BOVINE :.....	- 231 -
ANNEXE 18 : PRINCIPE DU TEST DE DOSAGE DE L'INTERFERON GAMMA POUR LE DEPISTAGE DE LA TUBERCULOSE BOVINE.....	- 233 -
ANNEXE 19 : LOCALISATION DES CANTONS APPARTENANT A LA « ZONE ROUGE » EN COTE D'OR.....	- 235 -
ANNEXE 20 : ARBRE DECISIONNEL UTILISE POUR LA PRISE DE DECISIONS SANITAIRES EN MATIERE DE TUBERCULOSE BOVINE DANS LE DEPARTEMENT DE COTE D'OR.....	- 236 -
ANNEXE 21 : LOCALISATION DES FOYERS DE TUBERCULOSE BOVINE EN DORDOGNE ENTRE 2007 ET 2009.....	- 237 -
ANNEXE 22 : ARBRE DECISIONNEL UTILISE POUR LA PRISE DE DECISIONS SANITAIRES EN MATIERE DE TUBERCULOSE BOVINE DANS LE DEPARTEMENT DE LA DORDOGNE AU COURS DES CAMPAGNES 2009-2010 ET 2010-2011.....	- 238 -
ANNEXE 23 : PROTOCOLE DECISIONNEL PREVU PAR LA REGLEMENTATION EUROPEENNE (DIRECTIVE CE/64/432).....	- 239 -
ANNEXE 24 : DETAIL DES RESULTATS DE L'ESTIMATION DES CARACTERISTIQUES DES TESTS DE DEPISTAGE DE LA TUBERCULOSE BOVINE PAR UNE APPROCHE BAYESIENNE EN COTE D'OR.....	- 240 -
ANNEXE 25 : DETAIL DES RESULTATS DE L'ESTIMATION DES CARACTERISTIQUES DES TESTS DE DEPISTAGE DE LA TUBERCULOSE BOVINE PAR UNE APPROCHE BAYESIENNE EN DORDOGNE.....	- 241 -

TABLE DES ABREVIATIONS

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
APDI : Arrêté préfectoral de déclaration d'infection
APMS : Arrêté préfectoral de mise sous surveillance
AUC : Area under curve (Aire sous la courbe)
DDCSPP : Direction départementale de la cohésion sociale et de la protection des populations
DDPP : Direction départementale de la protection des populations
DGAI : Direction générale de l'alimentation
DIC : Deviance information criterion
ddl : Degré de liberté
DO : Densité optique
EAT : Epreuve à l'antigène tamponné (ou Rose-Bengale)
EDE : Etablissement départemental de l'élevage
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
FAO : Food and Agriculture Organization (of the United Nations)
FC : Fixation du complément
FPA : Fluorescence polarization assay (Test de polarisation de fluorescence)
 γ_{Se} : covariance des sensibilités
 γ_{Sp} : covariance des spécificités
GDS : Groupement de défense sanitaire
HSR : Hypersensibilité retardée
IC : Intervalle de confiance
ICr : Intervalle de crédibilité
ID : Intradermotuberculation
IDC : Intradermotuberculation comparative
IDS : Intradermotuberculation simple
IFN : Interféron gamma
IgG : Immunoglobuline G
IgM : Immunoglobuline M
LNR : Laboratoire national de référence
LPS : Lipopolysaccharide
LVD : Laboratoire vétérinaire départemental
MCMC : Markov Chain Monte Carlo
OAV : Office alimentaire et vétérinaire
OIE : Organisation mondiale de la santé animale
OMS : Organisation mondiale de la santé
ONCFS : Office national de la chasse et de la faune sauvage
ORSEC : Organisation de la réponse de sécurité civile
PCR : Polymerase chain reaction
RBT : Rose Bengal test (EAT)
ROC : Receiver operating characteristics
Se : Sensibilité
 Se_i : Sensibilité individuelle
 Se_T : Sensibilité « troupeau »
SIGAL : Système d'information généralisée de la Direction Générale de l'Alimentation
Sp : Spécificité
 Sp_i : Spécificité individuelle
 Sp_T : Spécificité « troupeau »
UE : Union européenne

VPP : Valeur prédictive positive
VPN : Valeur prédictive négative

TABLE DES MATIERES

INDEX DES FIGURES	- 9 -
INDEX DES TABLEAUX	- 11 -
TABLE DES ANNEXES	- 13 -
TABLE DES ABREVIATIONS	- 15 -
TABLE DES MATIERES.....	- 17 -
INTRODUCTION	- 21 -
CHAPITRE I : EPIDEMIOLOGIE EN SANTE ANIMALE ET LUTTE CONTRE LES MALADIES ANIMALES INFECTIEUSES MAJEURES.....	- 23 -
1 APPROCHE EPIDEMIOLOGIQUE DE LA SANTE ANIMALE ET LUTTE CONTRE LES MALADIES ANIMALES INFECTIEUSES.....	- 25 -
1.1 CRISES SANITAIRES ET ESSOR DE L'EPIDEMIOLOGIE ANIMALE.....	- 25 -
1.2 PRINCIPES DE LUTTE CONTRE LES MALADIES INFECTIEUSES ANIMALES ET CONCEPT D'ELEVAGE « OFFICIELLEMENT INDEMNÉ » D'UNE MALADIE REGLEMENTEE.....	- 27 -
2 PREREQUIS ET OUTILS NECESSAIRES A LA CONCEPTION D'UN DISPOSITIF DE LUTTE	- 30 -
3 LE TEST DE DEPISTAGE : UN OUTIL MAJEUR DANS LA LUTTE CONTRE LES MALADIES INFECTIEUSES ANIMALES	- 31 -
3.1 PRINCIPE DES TESTS DE DEPISTAGE ET/OU DE DIAGNOSTIC.....	- 32 -
3.2 EVALUATION DE LA QUALITE D'UN TEST DE DEPISTAGE EN SANTE ANIMALE	- 32 -
3.3 REPRESENTATION GRAPHIQUE DE L'EFFICACITE D'UN TEST ET DETERMINATION D'UNE VALEUR SEUIL OPTIMALE	- 36 -
3.4 UTILISATION DE SEQUENCES DE TESTS DE DEPISTAGE ASSOCIES	- 39 -
3.5 NOTION DE « GOLD STANDARD » ET DE « TEST DE REFERENCE ».....	- 42 -
4 ETUDE DES OUTILS DISPONIBLES POUR LA DETECTION D'UNE MALADIE : ESTIMATION DES CARACTERISTIQUES D'UN TEST SUR LE TERRAIN	- 43 -
4.1 METHODES DISPONIBLES	- 43 -
4.2 ESTIMATION DIRECTE DES CARACTERISTIQUES DES TESTS : CHOISIR UNE REFERENCE	- 43 -
4.3 ESTIMATION DES CARACTERISTIQUES D'UN TEST EN L'ABSENCE DE REFERENCE	- 44 -
4.4 LES MODELES A CLASSE LATENTE	- 45 -
4.5 ESTIMATION DES PARAMETRES DU MODELE PAR UNE APPROCHE BAYESIENNE	- 48 -
5 DU SEUIL D'UTILITE DU TEST AU SEUIL DECISIONNEL	- 51 -
6 OBJECTIFS DE LA THESE : ETUDE DES STRATEGIES DECISIONNELLES DE LUTTE CONTRE TROIS MALADIES INFECTIEUSES ANIMALES MAJEURES	- 52 -
CHAPITRE II : ETUDE DES CARACTERISTIQUES DE PLUSIEURS TESTS INDIVIDUELS EN L'ABSENCE DE REFERENCE DANS DES CONTEXTES EPIDEMIOLOGIQUES DIFFERENTS: APPLICATION AU DEPISTAGE DE LA BRUCELLOSE PORCINE	- 57 -
1 INTRODUCTION ET CONTEXTE	- 59 -
1.1 AGENTS PATHOGENES RESPONSABLES DE LA BRUCELLOSE PORCINE ET PHYSIO-PATHOGENIE DE L'INFECTION	- 59 -
1.2 LA BRUCELLOSE PORCINE EN FRANCE : CONTEXTE EPIDEMIOLOGIQUE ET REGLEMENTATION	- 61 -
1.3 MODALITES DIAGNOSTIQUES DE LA BRUCELLOSE PORCINE.....	- 62 -
2 OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	- 64 -
3 MATERIELS ET METHODES.....	- 65 -
3.1 SOURCE DES DONNEES ET ECHANTILLONS	- 65 -

3.2	TESTS ETUDIES	- 66 -
3.3	MODELISATION ET APPROCHE STATISTIQUE : ESTIMATION DES CARACTERISTIQUES DES TESTS DE DEPISTAGE	- 67 -
4	RESULTATS.....	- 71 -
4.1	SENSIBILITE ET SPECIFICITE DES TESTS UTILISES POUR LE DEPISTAGE DE LA BRUCELLOSE PORCINE EN FRANCE METROPOLITAINE.....	- 71 -
4.2	SENSIBILITE ET SPECIFICITE DES TESTS UTILISES POUR LE DEPISTAGE DE LA BRUCELLOSE PORCINE EN POLYNESIE FRANÇAISE	- 75 -
4.3	BILAN : COMPARAISON DES CARACTERISTIQUES DES TESTS DANS LES DEUX ZONES GEOGRAPHIQUES ETUDIEES	- 77 -
5	DISCUSSION	- 79 -
CHAPITRE III : ETUDE DES CARACTERISTIQUES D'UN TEST DE DEPISTAGE INDIVIDUEL EN L'ABSENCE DE REFERENCE ET ELABORATION D'UN SCHEMA DECISIONNEL INCLUANT CE TEST POUR LA CERTIFICATION A L'EXPORT : APPLICATION AU DEPISTAGE DE L'EPIDIDYMITTE CONTAGIEUSE DU BELIER		
1	INTRODUCTION ET CONTEXTE	- 87 -
1.1	AGENT PATHOGENE RESPONSABLE DE L'EPIDIDYMITTE DU BELIER ET PHYSIO-PATHOGENIE DE L'INFECTION	- 87 -
1.2	CONTEXTE EPIDEMIOLOGIQUE ET REGLEMENTATION FRANÇAISE.....	- 88 -
1.3	MODALITES DE DIAGNOSTIC DE L'EPIDIDYMITTE CONTAGIEUSE DU BELIER	- 89 -
2	OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	- 91 -
3	MATERIELS ET METHODES.....	- 91 -
3.1	SOURCE DES DONNEES ET ECHANTILLON.....	- 91 -
3.2	TESTS ETUDIES	- 92 -
3.3	ADAPTATION DES SEUILS DE POSITIVITE	- 93 -
3.4	MODELISATION ET APPROCHE STATISTIQUE.....	- 93 -
4	RESULTATS.....	- 96 -
4.1	ADAPTATION DES SEUILS DE POSITIVITE DE L'I-ELISA.....	- 96 -
4.2	PREVALENCE DANS LA POPULATION ETUDIEE	- 97 -
4.3	ESTIMATION DE LA SENSIBILITE ET DE LA SPECIFICITE DES DEUX TESTS	- 98 -
4.4	ETUDE DES DEUX TESTS UTILISES EN ASSOCIATION	- 98 -
5	DISCUSSION	- 98 -
CHAPITRE IV : ETUDE DES CARACTERISTIQUES D'UN TEST DE DEPISTAGE A L'ECHELLE INDIVIDUELLE ET COLLECTIVE EN PRESENCE D'UNE REFERENCE ; REFLEXION SUR LES SEUILS DE POSITIVITE OPTIMAUX ; EVALUATION DE L'ARBRE DECISIONNEL INCLUANT CE TEST : APPLICATION A LA TUBERCULOSE BOVINE. - 103 -		
1	INTRODUCTION ET CONTEXTE	- 105 -
1.1	AGENT PATHOGENE RESPONSABLE DE LA TUBERCULOSE BOVINE ET PHYSIO-PATHOGENIE DE L'INFECTION	- 105 -
1.2	LA TUBERCULOSE BOVINE EN FRANCE: CONTEXTE EPIDEMIOLOGIQUE ET REGLEMENTATION	- 106 -
1.3	MESURES DE LUTTE CONTRE LA TUBERCULOSE BOVINE EN FRANCE ET REGLEMENTATION FRANÇAISE	- 109 -
1.4	MODALITES DU DIAGNOSTIC ANTE-MORTEM DE LA TUBERCULOSE BOVINE	- 111 -
1.5	MODALITES DIAGNOSTIQUES POST-MORTEM	- 114 -
2	OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	- 115 -
3	MATERIELS ET METHODES.....	- 116 -
3.1	SOURCE DES DONNEES UTILISEES	- 116 -
3.2	ESTIMATION DIRECTE DES CARACTERISTIQUES DES TESTS UTILISES EN PROPHYLAXIE POUR LE DEPISTAGE DE LA TUBERCULOSE BOVINE PAR RAPPORT A UNE REFERENCE DISPONIBLE	- 120 -
3.3	ESTIMATION DES SEUILS DE POSITIVITE OPTIMAUX POUR LE TEST DE DOSAGE DE L'INTERFERON GAMMA EN COTE D'OR ET EN CAMARGUE	- 123 -
3.4	ESTIMATION DU RISQUE D'ERREUR PAR DEFAUT LIE A L'APPLICATION DES PROTOCOLES UTILISANT L'IFN EN COTE D'OR ET DORDOGNE ET COMPARAISON AU RISQUE D'ERREUR PAR DEFAUT LIE A L'APPLICATION DE LA DIRECTIVE EUROPEENNE CE/64/432	- 123 -
4	RESULTATS.....	- 127 -

4.1	ESTIMATION DIRECTE DES CARACTERISTIQUES INTRINSEQUES DES TESTS DE DEPISTAGE DE LA TUBERCULOSE BOVINE	- 127 -
4.2	ESTIMATION DES SEUILS DE POSITIVITE OPTIMAUX POUR LE TEST DE DOSAGE DE L'INTERFERON GAMMA EN COTE D'OR ET EN CAMARGUE	- 131 -
4.3	ESTIMATION DU RISQUE D'ERREUR PAR DEFAUT ENGENDRE PAR L'UTILISATION DES PROTOCOLES EXPERIMENTAUX FRANÇAIS INCLUANT L'IFN ET COMPARAISON AU RISQUE D'ERREUR PAR DEFAUT LIE A L'APPLICATION DE LA DIRECTIVE EUROPEENNE CE/64/432	- 133 -
5	DISCUSSION	- 137 -
5.1	ESTIMATION DIRECTE DES CARACTERISTIQUES DES TESTS DE DEPISTAGE DE LA TUBERCULOSE BOVINE	- 137 -
5.2	ETUDE DES SEUILS DE POSITIVITE OPTIMAUX POUR LE DOSAGE DE L'INTERFERON GAMMA	- 141 -
5.3	ESTIMATION DES CARACTERISTIQUES DES TESTS PAR UNE APPROCHE BAYESIENNE	- 142 -
5.4	COMPARAISON DU RISQUE D'ERREUR PAR DEFAUT ENGENDRE PAR L'APPLICATION DES PROTOCOLE ASSOCIANT ID ET IFN AU RISQUE D'ERREUR PAR DEFAUT ENGENDRE PAR L'APPLICATION DE LA DIRECTIVE EUROPEENNE CE/64/432	- 144 -
	CHAPITRE V : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	- 147 -
1	L'ESTIMATION DES CARACTERISTIQUES DU TEST DE DEPISTAGE : UN PRE-REQUIS A LA CONCEPTION ET A L'EVALUATION DES OUTILS D'AIDE A LA PRISE DE DECISIONS SANITAIRES	- 149 -
1.1	BILAN DES TRAVAUX ACCOMPLIS AU COURS DE LA THESE	- 149 -
1.2	SENSIBILITE ET SPECIFICITE : CARACTERISTIQUES « INTRINSEQUES » AU TEST ?	- 149 -
1.3	QUAND LA REFERENCE MANQUE : AVANTAGES ET LIMITES DE L'ESTIMATION DES CARACTERISTIQUES DES TESTS PAR UN MODELE A CLASSE LATENTE IMPLEMENTE PAR UNE APPROCHE BAYESIENNE	- 151 -
2	DE LA PRISE DE DECISION « INTUITIVE » A LA CONCEPTION D'UN OUTIL D'AIDE A LA PRISE DE DECISION SANITAIRE : SIMPLIFIER ET RATIONNALISER UNE STRATEGIE DECISIONNELLE COMPLEXE.....	- 153 -
2.1	DU TEST SIMPLE A L'ARBRE DECISIONNEL : DIVERSITE DES OUTILS D'AIDE A LA PRISE DE DECISION SANITAIRE.....	- 153 -
2.2	AVANTAGES ET LIMITES DES OUTILS D'AIDE A LA PRISE DE DECISION SANITAIRE	- 154 -
3	PERSPECTIVES	- 156 -
3.1	CHOIX DES OUTILS D'AIDE A LA PRISE DE DECISION SANITAIRE EN SANTE ANIMALE : DE LA DIVERSITE DES APPROCHES POSSIBLES	- 156 -
3.2	VERS UNE AMELIORATION DE L'ADAPTATION DES DONNEES COLLECTEES	- 157 -
	CONCLUSION	- 159 -
	BIBLIOGRAPHIE.....	- 161 -
	ANNEXES	- 177 -
	RESUME	- 243 -
	ABSTRACT.....	- 244 -

INTRODUCTION

La lutte contre les maladies animales et les ravages économiques et sanitaires causés par les épizooties ne constituent pas une préoccupation récente pour les pouvoirs publics. En France, les textes de lois se succèdent au cours des XVIII^{ème} et XIX^{ème} siècles pour tenter de remédier aux grands fléaux de la santé animale tels que la peste bovine ou la morve des équidés. Le 21 juillet 1881, le parlement vote la « loi sanitaire » qui accorde aux vétérinaires un rôle important dans l'hygiène publique en leur confiant une mission de surveillance des maladies contagieuses des animaux. Toutefois, ces textes comportent des lacunes et sont difficilement applicables. L'un des principaux écueils est la difficulté d'établir avec certitude l'existence d'une maladie chez un individu. Un député signale, lors d'un débat sur le projet de loi (le 8 mars 1881) : « Vous ne pouvez pas exiger que toutes les fois qu'une bête tombe malade, qu'elle a une apparence de rhume, on appelle le vétérinaire, par la raison qu'il est possible que ce ne soit pas un coryza mais une morve » (Propos rapportés par Hubscher, 2002). Les limites d'un diagnostic basé sur un seul indicateur imparfait (qu'il s'agisse d'un tableau clinique, comme ici, ou du résultat d'un test) sont mises en évidence sans qu'il ne soit possible de les pallier à l'aide des moyens de l'époque. La nécessité de concevoir des outils permettant d'évaluer le risque d'erreur lié au diagnostic et d'aider à la prise de décisions sanitaires sur le terrain apparaît. Cette problématique restera d'actualité jusqu'à aujourd'hui (Greiner et Gardner, 2000), les solutions proposées évoluant au gré des besoins (mise en place de plans de lutte contre les maladies animales, contrôles à l'export des animaux...) et du développement de l'épidémiologie animale (naissance des systèmes d'épidémiosurveillance, approfondissement des connaissances sur les agents pathogènes et les infections dont ils sont responsables, découverte et amélioration des tests de dépistage et de diagnostic, création de méthodes mathématiques d'analyse et de modélisation des résultats obtenus...).

Notre travail est composé de cinq chapitres. Nous verrons dans un premier temps quels sont les enjeux et les modalités de la lutte contre les maladies animales, quels sont les outils épidémiologiques disponibles pour l'élaboration de stratégies décisionnelles et quelles méthodes peuvent permettre l'évaluation de ces outils et leur comparaison. Les trois chapitres suivants constituent une application de ces méthodes, dans des contextes différents correspondant à trois types de situations dans lesquelles il existe un besoin d'aide à la décision sanitaire en santé animale. Le dernier chapitre de ce manuscrit consiste en une discussion générale sur les modalités de choix d'un outil d'aide à la décision sanitaire.

**CHAPITRE I : EPIDEMIOLOGIE EN SANTE ANIMALE ET
LUTTE CONTRE LES MALADIES ANIMALES INFECTIEUSES
MAJEURES**

1 Approche épidémiologique de la santé animale et lutte contre les maladies animales infectieuses

1.1 Crises sanitaires et essor de l'épidémiologie animale

L'épidémiologie des maladies animales est une discipline récente, considérée comme un domaine « à part entière » de la médecine vétérinaire depuis les années 1980 à 1990 (Morris, 1995 ; Blajan, 2005). La survenue de crises sanitaires telles que celle de l'encéphalopathie spongiforme bovine ou, plus récemment, l'influenza aviaire hautement pathogène à virus H5N1 ont largement contribué à son développement et à sa médiatisation. Le mot « épidémiologie » appliqué au domaine de la santé animale fait sa première apparition dans une circulaire ministérielle du 21 mai 1946 intitulée « Documentation épidémiologique » et constituant un guide succinct d'épidémiosurveillance destiné aux directeurs des services vétérinaires départementaux (Blajan, 2005).

Les conséquences des maladies animales peuvent être multiples. Leurs conséquences économiques concernent en premier lieu les élevages infectés : pertes directes de productivité (mortalité, baisse de fertilité, diminution de la production laitière, abattage et saisies éventuelles sur les carcasses), pertes de revenus des activités utilisant les ressources animales, nécessité d'investissement dans des mesures de lutte (pasteurisation du lait, installation de barrières pour limiter les contacts avec la faune sauvage) et pertes indirectes liées au coût des mesures de prévention, d'éventuels traitements et du surcroît de travail associé. Les filières de production sont également touchées en amont (mise en danger d'un patrimoine génétique) comme en aval (commercialisation des denrées alimentaires d'origine animale). Ces conséquences s'étendent aux échanges commerciaux nationaux, intracommunautaires ou internationaux.

D'autre part, l'abattage de cheptels infectés à des fins d'éradication, voire de cheptels non infectés mais situés à proximité d'un foyer pose un problème éthique.

Enfin, dans le cas de maladies zoonotiques, ces conséquences concernent aussi les populations humaines. Certains programmes mis en œuvre en santé animale répondent à une problématique initialement considérée comme relevant de la santé publique « humaine » (par exemple, prévention des toxi-infections alimentaires collectives dues à *Escherichia coli* ou *Salmonella* aux Etats-Unis) (Salman, 2009). Cette proximité entre médecine humaine et vétérinaire est d'ailleurs l'objet du projet « One World, One Health », initié en 2004. Ce projet reprend le concept « One medicine » énoncé par Shwabe au XX^{ème} siècle et reconnaît l'existence de concepts et d'objectifs identiques en

santé humaine et en santé animale et le fait que l'association de ces deux disciplines permette de contribuer à leurs développements respectifs (Zinsstag *et al.*, 2011).

Malgré sa « jeunesse » relative, l'épidémiologie en médecine vétérinaire s'avère être un outil indispensable dans la lutte contre les maladies animales, à l'échelle individuelle comme à l'échelle collective. Les répercussions des maladies animales réglementées peuvent être d'ordre économique, d'ordre éthique et/ou d'ordre sanitaire pour l'Être humain, en raison de l'existence d'un grand nombre de zoonoses plus ou moins sévères (brucellose, tuberculose, rage...). On estime, en l'occurrence, que plus de 70% des maladies humaines émergentes sont d'origine zoonotique (OMS, 2006). La lutte contre les maladies animales constitue donc un enjeu pour la santé animale comme pour la santé publique.

Au cours des dernières décennies, les autorités sanitaires françaises ont mis en œuvre un certain nombre de programmes de lutte contre les maladies animales majeures. Entre 1990 et 2010, la France a acquis le statut de « pays officiellement indemne » vis-à-vis de plusieurs maladies animales réglementées (Tableau 1).

Tableau 1 : Principales maladies dont la France a été déclarée officiellement indemne au cours des vingt dernières années (1990 - 2010)

Maladie	Date d'acquisition du statut officiellement indemne
Fièvre aphteuse	2001
Tuberculose bovine	2001
Brucellose bovine	2005
Rage des carnivores terrestres	2010

Malgré ce bilan très positif, l'expérience montre que les risques de réapparition de foyers de certaines de ces maladies « éradiquées » ne doivent pas être négligés, tout comme le risque d'introduction ou d'émergence de maladies exotiques sur notre territoire, comme l'illustre la récente épizootie de fièvre catarrhale ovine survenue en France.

Le risque d'introduction ou d'émergence de maladies exotiques a considérablement augmenté au cours des dernières années (King et Khabbaz, 2003), en raison d'évolutions sociétales (augmentation des flux de personnes, d'animaux et de matériel sur de longues distances en un temps court, importations d'animaux exotiques [Praud, 2009 ; Praud et Moutou, 2010], modification des pratiques alimentaires) et environnementales (modification des aires d'activité des vecteurs liée aux variations climatiques, déboisement et augmentation des interactions être humain/animal).



Ce constat souligne **l'importance de poursuivre la surveillance des maladies animales déjà éradiquées sur notre territoire, en améliorant les outils de dépistage et en adaptant les protocoles d'aide à la prise de décisions sanitaires** à un contexte de fin d'éradication.

Pour d'autres maladies en revanche, aucun plan de lutte n'a encore été organisé mais l'évolution du contexte épidémiologique peut conduire les pouvoirs publics à initier une politique de dépistage systématique, voire d'éradication. C'est par exemple le cas de maladies considérées comme « émergentes » ou dont les conséquences économiques et/ou sanitaires deviennent préoccupantes, telles que l'Influenza aviaire hautement pathogène à virus H5N1 (Desenclos et De Valk, 2005).

1.2 Principes de lutte contre les maladies infectieuses animales et concept d'élevage « officiellement indemne » d'une maladie réglementée

On considère classiquement que la lutte contre les maladies animales recourt à deux types de méthodes, dites « offensives » (*i.e.* visant à éradiquer la maladie dans les zones ou élevages infectés) et « défensives » (*i.e.* visant à éviter l'introduction de la maladie dans les zones ou élevages indemnes) (Toma *et al.*, 2010).

1.2.1 Théorie de la lutte contre les maladies infectieuses animales ; concepts de luttes offensive et défensive

1.2.1.1 Eradiquer les foyers en cours : organisation de la lutte offensive

La lutte offensive contre une maladie nécessite en premier lieu la détection du foyer. Cette détection peut avoir lieu sur la base de signes cliniques observés par l'éleveur ou le vétérinaire, au cours d'un dépistage systématique sur les animaux du cheptel, à l'abattoir par la mise en évidence de lésions, lors d'un contrôle à la vente ou suite à une enquête mettant en évidence un lien avec un autre cheptel foyer.

Des mesures de limitation sont alors mises en place dans le foyer identifié afin d'éviter la diffusion de l'agent pathogène hors de l'élevage : l'ensemble des animaux du cheptel sont identifiés et recensés et l'exploitation est « bloquée » : aucun animal, produit d'origine animale ou matériel provenant n'est autorisé à sortir de l'exploitation, ni à y entrer. Cette interdiction peut être étendue aux mouvements de personnes dans le cadre de maladies animales très hautement contagieuses et

soumises à plans d'urgence de type ORSEC (Organisation de la Réponse de Sécurité Civile), telles que la fièvre aphteuse.

L'éradication de la maladie au sein du foyer peut être réalisée selon plusieurs modalités :

- abattage de l'ensemble du troupeau dans les plus brefs délais ;
- abattage des infectés au fur et à mesure de leur détection ou « abattage partiel » ;
- plus rarement : conservation des animaux infectés jusqu'à guérison.

Par la suite, un nettoyage suivi d'une ou plusieurs désinfections et d'un vide sanitaire des locaux ayant hébergé les animaux atteints sont réalisés, le cas échéant.

L'utilisation de mesures médicales telles que le traitement des animaux est rare. Celui-ci est par exemple interdit dans le cas de la lutte contre la tuberculose ou la brucellose animale, le risque principal d'une telle pratique étant la persistance de l'agent pathogène à bas bruit chez l'individu traité, la possibilité d'une excrétion chronique avec contamination d'autres animaux ou d'humains et le risque d'émergence de résistances aux antibiotiques.

Une enquête épidémiologique est également mise en œuvre dans le but d'identifier les exploitations, lieux d'hébergement d'animaux ou produits d'origine animale (i) à l'origine de la contamination du foyer index -enquête « amont »- et (ii) ceux susceptibles d'avoir été contaminés par le foyer index -enquête « aval ».

Après éradication du foyer, le cheptel pourra recouvrer sa qualification indemne de la maladie concernée après avoir subi plusieurs séries de tests dont les résultats doivent être négatifs sur l'ensemble des animaux du troupeau.

Ces méthodes « curatives » sont indispensables mais insuffisantes à l'éradication de la maladie en l'absence d'action préventive. Ce deuxième type d'approche est celui de la lutte défensive.

1.2.1.2 Eviter la contamination de cheptels indemnes : organisation de la lutte défensive

Le principe de la lutte défensive est la protection du cheptel contre les maladies dont il est indemne. Les animaux introduits dans le cheptel doivent provenir d'une exploitation qualifiée d'« officiellement indemne » de la maladie, être soumis à un test de dépistage et être mis en quarantaine dans leur cheptel d'arrivée.

La lutte contre l'introduction de l'agent pathogène passe également, dans la mesure du possible, par des précautions vis-à-vis des visiteurs et matériels entrant dans l'exploitation, ainsi que par la limitation des contacts entre le bétail et la faune sauvage. Ce type de mesures (clôtures, filets

de protection...) sont difficiles à mettre en œuvre dans les élevages classiques. Elles sont en revanche plus adaptées aux élevages industriels hors-sol (volailles, porcs).

Des mesures de dépistage périodique sont instaurées pour permettre la détection précoce de la plupart des grandes maladies infectieuses animales. Les modalités du dépistage sont adaptées aux caractéristiques de la maladie, de la situation épidémiologique et du test utilisé. La population « cible » peut être constituée par la totalité des animaux du cheptel ou une fraction de ces derniers, choisie en fonction de leur âge ou d'autres critères épidémiologiques : animaux récemment introduits, reproducteurs.... La périodicité doit être adaptée à la prévalence de la maladie dans la zone concernée en raison de l'influence de ce paramètre sur les valeurs prédictives du test (*cf.* 3.2.1). Enfin, le test utilisé doit détecter de manière satisfaisante les animaux infectés et les animaux indemnes (*cf.* 3.2.1). Pour ce faire, il peut être utilisé individuellement ou sur un groupe d'animaux. A titre d'exemple, le dépistage de la brucellose bovine est réalisé annuellement, à l'aide d'un test collectif réalisé sur le lait de tank dans les élevages laitiers ou sur le sang d'au moins 20% des animaux âgés de plus de 24 mois dans les élevages allaitants.

Les plans de lutte contre certaines maladies réglementées prévoient l'utilisation de la vaccination. Elle peut être utilisée dans un but préventif (exemple de la lutte contre la rage vulpine initiée en France en 1989 à l'aide de vaccins oraux afin d'éviter la contamination entre renards ou de la vaccination contre la fièvre charbonneuse des animaux non atteints présents dans les élevages foyers) ou dans un but suppressif (exemple de la lutte contre la fièvre aphteuse en 2001 au Royaume Uni avec la vaccination dite « périfocale » des animaux des exploitations situées à proximité des foyers avant leur abattage afin de limiter l'excrétion du virus et d'enrayer sa propagation).

La vaccination pose néanmoins deux problèmes majeurs :

- la distinction entre animaux vaccinés et infectés (vaccin à stratégie « DIVA ») n'est pas toujours possible ;
- la protection conférée par l'immunité vaccinale n'étant pas parfaite, certains animaux risquent d'héberger l'agent pathogène à bas bruit et de l'excréter, ce qui représente un risque pour la santé publique.

Aussi, pour un grand nombre de maladies réglementées, l'acquisition du statut d'état « officiellement indemne » de la maladie, et par conséquent la possibilité de commercer avec d'autres pays, requiert l'absence de vaccination des animaux.

1.2.2 De la théorie à la pratique : lutte contre les maladies infectieuses animales en situation de terrain

Historiquement, la lutte contre les maladies infectieuses animales majeures reposait essentiellement sur la mise en œuvre d'une lutte offensive basée sur l'éradication des foyers. De nos jours, la plupart de ces maladies sont en fin d'éradication sur le territoire français et les stratégies défensives prédominent. Cette évolution est bien illustrée par l'historique de la lutte contre la tuberculose bovine en France entre 1955 et 2005 (Bénet *et al.*, 2006). L'unité cible des mesures a également changé : historiquement basée sur une approche individuelle, foyer par foyer, la lutte repose aujourd'hui sur la mise en place de mesures collectives concertées visant à maîtriser les risques sanitaires. Enfin, les plans de lutte s'inscrivent aujourd'hui dans une démarche globale de protection de l'environnement et du consommateur, liant la santé animale à la santé publique.

2 Prérequis et outils nécessaires à la conception d'un dispositif de lutte

La conception d'un protocole de lutte contre une maladie nécessite de disposer d'informations sur les caractéristiques biologiques, cliniques et épidémiologiques de la maladie dans la population concernée, afin de juger de l'opportunité de mettre en œuvre la lutte, et, le cas échéant, de cibler les individus concernés et de choisir les modalités de la lutte. De telles décisions peuvent être prises à différentes échelles : pour certaines maladies enzootiques contre lesquelles aucun plan de lutte officiel n'a été mis en œuvre, elles sont prises par l'éleveur ou le vétérinaire traitant. Au contraire, dans le cas de maladies dont les conséquences économiques ou sanitaires (zoonoses) sont graves, il est fréquent que les pouvoirs publics deviennent les gestionnaires du risque (Seegers *et al.*, 2011).

L'étude d'outils d'aide à la prise de décision sanitaire nécessite donc, entre autres, d'estimer l'incertitude liée à la détection de la maladie. Dans une situation idéale, la détection de la maladie serait réalisable de manière directe et immédiate, sur la base de signes cliniques pathognomoniques exprimés de manière constante chez tous les animaux atteints. En réalité, la détection d'une maladie n'est pas aussi simple. Les individus infectés peuvent exprimer les signes cliniques de manière variable selon l'évolution de la maladie et l'ancienneté de l'infection et ces signes peuvent être plus ou moins spécifiques. Il est alors nécessaire de recourir à l'utilisation de tests de dépistage ou de diagnostic afin d'apporter un appui au clinicien, mais là encore, les résultats obtenus nécessitent une interprétation selon les indices disponibles (fiabilité du test, contexte épidémiologique, profil de l'individu testé...).

La mise en œuvre et la validation de stratégies décisionnelles nécessitent ensuite d'autres analyses, telles que l'étude des conséquences de la lutte et de son efficacité, notamment en termes socio-économiques.



Les outils de dépistage et de diagnostic font partie intégrante de la lutte contre les maladies réglementées, autant dans une optique offensive que dans une optique défensive. L'observation d'un tableau clinique, des résultats d'un test, ou la conjonction de plusieurs critères associés sont autant d'indices permettant de renseigner sur l'état infectieux de l'individu : ce sont des « outils », plus ou moins complexes et fiables.

Mais les questions posées par le clinicien ou le « décideur » sont plus pragmatiques : quel crédit accorder à ces indices et surtout, quelle décision sanitaire appliquer en fonction des objectifs fixés et des résultats obtenus ? Quelles seront les conséquences de la décision ?

Le champ des outils épidémiologiques utilisables pour le choix d'outils d'aide à la prise de décisions sanitaires est extrêmement vaste. Nous avons choisi, au cours de nos travaux, de nous intéresser à l'estimation et à la gestion de la part d'incertitude liée à l'utilisation de tests en tant qu'outils d'aide à la prise de décision. Ce choix est discuté dans le cinquième chapitre de ce manuscrit.

3 Le test de dépistage : un outil majeur dans la lutte contre les maladies infectieuses animales

Comme nous l'avons vu précédemment, les plans de lutte collective contre les maladies infectieuses animales reposent en partie sur l'utilisation de tests fournissant des informations sur le statut des animaux vis-à-vis de la maladie. La connaissance de leurs limites est indispensable à la rationalisation des décisions sanitaires prises sur la base des résultats qu'ils fournissent.

Les objectifs des protocoles de test peuvent être variés (OIE, 2011a) :

- renseigner sur l'absence ou la présence d'une maladie dans une population et évaluer sa prévalence éventuelle (réalisation d'enquêtes ponctuelles ou de dépistages réguliers) ;
- prévenir la diffusion de la maladie par les échanges commerciaux (contrôle à l'introduction d'un nouvel animal dans un élevage ou contrôle d'un lot d'animaux destinés à l'export) ;
- éradiquer une infection dans un cheptel ou une région (identification des cheptels et des animaux infectés, confirmation d'un diagnostic clinique).

3.1 Principe des tests de dépistage et/ou de diagnostic

Les tests de dépistage et/ou de diagnostic peuvent reposer sur la détection de marqueurs de l'infection (présence d'immunoglobulines sériques, réaction allergique) ou sur la recherche de l'agent pathogène incriminé. L'observation de signes cliniques plus ou moins spécifiques peut en elle-même être considérée comme un test, pour lequel on pourra définir une probabilité de conclure à tort ou à raison sur le statut de l'animal. Le résultat fourni par un test peut être exprimé sous forme d'une variable qualitative ou quantitative (Grenier, 1999).

Le dépistage consiste en la « recherche systématique à l'aide d'examens, dans une population, des individus (ou des groupes) atteints par un trouble de santé passé jusque-là inaperçu » (Toma *et al.*, 2010). Le diagnostic en revanche est défini comme « l'identification d'une maladie chez un sujet qui présente des troubles [cliniques] » (Toma *et al.*, 2010). Il est courant d'appliquer un test de dépistage à un effectif important d'animaux (à l'échelle du troupeau), tandis que le test diagnostique est utilisé pour un nombre restreint d'animaux et motivé par leur état clinique.

3.2 Evaluation de la qualité d'un test de dépistage en santé animale

L'interprétation des résultats fournis par un test de dépistage nécessite de connaître à la fois les caractéristiques du test utilisés mais également le contexte épidémiologique dans lequel le dépistage est réalisé.

3.2.1 Caractéristiques d'un test à l'échelle individuelle

La qualité d'un test de dépistage dépend de deux caractéristiques :

- la sensibilité (Se) est l'aptitude du test à donner un résultat positif chez un individu malade ;
- la spécificité (Sp) est l'aptitude du test à donner un résultat négatif chez un individu sain.

Le [Tableau 2](#) indique les différents cas de figure possibles à l'issue du test. L'animal peut être malade (D+) ou sain (D-). Son résultat au test peut être positif (T+) ou négatif (T-).

Tableau 2 : Combinaisons possibles à l'issue d'un test de dépistage, selon le résultat au test et le statut du sujet vis-à-vis de la maladie

	Malade (D+)	Sain (D-)	Total
Résultat positif (T+)	Vrai positif (VP)	Faux positif (FP)	VP + FP
Résultat négatif (T-)	Faux négatif (FN)	Vrai négatif (VN)	VN + FN
Total	VP + FN	VN + FP	VP + FP + VN + FN

La sensibilité et la spécificité sont donc définies comme suit :

$$Se = P(T+ | D+) = VP / (VP + FN)$$

$$Sp = P(T- | D-) = VN / (VN + FP)$$

La sensibilité et la spécificité d'un test sont des valeurs dites « intrinsèques » : elles sont censées demeurer constantes quelle que soit la prévalence de la maladie dans la population d'individus soumis au test (Toma *et al.*, 2010).

Il existe différents indices associant sensibilité et spécificité. Le plus classiquement utilisé est l'indice de Youden (J), défini par : $J = Se + Sp - 1$. Cet indice varie de -1 à +1. Il atteint sa valeur maximale lorsque la somme des erreurs par excès (faux positifs, risque α) et des erreurs par défaut (faux négatifs, risque β) est minimale (Landais *et al.*, 1994).

3.2.2 Statut d'un troupeau d'animaux vis-à-vis d'une maladie et caractéristiques d'un test à l'échelle du troupeau

La détermination des indicateurs de qualité des tests en santé animale nécessite la prise en compte de certaines particularités liées au mode de dépistage des maladies infectieuses chez les animaux de rente (bétail). L'interprétation des résultats des tests dans un cheptel s'effectue à l'échelle collective. A l'issue d'un test de dépistage, le résultat du troupeau est négatif si tous les animaux qu'il contient ont fourni des résultats négatifs à ce test. Au contraire, le résultat du troupeau est positif dès lors qu'un animal du troupeau a fourni un résultat positif au test de dépistage. On utilise donc les notions de sensibilité et de spécificité collectives pour définir les qualités d'un test utilisé dans un troupeau.

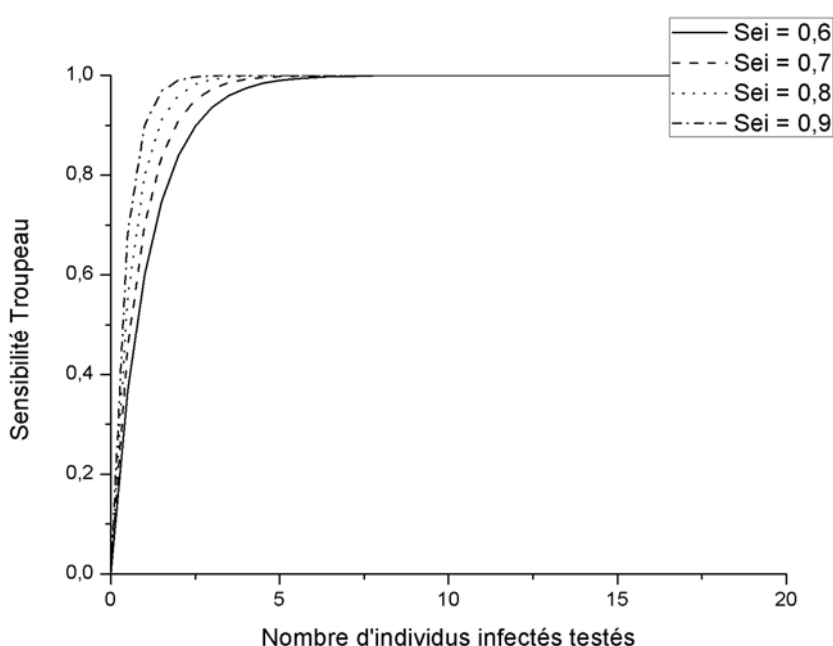
La sensibilité collective (dite « sensibilité troupeau » ou Se_{Troupeau}) d'un test de dépistage est la probabilité d'obtenir au moins un résultat positif dans un cheptel infecté, et donc la probabilité de conclure à la présence de la maladie dans un cheptel infecté. Elle varie donc en fonction de la

sensibilité individuelle ($Se_{\text{Individuelle}}$) du test et du nombre n d'individus infectés présents dans le troupeau :

$$Se_{\text{Troupeau}} = 1 - (1 - Se_{\text{Individuelle}})^n$$

La sensibilité collective d'un test est d'autant plus élevée que le nombre d'individus infectés soumis au test est grand. Ainsi, comme le montre la Figure 1, même si la prévalence de la maladie au sein d'un troupeau est basse à modérée, la sensibilité troupeau augmente rapidement avec le nombre d'animaux infectés testés (Martin *et al.*, 1992 ; Christensen et Gardner, 2000).

Figure 1 : Evolution de la sensibilité troupeau d'un test en fonction de sa sensibilité individuelle (Se_i) et du nombre d'individus infectés testés



La spécificité collective (dite « spécificité troupeau » ou Sp_{Troupeau}) d'un test correspond à la probabilité de n'obtenir que des résultats négatifs au test dans un cheptel indemne, c'est-à-dire la probabilité de conclure à l'absence de la maladie dans un cheptel indemne. Elle varie en fonction de la spécificité individuelle ($Sp_{\text{Individuelle}}$) du test et du nombre n d'individus indemnes présents dans le troupeau :

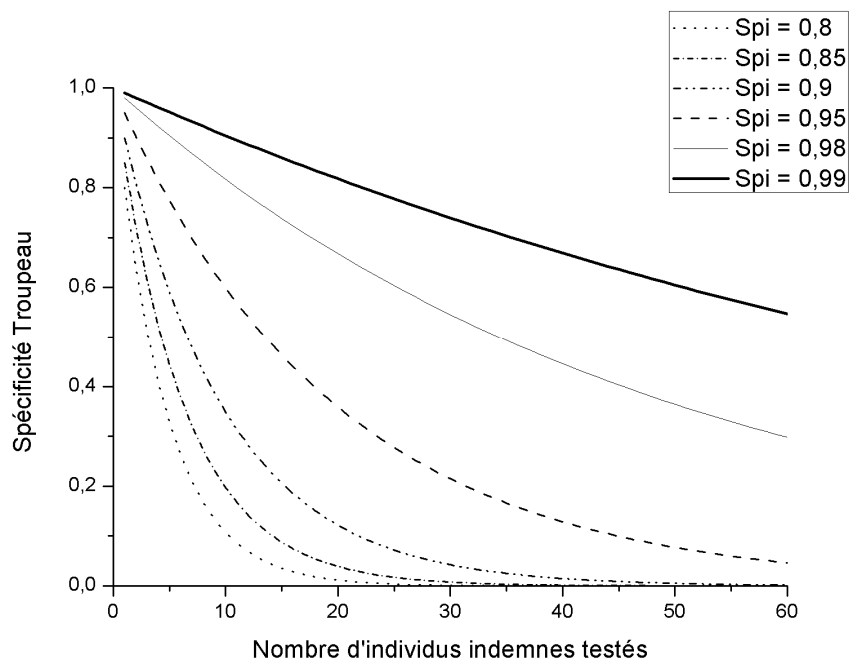
$$Sp_{\text{Troupeau}} = (Sp_{\text{Individuelle}})^n$$

La spécificité collective d'un test de dépistage diminue rapidement avec le nombre d'animaux testés au sein du troupeau (Figure 2). Cette diminution pose un problème pour le dépistage des maladies en fin d'éradication, en particulier dans les cheptels de grande taille : plus le nombre d'animaux testés est élevé et plus le risque d'obtention de résultats faux positifs est grand (Martin *et al.*, 1992 ; Christensen et Gardner, 2000). L'obtention de résultats faussement positifs engendre des pertes

économiques importantes, principalement liées au coût des investigations complémentaires menées dans ces troupeaux et au blocage commercial des exploitations.

Remarque : Les mêmes variations de sensibilité et de spécificité sont observées lorsqu'un même individu est soumis à des tests répétés, conditionnellement à son statut vis-à-vis de la maladie (Grenier, 1999).

Figure 2 : Evolution de la spécificité troupeau d'un test en fonction de sa spécificité individuelle (S_{pi}) et du nombre d'individus indemnes testés



Remarque : Dans la suite du texte, on utilisera indifféremment les termes « sensibilité (ou spécificité) troupeau » et « sensibilité (ou spécificité) collective ».

3.2.3 Interprétation des résultats d'un test dans un contexte déterminé : les valeurs prédictives positive et négative

Sur le terrain, le clinicien ou le « décideur » est amené à statuer sur la confiance qu'il est possible d'accorder au résultat d'un test, qu'il soit positif ou négatif. Cette information dépend à la fois des caractéristiques intrinsèques du test (sensibilité, spécificité) mais également de la probabilité d'occurrence de la maladie, *i.e.* de sa prévalence dans la population à laquelle appartient l'individu concerné (Smith, 1992 ; Toma *et al.*, 2010).

On définit la valeur prédictive positive (VPP) comme la probabilité que l'animal soit malade lorsqu'il a fourni un résultat positif au test :

$$VPP = P(D+ | T+) = VP / (VP + FP)$$

La valeur prédictive positive d'un test est d'autant plus élevée que le test est spécifique (diminution du nombre de résultats faux positifs) et que la prévalence de la maladie dans la population étudiée est élevée.

De la même façon, la valeur prédictive négative (VPN) correspond à la probabilité qu'un animal soit indemne sachant qu'il a fourni un résultat négatif au test :

$$VPN = P(D- | T-) = VN / (VN + FN)$$

La valeur prédictive négative d'un test est d'autant plus élevée que le test est sensible (diminution du nombre de résultats faux négatifs) et que la prévalence de la maladie dans la population étudiée est faible.



Remarque : La diminution de la valeur prédictive positive des tests lorsque la prévalence de la maladie dépistée diminue pose un problème crucial dans les programmes de lutte contre les maladies infectieuses et entrave le bon déroulement de la fin de l'éradication de ces maladies (Smith, 1992), en raison de l'augmentation de la proportion de résultats faussement positifs parmi les résultats positifs. Cela conduit les pouvoirs publics à adapter les protocoles de dépistage en espaçant les tests, en restreignant le nombre d'animaux testés ou en utilisant de nouveaux tests afin de limiter les conséquences économiques liées à la survenue de résultats faussement positifs.

3.3 Représentation graphique de l'efficacité d'un test et détermination d'une valeur seuil optimale

3.3.1 Seuil d'interprétation d'un test et courbe ROC (Receiver Operating Characteristic)

✓ Valeur seuil et caractéristiques d'un test

Le rôle d'un test est de distinguer avec la meilleure efficacité possible les individus atteints des individus indemnes. Il est donc indispensable de choisir, parmi les variables résultats, un séparateur qui permettra une distinction optimale entre la population indemne et la population infectée. Un test est parfait lorsqu'il permet de trier ces deux populations sans aucun chevauchement.

Il est le plus souvent impossible de trouver un séparateur parfait en raison des variations individuelles qui existent d'un individu à l'autre dans des conditions physiologiques normales. Par exemple, la valeur normale du paramètre étudié chez un individu sain pourra être identique, voire inférieure à la valeur augmentée du même paramètre chez un individu malade (Figure 3). Tout choix de seuil conduira par conséquent à un nombre plus ou moins important d'erreurs de classification. La sensibilité et la spécificité d'un test varient de manière inverse, selon le choix du seuil de positivité. Un abaissement du seuil de positivité conduit à une augmentation du nombre d'erreurs par excès (faux positifs) et à une diminution du nombre d'erreurs par défaut (faux négatifs), et *vice versa* (Figure 4).

Figure 3 : Distribution des résultats dans le cas d'un test « réel » en fonction du statut infectieux des individus

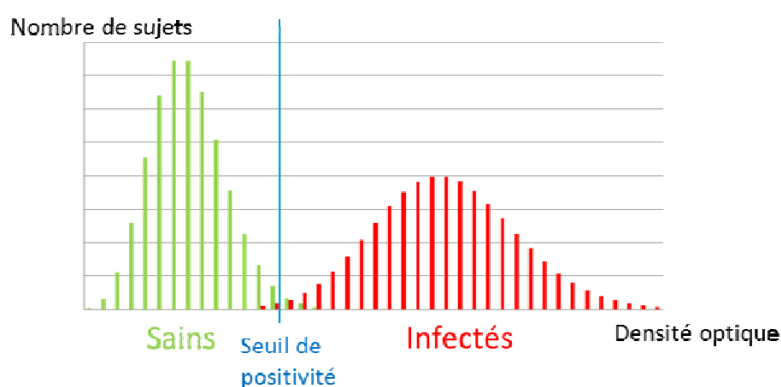
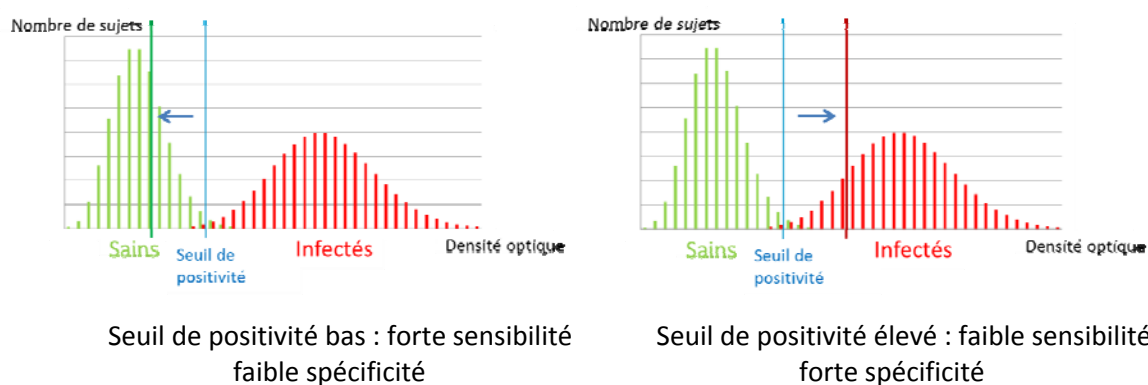


Figure 4 : Variations de sensibilité et de spécificité d'un test selon le seuil de positivité choisi

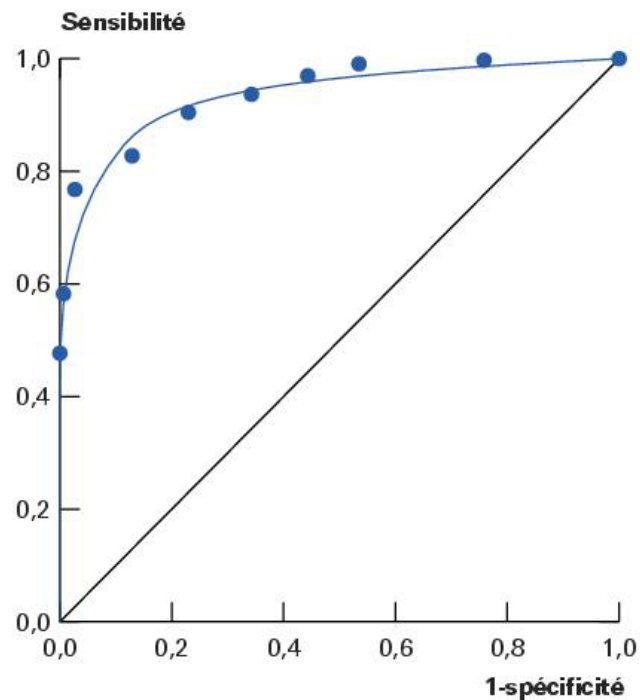


✓ La courbe ROC (Receiver Operating Curve)

La courbe ROC (Receiver Operating Characteristic) est une représentation graphique du lien existant entre sensibilité et spécificité. La courbe ROC permet à la fois d'évaluer et de comparer l'efficacité de plusieurs tests et de déterminer la valeur seuil optimale (Delacour et al., 2005). Développée dans les années 1950 pour l'analyse des données Radar, son utilisation en médecine est

évoquée par Lusted dès 1960 (Lusted, 1960). Elle est construite en calculant, pour toutes les valeurs seuils possibles, le taux de résultats « faux positifs » (égal à $1 - \text{spécificité}$), reporté en abscisse et le taux de résultats « vrais positifs » (égal à la sensibilité), reporté en ordonnée (Figure 5).

Figure 5 : Courbe ROC



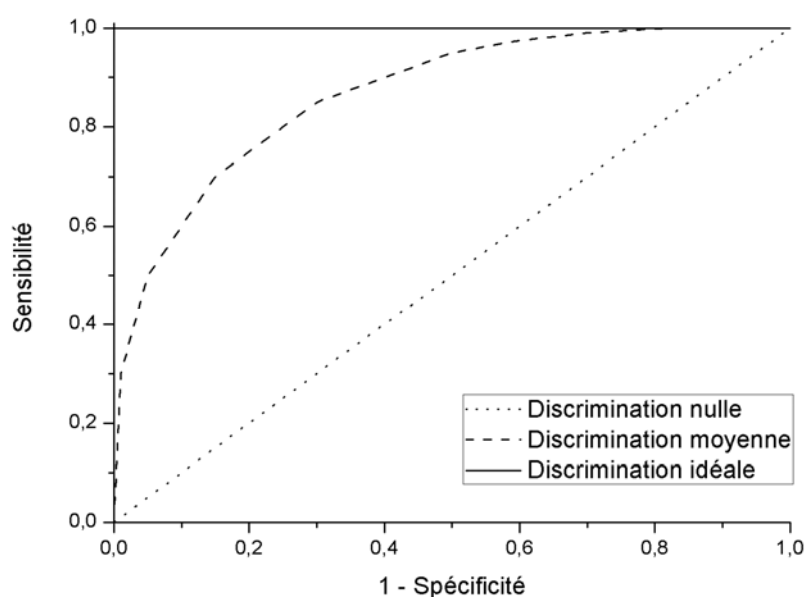
3.3.2 La courbe ROC : applications

✓ Détermination de l'efficacité d'un test et comparaison de plusieurs tests

L'analyse d'une courbe ROC débute par l'observation de l'allure générale de la courbe et le calcul de l'aire sous la courbe (AUC ou « Area Under Curve » en Anglais).

Dans le cas d'un test parfait, la courbe passe par le point de coordonnées (0 ; 1), *i.e.* $Sp = 1$ et $Se = 1$. L'AUC associée est égale à 1. Inversement, si le test ne discrimine pas mieux les deux populations (indemnes/malades) que si l'on avait recours au hasard, la courbe ROC est représentée par une diagonale. L'AUC associée est égale à 0,5 (Figure 6). On distingue donc les tests dont l'apport d'informations relatives au statut de l'individu testé vis-à-vis de la maladie est nul ($AUC = 0,5$), des tests peu informatifs ($0,5 < AUC < 0,7$), moyennement informatifs ($0,7 \leq AUC < 0,9$), très informatifs ($0,9 \leq AUC < 1$) et parfaits ($AUC = 1$) (Swets, 1988). L'AUC permet donc de comparer plusieurs tests si leurs courbes ont une allure similaire.

Figure 6 : AUC et comparaison de l'efficacité de tests



✓ Détermination d'un seuil de positivité optimal

Intuitivement, la valeur seuil optimale d'un test peut être identifiée comme le point le plus éloigné de la diagonale. L'indice de Youden ($J = Se + Sp - 1$) prend sa valeur maximale à ce point. Le choix du seuil optimal doit également prendre en compte le contexte épidémiologique (prévalence de la maladie étudiée) et médico-économique (coût de la prise en charge des individus malades et de ses éventuels effets indésirables, gravité de la maladie étudiée) (Delacour *et al.*, 2005). Par exemple, si une maladie a des conséquences médicales et/ou économiques graves et/ou qu'il est possible de la traiter simplement, on privilégiera la sensibilité. En revanche, devant une maladie bénigne et/ou pour laquelle le traitement est onéreux et risqué pour le patient, on privilégiera la spécificité.

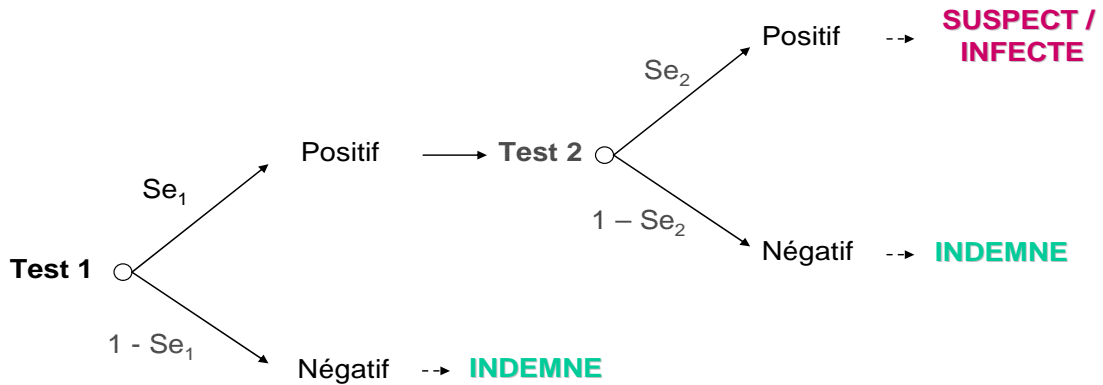
3.4 Utilisation de séquences de tests de dépistage associés

Comme évoqué précédemment, les tests de dépistage utilisés sur le terrain présentent des limites, liées à leurs caractéristiques intrinsèques et/ou au contexte épidémiologique dans lequel ils sont utilisés. Il est possible, pour pallier ces imperfections, de concevoir des protocoles de dépistage associant plusieurs tests. On distingue usuellement deux grands types d'associations de tests dits « en série » ou « en parallèle ».

Lorsque deux tests sont associés en série, la réalisation du second test dépend des résultats du premier. Le second test n'est effectué que si le premier a fourni un résultat positif. En règle générale,

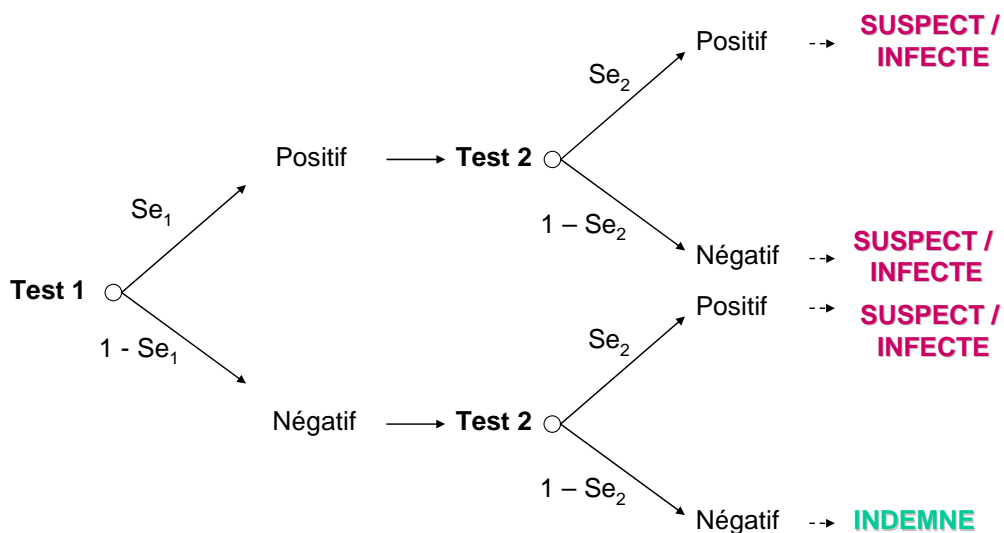
le résultat global de la séquence est positif lorsque le résultat est positif au premier test ET au second (schéma décisionnel « ET » ; Figure 7).

Figure 7 : Association de deux tests en série (schéma décisionnel « ET »)



Lorsque les tests sont associés en parallèle en revanche, chaque individu est soumis de manière systématique aux deux tests. On considère habituellement que le résultat global de la séquence est positif lorsque le résultat est positif à l'un OU l'autre des tests (schéma décisionnel « OU » ; Figure 8).

Figure 8 : Association de deux tests en parallèle (schéma décisionnel « OU »)



Remarque : La définition présentée ci-dessus est communément adoptée par la majorité des auteurs. Weinstein *et al.* (2005) proposent une approche un peu différente des associations de tests et distinguent le protocole de réalisation des tests (en série lorsque les individus sont soumis au second test au regard de leur résultat au premier test et en parallèle lorsque tous les individus sont

soumis à chacun des deux tests) des modalités d'interprétation (schéma « ET » ou schéma « OU »). Ils utilisent donc les notions d'association en série avec interprétation « ET », en série avec interprétation « OU », en parallèle avec interprétation « ET » et en parallèle avec interprétation « OU ». Cette approche ne sera pas utilisée dans la suite de ce travail.

La sensibilité et la spécificité des associations de tests sont déductibles des arbres décisionnels présentés ci-dessus (Figure 7 et Figure 8). L'expression de leurs caractéristiques dépend de l'existence d'une relation de dépendance conditionnelle entre les tests. Elles sont récapitulées, pour chaque type d'association, dans le Tableau 3 et le Tableau 4.

Tableau 3 : Sensibilité et spécificité de l'association de deux tests en série, selon l'existence (ou non) d'une relation de dépendance conditionnelle entre les tests

Dépendance conditionnelle	Tests indépendants	Tests dépendants
Sensibilité	$Se_1 * Se_2$	$Se_1 * Se_2 + \gamma_{Se}$
Spécificité	$1 - (1 - Sp_1) * (1 - Sp_2)$	$1 - (1 - Sp_1) * (1 - Sp_2) - \gamma_{Sp}$

Se_1 et Se_2 : sensibilités respectives des tests 1 et 2 ; Sp_1 et Sp_2 : spécificités respectives des tests 1 et 2, γ_{Se} : covariance des résultats positifs et γ_{Sp} : covariance des résultats négatifs

Tableau 4 : Sensibilité et spécificité de l'association de deux tests en parallèle, selon l'existence (ou non) d'une relation de dépendance conditionnelle entre les tests

Dépendance conditionnelle	Tests indépendants	Tests dépendants
Sensibilité	$1 - (1 - Se_1) * (1 - Se_2)$	$1 - (1 - Se_1) * (1 - Se_2) - \gamma_{Se}$
Spécificité	$Sp_1 * Sp_2$	$Sp_1 * Sp_2 + \gamma_{Sp}$

Se_1 et Se_2 : sensibilités respectives des tests 1 et 2 ; Sp_1 et Sp_2 : spécificités respectives des tests 1 et 2, γ_{Se} : covariance des résultats positifs et γ_{Sp} : covariance des résultats négatifs

En pratique, lors de la conception d'un protocole de testage reposant sur plusieurs tests, le choix d'une stratégie d'association et d'interprétation dépend de plusieurs facteurs :

- le contexte épidémiologique dans lequel le test est effectué, selon que l'on souhaite privilégier la sensibilité (schéma décisionnel « OU ») ou la spécificité (schéma décisionnel « ET ») de la séquence de dépistage ;
- les moyens techniques et financiers dont dispose l'utilisateur. Les associations en série sont moins coûteuses que les associations en parallèle car elles permettent de restreindre le nombre d'animaux testés, mais imposent de connaître les résultats au

premier test avant d'effectuer le second : les animaux doivent être séparés en deux groupes à l'issue du premier test et les délais d'obtention du résultat final peuvent être relativement longs, surtout lorsque le nombre d'animaux concernés est grand. Les séquences en parallèle sont plus coûteuses car chaque animal est soumis à deux tests, mais elles permettent un gain de temps appréciable pour l'obtention des résultats.

3.5 Notion de « gold standard » et de « test de référence »

L'évaluation des caractéristiques des tests disponibles pour la conception d'un protocole de dépistage nécessite en premier lieu la comparaison de leurs caractéristiques intrinsèques, qui doivent être déterminées par rapport à une référence fournissant une information sur le statut de l'animal vis-à-vis de l'agent pathogène dépisté (infecté ou indemne).

On appelle « gold standard » un test, ou plus généralement une « information » (signe clinique par exemple), qui permet de connaître le statut des animaux testés sans commettre d'erreurs de classement (faux négatifs ou faux positifs), c'est-à-dire un test dont la sensibilité est égale à 100% pour un gold standard positif et un test dont la spécificité est égale à 100% pour un gold standard négatif. En pratique, pour un grand nombre de maladies, un test permettant une discrimination parfaite n'est pas toujours disponible ou est inutilisable (Rutjes *et al.*, 2007). C'est notamment le cas lorsque le délai entre la contamination et l'apparition du marqueur détecté par le « gold standard » est variable : en début d'évolution, le marqueur peut ne pas être apparu ou être présent à un niveau trop faible pour être détecté. Les conditions de réalisation et de conservation du prélèvement peuvent également influencer le résultat du test, par exemple lorsque le « gold standard » positif consiste en l'isolement de l'agent pathogène à partir d'un prélèvement. Ensuite, l'existence d'une part de subjectivité dans la lecture et l'interprétation du résultat (quantification d'une réaction allergique pour l'intradermotuberculation) constitue une source de biais. Parfois, la définition de la maladie peut varier d'une étude à l'autre. A titre d'exemple, certaines maladies (telles que la migraine chez l'Être humain) ne sont pas définies par une modification biochimique ou histologique isolée mais par la combinaison de plusieurs symptômes. Enfin, dans certaines conditions, il est impossible d'utiliser le gold standard pour des raisons éthiques ou économiques.

Lorsqu'un gold standard « parfait » n'est pas disponible, on recourt à un test dont les caractéristiques sont aussi satisfaisantes que possible. On préférera alors au terme « gold standard » (implicitement porteur de notion de perfection) le terme de « test de référence » (« reference standard » en Anglais) (Lijmer *et al.*, 1999 ; Rutjes *et al.*, 2006).

4 Etude des outils disponibles pour la détection d'une maladie : estimation des caractéristiques d'un test sur le terrain

L'étude des caractéristiques intrinsèques d'un test ne pose pas de problème majeur lorsqu'il existe une référence permettant de connaître le statut des individus vis-à-vis de la maladie. Dans le cas contraire, il est indispensable de recourir à des méthodes d'estimation adaptées.

4.1 Méthodes disponibles

Lorsqu'un test de référence est disponible pour dépister une maladie, la sensibilité et la spécificité du test en cours de validation peuvent être déterminées de manière directe. Dans les conditions idéales, le protocole doit respecter les conditions suivantes : le test de référence ne doit conduire à aucune erreur de classement (faux positifs ou faux négatifs), les résultats du test étudié doivent tous être comparés au même test de référence et les deux tests doivent être réalisés au même moment. Ces conditions sont toutefois rarement réunies : en l'absence d'information complète et fiable sur le statut réel des individus vis-à-vis de l'infection, il est nécessaire de recourir à d'autres méthodes d'estimation des caractéristiques intrinsèques du test étudié (Rutjes *et al.*, 2007 ; cf. paragraphe 4.3).


4.2 Estimation directe des caractéristiques des tests : choisir une référence

L'estimation directe nécessite de choisir une référence positive pour le calcul de la sensibilité et une référence négative pour le calcul de la spécificité.

Ce choix peut être fait dans un contexte expérimental : certaines études de validation des tests font appel à des individus élevés dans des conditions expérimentales permettant l'absence d'agents pathogènes dans leur environnement (animaux « germ free ») ou au contraire infectés expérimentalement. Il est évident que ces animaux ne peuvent en aucun cas être représentatifs de la population réelle dans laquelle le test a pour vocation d'être appliqué, soumise à des variations environnementales (agents pathogènes environnementaux, climat, autres animaux), individuelles (diversité génétique), immunitaires (maladies intercurrentes, stress, gestation, traitements)... De plus, ces études sont lourdes de conséquences en termes de coût, de risques pour les personnels exposés si la maladie étudiée est une zoonose et peuvent poser un problème éthique. Les résultats obtenus constituent les caractéristiques intrinsèques du test au sens propre du terme mais sont totalement déconnectés de la réalité du terrain.

Il est également possible de choisir une référence sur le terrain. La population de référence positive est souvent constituée par des animaux sur lesquels on a isolé l'agent pathogène. Ces individus ne sont pas toujours représentatifs de la population d'animaux infectés, notamment si la recherche de l'agent présente elle-même un défaut de sensibilité, et en raison de l'existence de différents stades d'infection, de différentes localisations possibles (plus ou moins accessibles) de l'agent pathogène recherché et d'un biais de sélection des animaux sur lesquels la recherche est effectuée (dans le cas d'une découverte fortuite d'abattoir : animaux abattus plus ou moins tardivement selon le type de production pour lequel ils sont élevés ; dans le cas d'un protocole d'assainissement par abattage partiel : les premiers animaux abattus sont les meilleurs répondants aux tests). La détection de fragments du génome de l'agent pathogène par PCR peut également être considérée comme référence positive, mais sa validation (en cours pour la détection de *M. bovis* par exemple) nécessite de statuer sur un seuil de positivité et sur les modalités d'interprétation de ses résultats.

L'échantillon constituant la référence négative provient en règle générale d'une population très particulière d'élevages officiellement indemnes de la maladie étudiée, ou situés dans une zone indemne, n'ayant pas été liés épidémiologiquement à un foyer.

 **L'étude directe des caractéristiques d'un test sur le terrain, comme au laboratoire, est donc nécessairement réalisée à partir de populations très particulières**, qui ne sont pas représentatives de la diversité des animaux soumis au test sur le terrain. Pour les services vétérinaires départementaux, ou pour les cliniciens, se pose alors le problème d'extrapoler les résultats obtenus dans de tels échantillons à une population réelle. Dans cette démarche, l'utilisation de méthodes de construction d'une référence permet de conduire des études d'estimation des caractéristiques de tests dans un échantillon représentatif de la population dans lequel le test sera utilisé.

4.3 Estimation des caractéristiques d'un test en l'absence de référence

Plusieurs groupes de méthodes permettent l'estimation des caractéristiques d'un test en l'absence d'information sur le statut infectieux individuel des animaux (Rutjes *et al.*, 2007) :

✓ Ajout ou ajustement de données manquantes

Ce groupe de méthodes est applicable si l'on dispose d'un test de référence acceptable, mais dont le résultat est indisponible pour plusieurs individus. L'information manquante peut être ajoutée à la base de données, à condition de prendre en compte la proportion et le profil de ces individus.

✓ Correction d'une référence imparfaite

Ces méthodes sont utilisables s'il existe un test de référence dont on sait qu'il est imparfait et si l'on dispose de connaissances fiables sur son degré d'imperfection et sur le degré de corrélation entre les « erreurs » commises par chacun des deux tests étudiés.

✓ Construction d'une référence standard

Cette approche combine les résultats d'individus soumis parallèlement à plusieurs tests. Les individus peuvent alors être classés comme « infectés » ou « indemnes » de trois manières différentes :

- en utilisant une règle prédéfinie selon le profil de résultats aux tests : référence dite « composite ». La conception d'une échelle composite nécessite de corréler les résultats du test étudié à d'autres indicateurs, notamment des critères cliniques ou la survenue d'évènements cliniques ultérieurs. Cette démarche conduit à « abandonner » l'évaluation des caractéristiques intrinsèques du test seul au profit d'un ensemble de critères.
- à l'aide de l'avis d'experts ;
- à l'aide de modèles « classe latente » (cf. paragraphe 4.4).

Les deux premières approches présentent l'inconvénient de comporter un biais dû aux erreurs de classification. La troisième pose le problème de l'absence de définition du « cas », *i.e.* de l'individu infecté.



Remarque : Les modèles à classe latente implémentés par une approche bayésienne sont particulièrement détaillés dans le paragraphe suivant en raison du fait que cette méthode a été utilisée à plusieurs reprises dans nos travaux.

4.4 Les modèles à classe latente

Parmi les trois groupes de méthodes présentées précédemment, les approches permettant la construction d'une référence sont particulièrement intéressantes car elles sont le seul moyen d'estimer les caractéristiques des tests en l'absence de toute information sur le statut individuel des sujets constituant l'échantillon, vis-à-vis de la maladie étudiée.

4.4.1 Principe

Les modèles à classe latente permettent de combiner différentes sources d'informations intégrant les résultats aux tests d'un grand nombre d'individus testés afin de « construire » une référence et d'estimer la sensibilité et la spécificité des tests évalués, ainsi que la prévalence de la maladie dans l'échantillon étudié (Rutjes *et al.*, 2007). Ils peuvent être utilisés pour évaluer les caractéristiques d'un ou de plusieurs nouveaux tests, comparées à celles d'un test déjà connu mais imparfait, ou pour estimer les caractéristiques de plusieurs tests mal connus. Pour ce faire, il est nécessaire de disposer des résultats croisés de plusieurs individus à au moins deux tests.

Prenons l'exemple de deux tests dont les résultats sont binaires (négatif ou positif) appliqués à un groupe d'individus dans lequel la prévalence de la maladie est inconnue. Aucun de ces deux tests n'est parfait.

Pour le premier test (T_1), de sensibilité Se_1 et de spécificité Sp_1 , la probabilité d'obtenir un résultat positif chez un individu est égale à la somme de la probabilité d'obtenir un résultat positif chez un individu atteint (Diagnostic +, D+) ou « vrai positif » ($T_{1+} | D+$) et de la probabilité d'obtenir un résultat positif chez un individu indemne (Diagnostic -, D-) ou « faux positif » ($P(T_{1+} | D-)$).

A l'aide de la formule de Bayes (Bayes, 1763), les probabilités de survenue d'un résultat positif ou d'un résultat négatif peuvent être écrites comme des fonctions des caractéristiques intrinsèques du test (Se_1 et Sp_1) et de la prévalence de la maladie au sein du groupe étudié (prev) :

$$P(T_{1+}) = P(T_{1+} | D+) + P(T_{1+} | D-)$$

$$P(T_{1+}) = \text{prev} * Se_1 + (1 - \text{prev}) * (1 - Sp_1) \quad [1]$$

De la même manière, la probabilité d'obtenir un résultat négatif chez un individu est égale à la somme de la probabilité d'obtenir un résultat négatif chez un individu indemne ou « vrai négatif » ($T_{1-} | D-$) et de la probabilité d'obtenir un résultat négatif chez un individu infecté ou « faux négatif » ($P(T_{1-} | D+)$) :

$$P(T_{1-}) = P(T_{1-} | D-) + P(T_{1-} | D+)$$

$$P(T_{1-}) = \text{prev} * Sp_1 + (1 - \text{prev}) * (1 - Se_1) \quad [2]$$

Les probabilités d'obtenir un résultat positif ou négatif au second test (T_2) sont définies de même :

$$P(T_{2+}) = \text{prev} * Se_2 + (1 - \text{prev}) * (1 - Sp_2) \quad [3]$$

$$P(T_{2-}) = \text{prev} * Sp_2 + (1 - \text{prev}) * (1 - Se_2) \quad [4]$$

Dans le système d'équations [1, 2, 3, 4], cinq paramètres sont donc inconnus (prev, Se_1 , Sp_1 , Se_2 et Sp_2). Pour un individu, il existe 4 possibilités de combinaison des résultats aux tests :

$[T_1+ ; T_2+]$, $[T_1+ ; T_2-]$, $[T_1- ; T_2+]$ et $[T_1- ; T_2-]$.

On peut donc écrire la vraisemblance de la survenue de chacune des combinaisons de résultats aux tests à l'aide des équations [1], [2], [3] et [4].

Si les deux tests sont considérés comme statistiquement indépendants (*i.e.* si le résultat obtenu au premier test conditionnellement au statut de l'animal vis-à-vis de la maladie ne fournit pas d'information sur la probabilité d'obtention d'un résultat donné au second test (Enøe *et al.*, 2000)), les probabilités d'observer chacune des combinaisons de résultats aux tests sont les suivantes (Vose, 2008):

$$P (T_1- ; T_2-) = \text{prev} (1-\text{Se}_1) (1-\text{Se}_2) + (1-\text{prev}) \text{Sp}_1 \text{Sp}_2$$

$$P (T_1- ; T_2+) = \text{prev} (1-\text{Se}_1) \text{Se}_2 + (1-\text{prev}) \text{Sp}_1 (1-\text{Sp}_2)$$

$$P (T_1+ ; T_2-) = \text{prev} \text{Se}_1 (1-\text{Se}_2) + (1-\text{prev}) (1-\text{Sp}_1) \text{Sp}_2$$

$$P (T_1+ ; T_2+) = \text{prev} \text{Se}_1 \text{Se}_2 + (1-\text{prev}) (1-\text{Sp}_1) (1-\text{Sp}_2)$$

Lorsque suffisamment d'informations sont disponibles pour que le nombre de degrés de liberté (d.d.l.) autorisé par les données soit supérieur au nombre de paramètres à estimer (quatre, dans le cas d'un modèle à deux tests indépendants), le modèle est dit « identifiable ». Dans le cas contraire, il est nécessaire de recourir à des méthodes d'estimation statistiques telles qu'une approche bayésienne (*cf.* chapitre 4.5) afin d'obtenir un système de solutions unique.

4.4.2 Extensions du modèle classe latente

Différentes variations peuvent être apportées au modèle présenté ci-dessus, afin de tenir compte du contexte de l'étude.

✓ Variation du nombre de tests

Les modèles à classe latente peuvent être utilisés pour l'évaluation simultanée de deux tests ou plus. L'inclusion de tests supplémentaires est intéressante car elle augmente le nombre de d.d.l. : un nombre plus élevé de paramètres peuvent être estimés, et éventuellement utilisés pour de plus amples vérifications concernant l'adaptation du modèle (Rutjes *et al.*, 2007).

✓ Relation de dépendance conditionnelle entre les tests

Le modèle de base présenté ci-dessus (*cf.* 4.4.1) suppose que les résultats des tests évalués sont indépendants conditionnellement à l'état sanitaire de l'individu concerné (par exemple : si un individu infecté est considéré à tort comme indemne par le test 1, cela ne modifie pas la probabilité pour ce même individu d'être considéré à tort comme indemne par le test 2) (Enøe *et al.*, 2000). Cette hypothèse est valable lorsque les tests évalués reposent sur des processus biologiques

différents (tels que la mise en évidence d'une infection bactérienne par sérologie d'une part et par culture ou amplification génique d'autre part). Dans de multiples situations, l'hypothèse d'indépendance des tests n'est pas vérifiée (par exemple : lors de l'étude de plusieurs tests sérologiques reposant sur la détection des anticorps dirigés contre le lipopolysaccharide (LPS) de surface des *Brucella*). Pour résoudre ce problème, il est possible d'estimer la corrélation entre les différents tests et d'en tenir compte pour le calcul des caractéristiques des deux tests. Le nombre de paramètres du modèle est alors augmenté et leur estimation nécessite l'adjonction d'informations supplémentaires pour augmenter le nombre de d.d.l., au moyen de l'inclusion d'autres tests, d'une autre population de prévalence différente ou en incorporant au modèle des informations *a priori* à l'aide d'une approche bayésienne.

4.5 Estimation des paramètres du modèle par une approche bayésienne

L'approche bayésienne est couramment utilisée pour la détermination des caractéristiques de tests diagnostiques en l'absence de gold standard en médecine humaine, et de plus en plus fréquemment en médecine vétérinaire (Spangler *et al.*, 1992 ; Joseph *et al.*, 1995 ; Grenier, 1999 ; Enøe *et al.*, 2000 ; Branscum *et al.*, 2005 ; Rutjes *et al.*, 2007 ; Meyer *et al.*, 2009). Elle peut également être utilisée pour la modélisation de processus biologiques et environnementaux (Bernier *et al.*, 2000 ; Clark, 2007). Un bilan des études de caractéristiques de tests de dépistage de maladies infectieuses par une approche bayésienne au 1^{er} janvier 2012 est présenté dans l'[Annexe 5](#).

L'intérêt principal de l'approche bayésienne réside dans la possibilité de synthétiser les informations déjà disponibles *a priori* sur les paramètres à estimer (ou « priors ») et les données collectées sur le terrain, pour aboutir à l'estimation *a posteriori* des paramètres d'intérêt (« posteriors ») :

$$\text{Posterior} = \text{Prior} * \text{Vraisemblance}$$

L'estimation des posteriors est obtenue mathématiquement à l'aide du théorème de Bayes (Bayes, 1763) : étant donnés deux évènements A et B, dont les probabilités de survenue respectives sont P(A) et P(B), la probabilité de survenue de l'évènement B sachant que A est survenu est définie comme suit :

$$P(B|A) = P(A|B) * P(B) / P(A)$$

La démarche bayésienne consiste à probabiliser le paramètre inconnu en lui associant une loi de probabilité dite loi *a priori*. Cette loi représente l'ensemble des informations *a priori* disponibles sur le paramètre θ ainsi que les imprécisions s'y rattachant.

Soit θ le paramètre dont la loi *a priori* est notée π :

$$[\theta] \sim \pi(\theta)$$

Soient X les données dont la loi conditionnelle est notée : $[X|\theta] = V$ (vraisemblance)

La loi jointe de (θ, X) est : $[\theta, X] = [\theta] [X|\theta] = \pi(\theta) V$.

La loi marginale de X est : $m(x) = \int [\theta, X] d\theta = \int [\theta] [X|\theta] d\theta$

La loi *a posteriori* de θ est donc : $[\theta|X] = [\theta] [X|\theta] / m(x)$

$$\propto [\theta] [X|\theta]$$

Les connaissances sur le paramètre θ sont actualisées au travers du théorème de Bayes, c'est-à dire via la loi *a posteriori* $[\theta|X]$. À l'accumulation d'observations X_1, \dots, X_n correspond donc une suite d'actualisations $[\theta|X_1], \dots, [\theta|X_1, \dots, X_n]$, qui sont mutuellement compatibles et dont l'ordre d'apparition n'a pas d'importance.

Lorsque cette approche est appliquée à l'étude des caractéristiques de tests, les paramètres « d'intérêt » (*i.e.* sensibilités et spécificités des tests et prévalences dans les populations étudiées) sont donc considérés comme des variables qui suivent une distribution donnée. En règle générale, les sensibilités, spécificités et prévalences sont modélisées sous la formes de lois beta de paramètres a et b , dans l'intervalle $[0,1]$ (Johnson & Gastwirth, 1991 ; Praet *et al.*, 2006).

Le choix de la loi *a priori* est crucial pour la suite de l'analyse, même si son impact est moindre confronté à un très grand nombre de données collectées sur le terrain. Les informations *a priori* incluses dans le modèle peuvent être non informatives : dans ce cas les paramètres sont modélisés suivant des lois beta $(1,1)$, c'est-à-dire que toutes les valeurs prises par le paramètre sont équiprobables dans l'intervalle $[0,1]$. Il est également possible d'utiliser des priors dits « informatifs ». Ils sont modélisés à l'aide de distributions beta (a,b) et sont déterminés à l'aide d'informations bibliographiques, d'avis d'experts ou de données provenant d'une étude antérieure effectuée dans des conditions similaires (Enøe *et al.*, 2000). Pour un paramètre d'intérêt donné, les paramètres a et b de la loi beta (a,b) sont alors déterminés à l'aide de la valeur la plus probable du paramètre d'intérêt (θ_0) et de sa limite inférieure à 95 % (θ_L : la valeur du paramètre d'intérêt est supérieure à ce seuil avec un degré de certitude de 95%), selon la méthode suivante :

Le mode de la distribution est donné par la formule :

$$\theta_0 = (a-1) / (a+b-2) \quad \text{avec } a > 1$$

Ce qui donne : $a = (1 + \theta_0 (b - 2)) / (1 - \theta_0)$

Donc, pour une valeur donnée de θ_0 et de b , a peut être déterminé. Quand un couple de paramètres (a, b) est obtenu, on vérifie que le mode de la distribution beta (a, b) est θ_0 . Si cette condition n'est pas satisfaite, la démarche est répétée après avoir choisi un autre b et calculé le a correspondant, jusqu'à ce que les contraintes initialement définies soient satisfaites. La distribution est alors représentée graphiquement (à l'aide de logiciels tels que R ou BetaBuster par exemple) et soumis aux experts pour vérification. Si la distribution n'est pas satisfaisante, la même démarche est appliquée à un autre type de distribution.

Dans le cas où $a < 1$, on pose : $\theta_0 = a / (a + b)$, où θ_0 correspond à la moyenne de la distribution, puis on procède de la même manière.

Les données sont ensuite simulées par un processus itératif (algorithme Monte Carlo par chaîne de Markov ; MCMC), en utilisant l'échantillonneur de Gibbs (Gelman *et al.*, 1995 ; Andersen, 1997). L'échantillon simulé est utilisé pour estimer la distribution des paramètres d'intérêt *a posteriori*, leurs fonctions de densité de probabilité, leurs valeurs moyennes et un intervalle de probabilité à 95% (ou intervalle de crédibilité ; ICr 95%) pour chacune d'entre elles (Enøe *et al.*, 2000). Un intervalle de crédibilité peut être considéré comme un intervalle qui a 95% de chance de contenir la vraie valeur du paramètre. Ce qui signifie que si deux intervalles de crédibilité ne se recoupent pas, on peut considérer que les valeurs du paramètre dans la population sont significativement différentes, au risque d'erreur α de 5% (Enøe *et al.*, 2000).

Les valeurs d'initiation des chaînes peuvent être déterminées au départ (en prenant, par exemple, la valeur la plus probable pour chaque paramètre) ou choisies au hasard dans les distributions a priori.

Le compromis entre adaptation du modèle aux données et complexité du modèle peut être estimé à l'aide du Deviance Information Criterion (DIC ; Spiegelhalter, 2002).


$$\text{DIC}(M) = D(\bar{\theta}) + 2c$$

Où c mesure la complexité du modèle M et $D(\bar{\theta})$ est l'éloignement du modèle aux données ou déviance en la moyenne *a posteriori* du paramètre.

En règle générale, plus le modèle est rendu complexe par l'addition de paramètres et meilleure est son adaptation aux données. Plus la valeur du DIC est basse, meilleur est le compromis adaptation/complexité. L'un des avantages du DIC est qu'il peut être calculé directement par le logiciel WinBUGS à partir des chaînes produites par l'algorithme MCMC.

Les estimations *a posteriori* peuvent varier selon le type d'informations *a priori* introduites : on parle de sensibilité du modèle, qui doit être évaluée de manière systématique. D'autres critères

peuvent être utilisés pour vérifier l'adaptation du modèle aux données et la fiabilité du résultat : stabilité des indicateurs (moyenne, variance, quantiles) par rapport aux itérations, MC error suffisamment basse, diagnostic de convergence de Brooks ou Gelman et Rubin...

 **Les tests de dépistage (ou de diagnostic) constituent des outils indispensables dans la lutte contre les maladies animales réglementées.** L'utilisation des tests (seuls ou associés à d'autres critères) comme outils d'aide à la prise de décision sanitaire nécessite donc l'étude de leurs caractéristiques intrinsèques et la connaissance du contexte épidémiologique dans lequel ils seront utilisés. **Lorsqu'aucun test de référence n'est disponible, des méthodes statistiques adaptées doivent être employées pour évaluer la qualité des tests.**

L'estimation directe présente l'intérêt d'être relativement simple à appliquer, à condition de disposer d'une référence valable concernant le statut des individus vis-à-vis de la maladie. Son inconvénient majeur réside dans le fait d'être fondée sur des populations très particulières, souvent peu représentatives de la population générale. Ce type d'approche convient bien à la réalisation d'études préliminaires en laboratoire ou sur le terrain.

L'estimation des caractéristiques des tests par une modélisation avec construction d'une référence permet de s'affranchir de la connaissance du statut individuel des animaux et de conduire l'étude dans une population d'animaux tout venant, tirés au sort et donc représentatifs de la population d'origine mais est plus complexe à mettre en œuvre.

5 Du seuil d'utilité du test au seuil décisionnel

La problématique développée jusqu'ici concerne essentiellement le choix des outils d'aide à la prise de décision. Dans certains cas, il apparaît préférable de ne pas mettre en œuvre de protocole décisionnel, ou de le restreindre à certaines catégories de populations, présentant un risque particulier vis-à-vis de la maladie (exemple du dépistage de l'épididymite contagieuse du bélier). La synthèse de différents critères concernant la population, la maladie, les outils d'aide à la prise de décision disponibles (sensibilité et spécificité des tests, risques inhérents à l'utilisation du test) et l'impact de la décision (bénéfice, risques et coûts) permet de choisir un seuil a à partir duquel il est intéressant d'utiliser l'outil d'aide à la prise de décision (ou, plus simplement, de réaliser le test) et un seuil « décisionnel » b à partir duquel il est intéressant de mettre en œuvre la décision sanitaire sans appliquer la stratégie décisionnelle (Grenier, 1999 ; Cockcroft, 2007 ; cf. Figure 9).

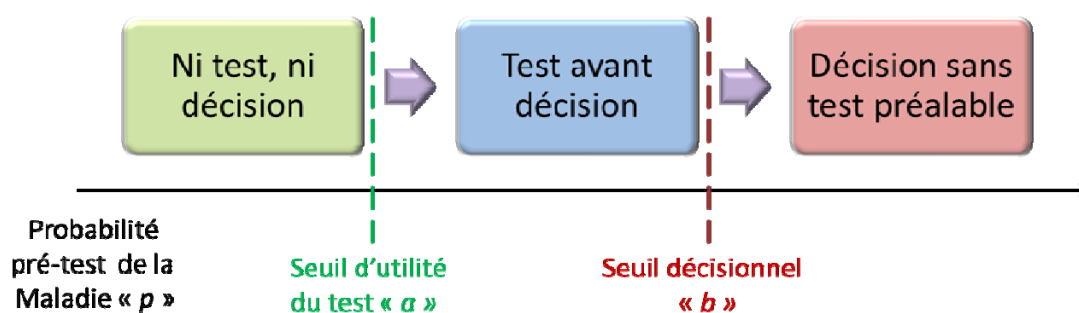
On définit p la probabilité « pré-test » de la maladie, c'est-à-dire la prévalence de la maladie dans la population étudiée :

- lorsque p est inférieure au seuil a , la probabilité « post-test » de la maladie (*i.e.* la probabilité de la maladie révisée à partir du résultat obtenu au test) reste inférieure au seuil décisionnel quel que soit le résultat du test;
- lorsque p est supérieure au seuil b , la probabilité « post-test » de la maladie est supérieure au seuil décisionnel quel que soit le résultat du test ;

Dans ces deux premiers cas de figure, la prescription du test n'est pas justifiée.

- lorsque p est comprise entre a et b , la prescription du test est justifiée et la prise d'une décision dépendra de la probabilité post-test.

Figure 9 : Utilisation du test et mise en œuvre de la décision sanitaire selon la probabilité pré-test de la maladie



Il est possible de définir, en fonction de la prévalence de la maladie et de ses répercussions, un seuil à partir duquel la stratégie décisionnelle doit être mise en œuvre et un seuil à partir duquel les mesures de lutte doivent être appliquées.

6 Objectifs de la thèse : étude des stratégies décisionnelles de lutte contre trois maladies infectieuses animales majeures

Comme nous l'avons vu précédemment, l'étude des stratégies décisionnelles et leur choix nécessite de disposer d'informations sur l'efficacité des outils disponibles, qu'il s'agisse d'un test unique, d'une association de plusieurs tests ou d'un ensemble de critères cliniques et épidémiologiques.

L'évaluation des outils disponibles pour le dépistage d'une maladie et l'étude des dispositifs d'aide à la prise de décisions sanitaires peuvent être réalisées avec des objectifs variés :

- **dans un but exploratoire**, afin de déterminer quel est le test le mieux adapté au dépistage d'une maladie parmi les tests disponibles, en fonction du contexte épidémiologique (début d'épizootie, maladie sévissant sur un mode enzootique ou sous forme de cas sporadiques) ;
- **dans le but de remplacer un test de dépistage utilisé habituellement** mais qui présente des inconvénients ou dans le but de pallier ses défaillances en l'associant à un nouveau test ;
- **dans le but d'évaluer *a posteriori* l'efficacité d'un protocole déjà existant.**

Lorsque le statut individuel des animaux vis-à-vis de la maladie est connu, cette évaluation peut être effectuée de manière directe. Néanmoins, il est fréquent de ne disposer d'aucune information à ce sujet, ce qui nécessite la mise en œuvre de méthodes adaptées. L'utilisation des méthodes bayésiennes pour l'étude des caractéristiques de tests de dépistage en l'absence de test de référence est relativement récente et a connu son essor autour des années 2000, en santé publique comme en santé animale (Meyer *et al.*, 2009). La revue de littérature présentée dans l'[Annexe 5](#) montre que l'approche bayésienne pour l'étude des caractéristiques de tests de dépistage est habituellement utilisée en santé animale dans trois grands contextes :

- en **l'absence de référence** permettant de connaître le **statut individuel des animaux** vis-à-vis de la maladie mais **dans un contexte épidémiologique connu** permettant de classer les individus en **deux sous-populations** dans lesquelles les prévalences de la maladie sont différentes ;
- en **l'absence de référence** permettant de connaître le **statut individuel des animaux** vis-à-vis de la maladie, dans une population dans laquelle la maladie évolue sur un mode enzootique et où **tous les individus ont la même probabilité d'être infectés** ;
- en **présence d'une référence** renseignant sur le **statut individuel des animaux**, dans le but d'estimer des caractéristiques non estimables de manière directe telles que la covariance des résultats de tests dépendants.

Ces différentes applications sont illustrées dans les trois grandes parties de notre travail ([Tableau 5](#)). Les maladies étudiées ont été choisies en raison de leur impact sanitaire en santé publique (tuberculose bovine, brucellose porcine en Polynésie française) et de leur impact économique direct (avortements, mortalité, baisse de fertilité des animaux, saisies à l'abattoir) ou indirect (entrave aux échanges commerciaux).

Tableau 5 : Contextes d'utilisation des outils d'aide à la décision sanitaire : applications choisies dans la thèse

Objectif de l'étude	Exemple d'application	Protocole de dépistage	Contexte épidémiologique	Statut infectieux individuel	Impact	Méthodes utilisées
Exploratoire	Brucellose porcine	Aucun dépistage systématique (sauf verrats reproducteurs et porcs d'élevages « à risque »)	Métropole : indemne avec foyers sporadiques Polynésie Française : enzootie	Inconnu	Economique Sanitaire (zoonose)	Approche bayésienne
Etude d'un test alternatif au test officiel	Epididymite contagieuse du bélier	Aucun dépistage systématique (sauf béliers reproducteurs et exportés)	Enzootie	Inconnu	Economique	Approche bayésienne
Evaluation a posteriori d'un protocole existant	Tuberculose bovine	Dépistage systématique	Fin d'éradication, faible prévalence	Connu pour certains animaux	Economique Sanitaire (zoonose)	Estimation directe Approche bayésienne

La première partie de ma thèse porte sur le dépistage de la brucellose porcine. La France métropolitaine est indemne de brucellose porcine (rares foyers sporadiques observés chaque année dans un contexte d'élevage « plein air », très marginal) tandis qu'en Polynésie française la brucellose porcine évolue sur un mode enzootique. Toutefois, aucun dépistage régulier n'est organisé dans les élevages en métropole ni en Polynésie. Seuls les verrats reproducteurs (d'élevages de type « industriel » surtout) sont testés systématiquement à leur entrée en centre de collecte de semence (ainsi que certains porcs d'élevages en plein air), à l'aide d'une épreuve à l'antigène tamponné (EAT) et d'un test de fixation du complément (FC). Les animaux provenant de chaque zone géographique peuvent donc être répartis en deux sous-populations : une sous-population très probablement indemne constituée par les verrats reproducteurs provenant de coopératives d'insémination animale et une sous-population très probablement infectée provenant d'élevages foyers. Dans chacune de ces sous-populations, le statut infectieux individuel de chaque animal n'est pas connu. Les caractéristiques des tests de dépistage de la brucellose porcine ont été peu étudiées. Par ailleurs, l'existence de deux contextes épidémiologiques radicalement différents en France métropolitain et en Polynésie impose l'utilisation de protocoles de dépistage adaptés.

L'objectif de cette étude était donc d'évaluer les caractéristiques de cinq tests de dépistage de la brucellose porcine, en l'absence de référence individuelle mais à partir de deux sous-populations (respectivement très probablement indemne et probablement infectée). Cette étude a été menée d'abord en France métropolitaine, puis en Polynésie Française, afin de proposer un protocole de dépistage adapté au contexte épidémiologique de la maladie dans chacune de ces deux zones géographiques.

La seconde partie de ma thèse porte sur l'épididymite contagieuse du bélier. Dans les départements du Sud de la France, l'infection par *Brucella ovis* évolue sur un mode enzootique, avec une prévalence d'infection des troupeaux d'environ 20%. Aucun dépistage systématique n'est effectué dans les élevages : seuls les béliers destinés à la reproduction et les animaux destinés à l'export sont soumis à un test de fixation du complément (FC). Toutefois, ce test présente des limites techniques qui suggèrent l'utilité d'étudier de nouveaux tests, tels qu'un kit I-ELISA disponible depuis peu.

Les objectifs de cette étude étaient les suivants :

- **évaluer la prévalence de l'épididymite contagieuse du bélier, et les caractéristiques de ce nouveau test de dépistage en l'absence d'information sur le statut infectieux individuel des animaux étudiés,**
- **comparer ces caractéristiques avec celles du test recommandé habituellement (FC)**
- **évaluer la possibilité d'utiliser le nouveau test comme alternative au test recommandé ou en association avec ce dernier** et l'efficacité des protocoles d'aide à la prise de décision sanitaire associés.

La troisième partie de mon travail porte sur la tuberculose bovine. Cette maladie est une maladie réputée contagieuse¹, dont l'éradication a débuté en 1955. Les outils disponibles pour le dépistage de la tuberculose bovine (intradermotuberculinations) sont imparfaits, et la situation de fin d'éradication engendre une diminution de la valeur prédictive positive des tests. De plus, une recrudescence inquiétante du nombre de cas a été observée ces dernières années dans trois zones géographiques françaises (Côte d'Or, Dordogne, Camargue) et a conduit les autorités à mettre en place un protocole de dépistage reposant sur l'utilisation d'un nouveau test en cours de validation, le dosage de l'interféron gamma. Une référence « positive » était disponible puisqu'une recherche de l'agent pathogène (*Mycobacterium bovis*) est effectuée de manière systématique chez les animaux provenant de troupeaux suspects abattus. L'appartenance à un cheptel officiellement indemne de

¹ La dénomination « maladie réputée contagieuse » a très récemment été remplacée par le terme « maladie réglementée de catégorie 1 » (réglementation en cours de modification)

tuberculose, soumis à un dépistage régulier et n'ayant pas été en lien épidémiologique avec un foyer durant plusieurs années constituait la référence « négative ».

Les objectifs de cette étude étaient d'évaluer les caractéristiques et les seuils de positivité du dosage de l'interféron gamma, de les comparer aux caractéristiques des intradermotuberculinations, puis de comparer l'efficacité du protocole de dépistage intégrant l'interféron gamma (appliqué entre 2009 et 2012 en Côte d'Or et en Dordogne) au protocole utilisant uniquement l'intradermotuberculination (recommandé par la réglementation européenne²).

² Directive CE/64/432

**CHAPITRE II : ÉTUDE DES CARACTERISTIQUES DE
PLUSIEURS TESTS INDIVIDUELS EN L'ABSENCE DE
REFERENCE DANS DES CONTEXTES EPIDEMIOLOGIQUES
DIFFERENTS: APPLICATION AU DEPISTAGE DE LA
BRUCELLOSE PORCINE**

1 Introduction et contexte

1.1 Agents pathogènes responsables de la brucellose porcine et physio-pathogénie de l'infection

Le principal agent de la brucellose porcine est *Brucella suis* (Huddleston, 1929). Les suidés peuvent épisodiquement être infectés par *B. abortus* ou *B. melitensis* dans les zones où la brucellose sévit de manière enzootique chez les ruminants (EFSA, 2009). L'infection des porcs domestiques et des sangliers est causée par trois des cinq biovars de *B. suis* (biovars 1, 2 ou 3 ; OIE, 2011b). Le biovar 2 est l'agent le plus couramment identifié chez l'animal en Europe mais il est généralement considéré comme non-pathogène pour l'être humain, bien que de très rares cas humains aient été recensés (Lagier *et al.*, 2005 ; Garin-Bastuji *et al.*, 2006). Les biovars 1 et 3, présents en Asie et en Amérique, sont au contraire très pathogènes et responsables de graves cas humains (EFSA, 2009).

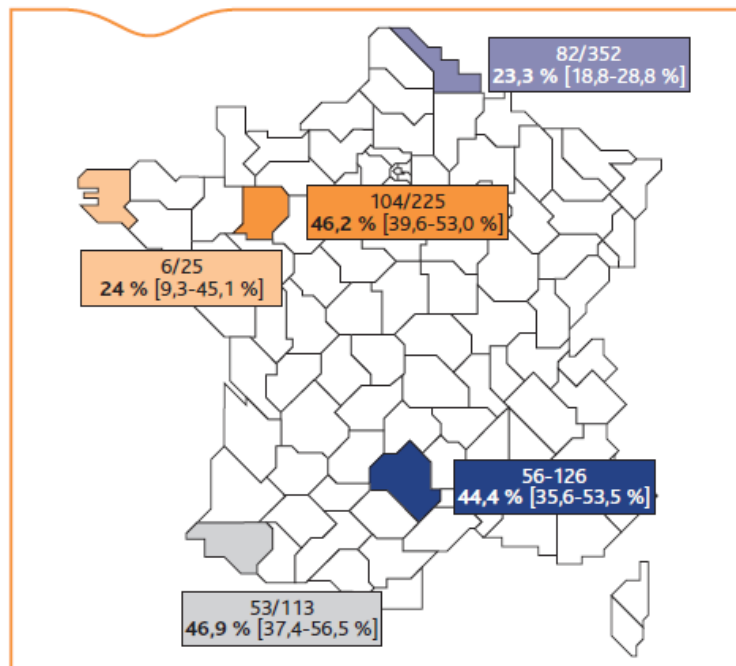
L'infection par *B. suis* engendre principalement des troubles de la reproduction et des troubles articulaires. Les conséquences économiques de la maladie dans les élevages porcins sont considérables : dans les cheptels nouvellement infectés en France, des taux d'avortement allant jusqu'à 50 % et des taux d'infertilité allant jusqu'à 95% ont été observés (Ganière *et al.*, 2011)

Les matières virulentes sont constituées par les sécrétions génitales (mâles et femelles) et le lait. Les animaux se contaminent le plus souvent de manière horizontale, par voie orale (ingestion d'avortons, de délivrances, d'aliments contaminés), par voie aérienne au contact d'aérosols infectieux produits lors des mises-bas ou avortements (muqueuses nasopharyngées, respiratoires ou conjonctivales) ou par voie vénérienne, lors de monte naturelle ou d'insémination artificielle (Metcalf *et al.*, 1994 ; Acha et Szyfres, 2005 ; OIE, 2011b). La brucellose peut aussi être transmise verticalement de la truie au porcelet, par voie transplacentaire ou par le lait. Chez les porcs domestiques, l'infection diffuse rapidement : à partir d'un cas index, la morbidité peut atteindre 50 % des porcs d'un élevage en quelques mois (Garin-Bastuji, LNR Brucellose, 2009, *communication personnelle*). Dans les zones d'enzootie, l'infection peut demeurer longtemps inapparente.

La faune sauvage (sanglier et lièvre) constitue la principale source d'infection pour les porcs domestiques dans les systèmes d'élevage en plein air en Europe. L'infection est souvent inapparente chez le sanglier (Payne *et al.*, 2011). La contamination à partir de cet animal se fait très vraisemblablement comme chez le porc par ingestion de cadavres de lièvres ou par voie vénérienne lors de l'introduction de sangliers mâles dans les élevages (Ganière *et al.*, 2011). La brucellose à *B. suis* biovar 2 est enzootique dans les populations de sangliers et de lièvres d'Europe. Des enquêtes sérologiques réalisées en France montrent que 20 à 45% des sangliers sont porteurs de *B. suis* selon

les départements (Garin-Bastuji *et al.*, 2004 ; Payne *et al.*, 2011) (Figure 10). La transmission au porc par d'autres animaux domestiques (chiens, chats) a été peu documentée et n'est pas considérée comme une voie majeure de contamination (EFSA, 2009). Les porcs infectés peuvent en revanche contaminer les autres animaux domestiques, notamment les ruminants (Garin-Bastuji, 2009, LNR Brucellose, *communication personnelle*).

Figure 10 : Résultats d'une enquête de dépistage sérologique de la brucellose porcine chez le sanglier réalisée dans cinq départements français en 2009 et 2010 (nombre d'animaux et pourcentages d'animaux infectés). (D'après Payne *et al.*, 2011)



La pathogénie de *B. suis* est à ce jour mal connue. Elle est probablement similaire à celle des autres espèces de *Brucella*. L'incubation est assez longue et la survenue des signes cliniques dépend de l'âge, du sexe et du statut physiologique de l'animal. *B. suis* est responsable d'infections chroniques. Elle induit une réaction immunitaire à médiation cellulaire, avec production d'interféron gamma et d'anticorps spécifiques, dirigés principalement contre le lipopolysaccharide de surface des bactéries mais aussi contre les protéines de membrane. Durant les deux premières semaines post-infection, les IgM¹ spécifiques prédominent. A partir de la troisième semaine, la concentration en IgG² augmente progressivement dans le sang. L'excrétion de la bactérie par les animaux infectés n'est pas systématique et, lorsqu'elle existe, peut être intermittente.

¹ IgM : Immunoglobulines M

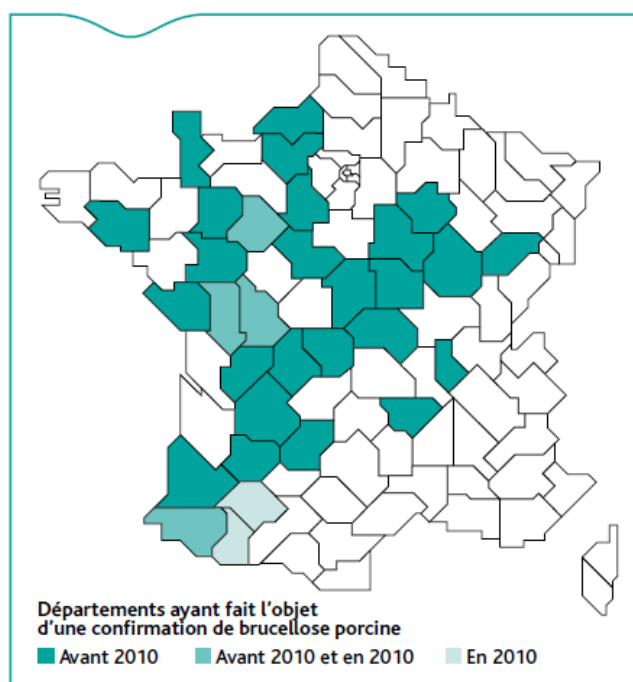
² IgG : Immunoglobulines G

1.2 La brucellose porcine en France : contexte épidémiologique et réglementation

La brucellose porcine est fréquente dans certaines parties du monde : Amérique du Nord, Amérique du Sud, Europe centrale, Asie. Le nombre de cas recensés est particulièrement élevé en Amérique du Sud et en Asie du Sud-est (OIE, 2011b).

En France, la brucellose porcine était cantonnée aux élevages familiaux jusque dans les années 1970. Le nombre de foyers a ensuite chuté. De nos jours, les porcs produits dans les filières dites « industrielles » (élevages hors-sol, confinés) sont indemnes de l'infection mais on observe de temps à autre la survenue de foyers dans les élevages en plein-air. Entre 1993 et 2010, 63 foyers ont été répertoriés dans 31 départements français (Bronner *et al.*, 2011 ; **Figure 11**), avec identification de *B. suis* biovar 2 dans la majorité d'entre eux (Garin-Bastuji *et al.*, 2004 ; Garin-Bastuji, comm. pers.). Ces foyers sont tous survenus dans des élevages en plein-air, et les informations épidémiologiques disponibles suggèrent le rôle des sangliers sauvages en tant que principal réservoir de la maladie (EFSA, 2009).

Figure 11 : Répartition géographique des foyers de brucellose porcine en élevage porcin entre 1993 et 2010 (D'après Bronner *et al.*, 2011)



Depuis 2001¹, la brucellose des suidés domestiques et sauvages fait partie des « Maladies Réputées Contagieuses », devenues très récemment « Maladies Réglementées de catégorie 1 ». La

¹ Décret n° 2001-441 du 21 mai 2001

réglementation prévoit l'abattage total des troupeaux dont l'infection brucellique est avérée, sans dérogation possible¹.

En revanche, aucun dépistage systématique de la brucellose n'est prévu par la loi dans les élevages de suidés. En France, seuls sont soumis au dépistage de la brucellose porcine les verrats reproducteurs et les porcs provenant d'élevages « à risque » (en particulier élevages en plein air). Les verrats donneurs de semence sont contrôlés à leur entrée en centre de collecte de sperme, puis périodiquement au cours de leur carrière de reproducteur.

1.3 Modalités diagnostiques de la brucellose porcine

Le diagnostic de la brucellose porcine repose en premier lieu sur l'observation des signes cliniques (arthrites et troubles de la reproduction : avortements tardifs, mortalité embryonnaire, rétentions placentaires, infertilité, orchites, épидидymites), associés à l'isolement de la bactérie et/ou à un résultat positif en sérologie.

1.3.1 Mise en évidence de l'agent pathogène au laboratoire

L'observation microscopique d'un calque de prélèvement sur lame (écouvillon vaginal, placenta, avorton, nœud lymphatique) après coloration de Stamp peut permettre de suspecter une brucellose. Cette technique ne permet pas de distinguer *B. suis* des autres *Brucella*, et manque de sensibilité et de spécificité (EFSA, 2009).

Le diagnostic de certitude de la brucellose porcine repose sur la mise en culture de prélèvements et l'isolement de la souche bactérienne. L'isolement peut être effectué à partir d'un écouvillon vaginal, des organes de porcelets mort-nés, des annexes fœtales, du lait, du sperme ou de synovie lors d'arthrite. A partir d'une carcasse, les tissus du système réticulo-endothélial constituent les prélèvements de prédilection (EFSA, 2009). L'utilisation de la PCR permet l'identification de *B. suis*, en réduisant le temps nécessaire à l'obtention du résultat (Whatmore *et al.*, 2005).

¹ Arrêté du 14 novembre 2005 modifié

1.3.2 Diagnostic sérologique

La membrane de *B. suis* est composée de phospholipides, de protéines et d'un lipopolysaccharide en phase lisse (Smooth Lipopolysaccharide ou S-LPS). La plupart des anticorps synthétisés sont dirigés contre le S-LPS et la plupart des tests sérologiques utilisés détectent la présence d'anticorps dirigés contre des épitopes portés par cette molécule. D'autres antigènes de membrane, protéiques notamment, peuvent permettre de diagnostiquer la brucellose, mais la sensibilité des tests correspondants est moindre (EFSA, 2009).

Les tests sérologiques de dépistage couramment utilisés (épreuve à l'antigène tamponné – EAT – et fixation du complément – FC) sont surtout utiles au contrôle du statut des cheptels, mais ils sont trop peu fiables pour dépister la brucellose chez des animaux considérés individuellement (EFSA, 2009).

La sensibilité et la spécificité des tests de dépistage de la brucellose porcine sont mal connues. Les tests ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indirect (I-ELISA) et compétitif (C-ELISA) ont une spécificité et une sensibilité élevées (comprises entre 0,98 et 1 (EFSA, 2009)), mais ils n'ont pas fait l'objet d'une évaluation complète et leur utilisation n'est pas normalisée. Le rapport de l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA, 2009) propose une synthèse des données concernant les caractéristiques des tests de dépistage actuellement disponibles dans la littérature par méta-analyse. Les estimations de sensibilité et de spécificité réalisées par l'EFSA (2009) pour les quatre types de tests évalués dans la suite cette étude (cf. 3.2) figurent dans le [Tableau 6](#). Dans la plupart des études sur lesquelles repose cette méta-analyse, les caractéristiques des tests étaient évaluées dans des conditions expérimentales et par rapport à un second test, considéré comme référence : aucune étude de leurs caractéristiques dans des conditions de terrain n'avait encore été réalisée.

Tableau 6 : Estimation par méta-analyse de la sensibilité et de la spécificité de quatre types de tests de dépistage de la brucellose porcine (D'après EFSA, 2009)

Test	Sensibilité [Intervalle de confiance à 95%]	Spécificité [Intervalle de confiance à 95%]
EAT	0,870 [0,802 ; 0,922]	0,998 [0,997 ; 0,998]
FPA	Non évaluée	0,952 [0,945 ; 0,958]
C-ELISA	1 [0,988 ; 1,000]	0,979 [0,976 ; 0,982]
I-ELISA	1 [0,998 ; 1,000]	0,999 [0,999 ; 1,000]

2 Objectifs de l'étude

Les tests utilisés pour le dépistage de la brucellose porcine dans les centres de reproducteurs, ou pour le diagnostic en élevage suite à des signes cliniques (EAT, FC) sont imparfaits. Pourtant, certains tests (kits C-ELISA et I-ELISA) paraissent intéressants (en raison de leurs sensibilité et spécificité élevées et car ils présentent certains avantages techniques) mais les caractéristiques intrinsèques des tests utilisables en France n'ont pas encore été complètement évaluées sur le terrain. Les principes généraux de ces tests sont résumés en [Annexe 5](#).

Par ailleurs, en France, le contexte épidémiologique de la brucellose porcine varie considérablement selon la zone géographique considérée (France métropolitaine vs. Polynésie Française) et il est impossible d'extrapoler les résultats obtenus dans une zone à l'ensemble de la population porcine française. Or, aucune étude des caractéristiques des tests disponibles pour le dépistage de la brucellose porcine n'a, jusqu'à présent, tenu compte de ces différences.



L'objectif de cette étude était d'évaluer les caractéristiques de cinq tests de dépistage de la brucellose porcine, en vue d'une utilisation ultérieure par le Laboratoire National de Référence de la Brucellose (EU/OIE/FAO) (LNR Brucellose, Laboratoire de Santé Animale, ANSES, Maisons-Alfort). Aucune référence n'était disponible concernant le statut infectieux individuel des animaux mais le contexte épidémiologique d'origine des porcs était connu (porcs provenant d'élevages foyers vs. porcs provenant d'élevages indemnes). Cette étude a été menée **en France métropolitaine d'une part et en Polynésie Française d'autre part, afin de proposer un protocole de dépistage adapté au contexte épidémiologique** de la maladie dans chacune de ces deux zones géographiques.

Cette étude a fait l'objet d'**un article publié** et d'**un article accepté sous réserve de modifications** dans des revues internationales à comité de lecture :

PRAUD A., GIMENEZ O., ZANELLA G., DUFOUR B., POZZI N., ANTRAS V., MEYER L., GARIN-BASTUJI B. (2012) Estimation of sensitivity and specificity of five serological tests for the diagnosis of porcine brucellosis. *Preventive Veterinary Medicine*, **104**: 94-100. (cf.

Annexe 1)

PRAUD A., GIMENEZ O., ZANELLA G., DUFOUR B., POZZI N., ANTRAS V., MEYER L., GARIN-BASTUJI B. Evaluation of five serological tests for the diagnosis of porcine brucellosis in French Polynesia. *Tropical Animal Health and Production* (Accepté sous réserve de modifications) (cf. Annexe 3)

3 Matériels et méthodes

3.1 Source des données et échantillons

3.1.1 Population 1 : France métropolitaine

En France métropolitaine, les sérums de 6422 porcs ont été testés. 1799 porcs provenaient de 32 élevages en plein-air dans lesquels un foyer de brucellose porcine (avec isolement de *B. suis* biovar 2 sur au moins un animal) avait été détecté (sous-population « présumée infectée »). La recherche de *Brucella suis* n'avait pas été effectuée de manière systématique sur ces 1799 individus : aucune référence « positive » ou « négative » individuelle n'était disponible. Les 4623 porcs restants provenaient de centres d'insémination artificielle porcins officiellement indemnes de brucellose porcine et ne présentant aucun facteur de risque de contamination (sous-population « présumée indemne »).

La population porcine étudiée en France métropolitaine était relativement homogène, tant concernant la conduite d'élevage que les origines génétiques des animaux. Les animaux appartenaient majoritairement à trois races : Landrace, Large White et Piétrain. Les sérums ont été prélevés entre 1997 et 2005.

3.1.2 Population 2 : Polynésie française

En Polynésie française, les sérums de 1595 porcs ont été testés. 694 porcs provenaient d'élevages dans lesquels *B. suis* biovar 1 avait été isolée dans les 12 mois précédents¹ (sous-population « présumée infectée »). De même que dans la population métropolitaine, la recherche de *Brucella suis* n'avait pas été effectuée de manière systématique ce qui implique que le statut

¹ La Polynésie Française n'est pas soumise à la réglementation métropolitaine en matière d'abattage des cheptels atteints de brucellose. L'abattage total n'est pas réalisé de manière systématique et aucun dédommagement n'est prévu pour les éleveurs qui choisissent cette option (Bruno Garin-Bastuji, LNR Brucellose, 2010, *communication personnelle*).

infectieux individuel de ces animaux n'était pas connu. Les 901 porcs restants étaient élevés dans 11 fermes considérées comme indemnes de brucellose porcine par les services vétérinaires locaux ; les animaux de ces élevages ne présentaient aucun signe clinique de brucellose ni facteur de risque de contamination connu (sous-population « présumée indemne »).

La population étudiée en Polynésie française était hétérogène, à la fois concernant l'origine génétique des animaux (nombreuses races locales et croisements) et leurs conditions d'élevage (élevages « semi-industriels »). Les sérums ont été prélevés entre 2002 et 2007.

3.2 Tests étudiés

Cinq tests de dépistage ont été étudiés :

- l'Epreuve à l'antigène tamponné (EAT) ou test au Rose-Bengale (RBT), Institut Pourquier (France) ;
- un test de polarisation de fluorescence (Fluorescence Polarization Assay ; FPA), *B. abortus* antibody test kit, Diachemix / Prionics (Suisse) ;
- un kit ELISA indirect (Indirect Enzyme Immunoassay ; I-ELISA), Chekit *B. suis*, Idexx-Bommeli (Suisse) ;
- deux kits ELISA de compétition (Competitive Enzyme Immunoassay ; C-ELISA₁ and C-ELISA₂), respectivement SVANOVIR *Brucella*-Ab C-ELISA, Svanova (Suède) et Compelisa, VLA (Grande-Bretagne).

Les analyses sérologiques ont été effectuées au LNR Brucellose, par deux techniciens expérimentés. Les tests ont été réalisés « en aveugle » : les techniciens n'avaient connaissance ni de la provenance des porcs testés, ni de leur statut présumé vis-à-vis de l'infection, ni des résultats qu'ils avaient obtenus aux autres tests.

L'antigène utilisé pour l'EAT était standardisé selon les recommandations de l'OIE et de l'Union Européenne (OIE, 2011a¹). Pour les autres tests, les seuils de positivité utilisés étaient ceux recommandés par les fabricants. : FPA = 20; I-ELISA > 70% Densité Optique (D.O.)²; C-ELISA₁ ≥ 30% D.O.; C-ELISA₂ ≤ 60% D.O.). Les résultats de l'EAT et des C-ELISA étaient exprimés de manière binaire : positifs ou négatifs. Les résultats du FPA et de l'I-ELISA pouvaient être positifs, négatifs ou douteux.

¹ Décision de la Commission Européenne du 10 décembre 2008

² Les % de densité optique (D.O.) sont obtenus selon la formule normalisée suivante :

% D.O. = (D.O.·Echantillon - D.O.·Témoin Négatif) / (D.O.·Témoin positif - D.O.·Témoin Négatif)

↪ Les porcs présentant des **résultats douteux ont été exclus de l'étude** (analyse « résultats douteux exclus). Une **analyse de sensibilité a ensuite été réalisée en les incluant dans l'étude**, suivant différentes modalités d'interprétation:

- en les considérant comme **positifs chez tous les porcs** (analyse « résultats douteux considérés comme positifs »);
- en les considérant comme **négatifs chez tous les porcs** (analyse « résultats douteux considérés comme négatifs »);
- **selon l'origine des animaux** : interprétés comme des résultats négatifs pour les porcs des sous-populations « présumées indemnes » et interprétés comme des résultats positifs pour les porcs des sous-populations « présumées infectées » (analyse « résultats douteux interprétés selon le contexte » ;
- **selon les résultats obtenus aux autres tests** : interprétés comme des résultats négatifs pour les porcs obtenant des résultats négatifs à au moins deux des trois autres tests étudiés et interprétés comme des résultats positifs pour les porcs obtenant des résultats positifs à au moins deux des trois autres tests étudiés.


Seuls les résultats de ces trois premières analyses sont présentés dans ce manuscrit. Les raisons de ce choix sont discutées dans le paragraphe 5.

3.3 Modélisation et approche statistique : estimation des caractéristiques des tests de dépistage

Aucune information n'était disponible sur le statut individuel des porcs vis-à-vis de l'infection. Une approche par modélisation à l'aide d'un modèle à classe latente a donc été choisie pour estimer la sensibilité et la spécificité des tests.

3.3.1 Modélisation de la relation de dépendance entre les tests

Le modèle utilisé pour estimer les caractéristiques des tests était un modèle classique proposé par Berkvens *et al.* (2006) et Praet *et al.* (2006). Ce modèle est adapté à l'étude de plusieurs tests liés par une relation de dépendance conditionnelle. Il permet l'estimation des sensibilités et des spécificités de ces tests et de la prévalence dans la population étudiée ainsi que de la covariance des sensibilités et des spécificités des tests étudiés par paires.

 **Remarque :**

Les caractéristiques des tests ont été estimées à l'aide d'un modèle « cinq tests – une population ». Etant donné la nature des processus biologiques sur lesquels reposent les cinq tests, un modèle autorisant l'existence d'une dépendance conditionnelle entre les résultats des tests a été choisi. La France métropolitaine et la Polynésie Française ont été étudiées séparément afin de tenir compte de l'influence éventuelle du contexte sur les caractéristiques des tests. Les sous-populations « présumée indemne » et « présumée infectée » ont été agrégées : chaque population a été étudiée dans son ensemble, sans **tenir compte de l'existence de sous-populations**. Ce choix a été fait en raison du fait que les prévalences dans chacune des deux sous-populations étaient proches des extrêmes (0 ou 1). Les raisons de ce choix sont plus amplement discutées dans le paragraphe 5.

Le nombre de paramètres à estimer dans le modèle était de 63. Les 32 classes de résultats croisés possibles autorisant 31 degrés de liberté, l'estimation des 63 paramètres a été permise par l'introduction de priors informatifs dans le modèle.

Dans une population donnée, on définit les résultats croisés aux 5 tests des animaux de la façon suivante :

y_{00000} : nombre d'animaux fournissant un résultat négatif au test 1 (T_1), au test 2 (T_2), au test 3 (T_3), au test 4 (T_4) et au test 5 (T_5) ;

y_{00001} : nombre d'animaux fournissant un résultat négatif à T_1, T_2, T_3, T_4 et un résultat positif à T_5 ;

(...) et ainsi de suite jusqu'à :

y_{11111} : nombre d'animaux fournissant un résultat positif à T_1, T_2, T_3, T_4 et T_5 .

Les données sont exprimées sous la forme du vecteur $y = (y_{00000} \dots y_n \dots y_{11111})$.

Soient $pr_{00000}, \dots, pr_n, \dots, pr_{11111}$ les probabilités respectives de survenue des événements $y_{00000}, \dots, y_n, \dots, y_{11111}$. Le vecteur y suit une loi multinomiale : $y \sim \text{dmultinomiale}(pr_{00000}, \dots, pr_n, \dots, pr_{11111})$.

On note D+ un individu atteint et D- un individu indemne. Les probabilités conditionnelles pour un modèle intégrant les cinq tests diagnostiques sont définies dans le [Tableau 7](#).

Les probabilités de survenue ($pr_{00000}, \dots, pr_n, \dots, pr_{11111}$) des combinaisons de résultats ($y_{00000}, \dots, y_n, \dots, y_{11111}$) sont alors exprimées en fonction des probabilités conditionnelles p_1 à p_6 .

$$pr_{00000} = \text{prev} * (1-p_2) * (1-p_5) * (1-p_{11}) * (1-p_{23}) * (1-p_{47}) + (1-\text{prev}) * p_3 * p_6 * p_{12} * p_{24} * p_{48}$$

(...) jusqu'à :

$$pr11111 = \text{prev} * p2 * p4 * p8 * p16 * p32 + (1 - \text{prev}) * (1 - p3) * (1 - p7) * (1 - p15) * (1 - p31) * (1 - p63).$$

Le détail des probabilités conditionnelles de survenue des combinaisons de résultats figure en [Annexe 7](#).

Tableau 7 : Probabilités conditionnelles pour un modèle incluant cinq tests dépendants

Prevalence = $P(D^+)$	$p1$	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^+ \cap T_4^-)$	$p33$
$Se_1 = P(T_1^+ D^+)$	$p2$	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^- \cap T_4^+)$	$p34$
$Sp_1 = P(T_1^- D^-)$	$p3$	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^- \cap T_4^-)$	$p35$
$P(T_2^+ D^+ \cap T_1^+)$	$p4$	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^- \cap T_3^+ \cap T_4^+)$	$p36$
$P(T_2^+ D^+ \cap T_1^-)$	$p5$	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^- \cap T_3^+ \cap T_4^-)$	$p37$
$P(T_2^- D^- \cap T_1^-)$	$p6$	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^- \cap T_3^- \cap T_4^+)$	$p38$
$P(T_2^- D^- \cap T_1^+)$	$p7$	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^- \cap T_3^- \cap T_4^-)$	$p39$
$P(T_3^+ D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^+)$	$p8$	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^- \cap T_2^+ \cap T_3^+ \cap T_4^+)$	$p40$
$P(T_3^+ D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^-)$	$p9$	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^- \cap T_2^+ \cap T_3^+ \cap T_4^-)$	$p41$
$P(T_3^+ D^+ \cap T_1^- \cap T_2^+)$	$p10$	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^- \cap T_2^+ \cap T_3^- \cap T_4^+)$	$p42$
$P(T_3^+ D^+ \cap T_1^- \cap T_2^-)$	$p11$	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^- \cap T_2^+ \cap T_3^- \cap T_4^-)$	$p43$
$P(T_3^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^-)$	$p12$	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^+ \cap T_4^+)$	$p44$
$P(T_3^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^+)$	$p13$	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^+ \cap T_4^-)$	$p45$
$P(T_3^- D^- \cap T_1^+ \cap T_2^-)$	$p14$	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^- \cap T_4^+)$	$p46$
$P(T_3^- D^- \cap T_1^+ \cap T_2^+)$	$p15$	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^- \cap T_4^-)$	$p47$
$P(T_4^+ D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^+)$	$p16$	$P(T_5^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^- \cap T_4^-)$	$p48$
$P(T_4^+ D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^-)$	$p17$	$P(T_5^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^- \cap T_4^+)$	$p49$
$P(T_4^+ D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^- \cap T_3^+)$	$p18$	$P(T_5^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^+ \cap T_4^-)$	$p50$
$P(T_4^+ D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^- \cap T_3^-)$	$p19$	$P(T_5^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^+ \cap T_4^+)$	$p51$
$P(T_4^+ D^+ \cap T_1^- \cap T_2^+ \cap T_3^+)$	$p20$	$P(T_5^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^+ \cap T_3^- \cap T_4^-)$	$p52$
$P(T_4^+ D^+ \cap T_1^- \cap T_2^+ \cap T_3^-)$	$p21$	$P(T_5^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^+ \cap T_3^- \cap T_4^+)$	$p53$
$P(T_4^+ D^+ \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^+)$	$p22$	$P(T_5^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^+ \cap T_3^+ \cap T_4^-)$	$p54$
$P(T_4^+ D^+ \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^-)$	$p23$	$P(T_5^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^+ \cap T_3^+ \cap T_4^+)$	$p55$
$P(T_4^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^-)$	$p24$	$P(T_5^- D^- \cap T_1^+ \cap T_2^- \cap T_3^- \cap T_4^-)$	$p56$
$P(T_4^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^+)$	$p25$	$P(T_5^- D^- \cap T_1^+ \cap T_2^- \cap T_3^- \cap T_4^+)$	$p57$
$P(T_4^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^+ \cap T_3^-)$	$p26$	$P(T_5^- D^- \cap T_1^+ \cap T_2^- \cap T_3^+ \cap T_4^-)$	$p58$
$P(T_4^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^+ \cap T_3^+)$	$p27$	$P(T_5^- D^- \cap T_1^+ \cap T_2^- \cap T_3^+ \cap T_4^+)$	$p59$
$P(T_4^- D^- \cap T_1^+ \cap T_2^- \cap T_3^-)$	$p28$	$P(T_5^- D^- \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^- \cap T_4^-)$	$p60$
$P(T_4^- D^- \cap T_1^+ \cap T_2^- \cap T_3^+)$	$p29$	$P(T_5^- D^- \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^- \cap T_4^+)$	$p61$
$P(T_4^- D^- \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^-)$	$p30$	$P(T_5^- D^- \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^+ \cap T_4^-)$	$p62$
$P(T_4^- D^- \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^+)$	$p31$	$P(T_5^- D^- \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^+ \cap T_4^+)$	$p63$
$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^+ \cap T_4^+)$	$p32$		

La sensibilité et la spécificité de chacun des tests peuvent à présent être définies comme des fonctions des probabilités conditionnelles présentées ci-dessus :

$$Se1=p2$$

$$Sp1=p3$$

$$Se2=p2*p4+ (1-p2)*p5$$

$$Sp2=p3*p6+ (1-p3)*p7$$

(...) et ainsi de suite. Le détail des paramètres du modèle exprimés en fonction des probabilités conditionnelles de survenue des combinaisons de résultats figure en [Annexe 8](#).

Le modèle tel qu'il est présenté dans les travaux de Berkvens *et al.* (2006) et Praet *et al.* (2006) est conçu pour autoriser une relation de dépendance conditionnelle entre les tests mais il ne permet pas de calculer l'intensité de cette relation de dépendance. Nous l'avons donc adapté pour permettre le calcul des covariances des sensibilités (γ_{Se}) et des covariances des spécificités (γ_{Sp}) de chaque paire de tests. Le détail des calculs est présenté en [Annexe 9](#) et en [Annexe 10](#). Le code utilisé sous WinBUGS figure en [Annexe 11](#).

3.3.2 Estimation des paramètres des modèles et comparaison des modèles

Les paramètres des différents modèles ont été estimés à l'aide d'une approche bayésienne. Les données ont été simulées par un processus itératif (algorithme Monte Carlo par chaîne de Markov) utilisant l'échantillonneur de Gibbs, grâce au logiciel WinBUGS (Lunn *et al.*, 2000), sur 51 000 itérations (dont un temps de chauffe – ou « burn-in » de 1000 itérations). Les résultats sont exprimés par une valeur moyenne affectée d'un intervalle de crédibilité à 95% (25^{ème} et 95^{ème} percentiles ; ICr 95%).

Les hypothèses *a priori* introduites dans le modèle ont été déterminées à l'aide de données disponibles dans la littérature. En raison du faible nombre d'études portant sur la brucellose porcine, de la diversité des contextes épidémiologiques et des méthodes statistiques utilisés (Silva Paulo *et al.*, 2000; Muma *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 2008), les résultats d'autres études réalisées sur différentes espèces animales ont été prises en compte pour rendre les distributions plus diffuses. Les valeurs moyennes de sensibilité et de spécificité disponibles dans la littérature pour les tests étudiés sont récapitulées dans le [Tableau 8](#).

Tableau 8 : Valeurs moyennes de sensibilité et de spécificité disponibles dans la littérature* pour les quatre catégories de tests étudiés

	Sensibilité moyenne	Spécificité moyenne
EAT	0,597 à 1	0,81 à 1
FPA	0,72 à 0,993	0,93 à 0,984
I-ELISA	0,96 à 1	0,938 à 1
C-ELISA	0,905 à 0,988	0,60 à 1

*Gall *et al.*, 1998; Silva Paulo *et al.*, 2000; Nielsen, 2002; Gall *et al.*, 2003; Gall and Nielsen, 2004; Muñoz *et al.*, 2005; EFSA, 2009; Muma *et al.*, 2007; Muma *et al.*, 2009; Nielsen *et al.*, 2008.

La prévalence dans l'échantillon et les covariances des sensibilités et des spécificités des tests étaient inconnues et ont donc été modélisées sous forme de lois Beta(1,1) non informatives. Les paramètres des distributions Beta(a,b) informatives introduites dans le modèle sont présentés dans le [Tableau 9](#).

Tableau 9 : Paramètres des distributions Beta(a,b) utilisées comme hypothèses *a priori* pour les sensibilités et les spécificités des tests étudiés

Paramètre d'intérêt	Borne inférieure (95%)	Moyenne	Beta (a, b)		
			a	b	
EAT	Se ¹	0,75	0,86	33,37	5,432
	Sp ²	0,76	0,88	24,93	3,400
FPA	Se	0,87	0,92	107,4	9,341
	Sp	0,91	0,97	30,39	0,940
I-ELISA	Se	0,94	0,98	47,04	0,960
	Sp	0,94	0,98	47,04	0,960
C-ELISA	Se	0,91	0,96	58,02	2,418
	Sp	0,76	0,92	9,660	0,840

¹ Se = Sensibilité ; ² Sp = Spécificité

4 Résultats

4.1 Sensibilité et spécificité des tests utilisés pour le dépistage de la brucellose porcine en France métropolitaine

4.1.1 Résultats douteux exclus

Les résultats des 5725 porcs métropolitains obtenant des résultats non douteux aux tests sont présentés dans le [Tableau 10](#). Dans la sous-population présumée indemne, la plupart des porcs

(84,1%) obtenaient des résultats négatifs aux 5 tests étudiés. Dans la sous-population infectée, 56,9% des porcs obtenaient un résultat positif à au moins un test.

Tableau 10 : Résultats croisés aux cinq tests de dépistage de la brucellose porcine chez 5725 porcs métropolitains dans chacune des deux sous-populations étudiées

(Après exclusion de 697 porcs présentant des résultats douteux en FPA et/ou en I-ELISA)

Résultats aux tests					Nombre de porcs	
EAT	FPA	I-ELISA	C-ELISA ₁	C-ELISA ₂	Sous-population	
					Présumée Infectée	Présumée Indemne
0 ¹	0	0	0	0	700	3 889
1 ²	0	0	0	0	29	26
0	1	0	0	0	47	43
1	1	0	0	0	17	12
0	0	1	0	0	3	1
1	0	1	0	0	0	0
0	1	1	0	0	9	33
1	1	1	0	0	1	6
0	0	0	1	0	7	20
1	0	0	1	0	8	0
0	1	0	1	0	7	9
1	1	0	1	0	64	8
0	0	1	1	0	1	0
1	0	1	1	0	4	0
0	1	1	1	0	20	4
1	1	1	1	0	70	0
0	0	0	0	1	0	10
1	0	0	0	1	0	0
0	1	0	0	1	1	0
1	1	0	0	1	3	3
0	0	1	0	1	0	0
1	0	1	0	1	0	0
0	1	1	0	1	2	4
1	1	1	0	1	3	2
0	0	0	1	1	0	0
1	0	0	1	1	3	1
0	1	0	1	1	7	5
1	1	0	1	1	167	24
0	0	1	1	1	3	0
1	0	1	1	1	12	0
0	1	1	1	1	46	2
1	1	1	1	1	373	16
TOTAL					1 607	4 118

¹ « 0 » : Résultat négatif ; ² « 1 » : Résultat positif

Les sensibilités et les spécificités des cinq tests estimées en France métropolitaine à l'aide d'un modèle classe latente par une approche bayésienne sont présentées dans le **Tableau 11**. La prévalence dans l'échantillon de porcs étudié en France métropolitaine était estimée à 0,121 [0,105; 0,134]_{ICr95%}¹. Le C-ELISA₂ était le test le plus sensible et le plus spécifique (Se C-ELISA₂ = 0,964 [0,907; 0,994]_{ICr95%}; Sp C-ELISA₂ = 0,996 [0,982; 1,0]_{ICr95%}). Le C-ELISA₁ était un peu moins sensible et spécifique que le C-ELISA₂ mais ses caractéristiques étaient satisfaisantes (Se C-ELISA₁ = 0,953 [0,906; 0,989]_{ICr95%}; Sp C-ELISA₁ = 0,956 [0,942; 0,966]_{ICr95%}). Le test le moins sensible était l'I-ELISA (Se I-ELISA = 0,663 [0,607; 0,710]_{ICr95%}) et le moins spécifique le FPA (Sp FPA = 0,930, [0,917; 0,941]_{ICr95%}).

Tableau 11 : Résultats d'estimation des sensibilités et spécificités des tests étudiés en France métropolitaine par une approche bayésienne

(Analyse « Résultats douteux exclus »)		
Paramètre		Valeur moyenne [ICr 95%] ¹
EAT	Se ²	0,876 [0,835 ; 0,913]
	Sp ³	0,951 [0,939 ; 0,959]
FPA	Se	0,937 [0,890 ; 0,970]
	Sp	0,930 [0,917 ; 0,941]
I-ELISA	Se	0,663 [0,607 ; 0,710]
	Sp	0,969 [0,958 ; 0,976]
C-ELISA₁	Se	0,953 [0,906 ; 0,989]
	Sp	0,956 [0,942 ; 0,966]
C-ELISA₂	Se	0,964 [0,907 ; 0,994]
	Sp	0,996 [0,982 ; 1,0]
Prévalence		0,121 [0,105 ; 0,134]
DIC		168

¹ Intervalle de crédibilité à 95% ; ² Se = Sensibilité ; ³ Sp = Spécificité

L'analyse des covariances a montré que leurs valeurs moyennes pour la sensibilité et la spécificité (γ Se et γ Sp) des tests étudiés deux à deux étaient faibles (valeurs étendues de -0,0015 à 0,0362). Seule la γ Se de l'I-ELISA et de l'EAT était négative. Les covariances les plus élevées étaient γ Se_{C-ELISA1-EAT} = 0,0210 [0,00319; 0,0470]_{ICr95%} et γ Sp_{I-ELISA-FPA} = 0,0362 [0,0198; 0,0329]_{ICr95%}. Les intervalles de crédibilité à 95% incluaient la valeur « 0 » pour les γ Se de cinq paires de tests et pour les γ Sp d'une paire de tests. Pour les quatorze autres covariances, l'intervalle de crédibilité à 95%

¹ ICr 95% : Intervalle de crédibilité à 95%

excluait la valeur « 0 », confirmant l'existence d'une relation de dépendance conditionnelle positive entre les cinq tests étudiés. Les résultats de l'analyse de covariance sont détaillés en [Annexe 12](#).

4.1.2 Résultats douteux inclus

Comme expliqué précédemment (paragraphe 3.2) les paramètres ont été estimés après inclusion des résultats douteux dans l'étude afin de réaliser une analyse de sensibilité du modèle. Le résultat en FPA et/ou en I-ELISA était douteux pour 697 porcs (10,9% de la population étudiée en métropole). Ces individus, obtenant au moins un résultat douteux, seront désignés par le terme « individus douteux » dans la suite du texte.

La plupart d'entre eux (505 porcs, soit 72,5% des individus douteux) appartenaient à la population présumée indemne. Dans cette sous-population la majorité des individus douteux (85,1%, soit 430 porcs) obtenaient un résultat douteux en FPA et des résultats négatifs aux quatre autres tests.

Dans la sous-population « présumée infectée », 37,0% des individus douteux (soit 71 porcs) obtenaient un résultat douteux en FPA et des résultats négatifs aux autres tests, 20,8% des individus douteux (soit 40 porcs) obtenaient un résultat douteux en I-ELISA et des résultats positifs aux quatre autres tests.

Les résultats des estimations effectuées en incluant les résultats douteux (en FPA et/ou en I-ELISA) sont présentés dans l'[Annexe 13](#). Ces résultats n'étaient pas significativement différents de ceux obtenus en excluant les résultats douteux hormis la spécificité du FPA qui diminuait significativement ($p < 0,05$) lorsque les résultats douteux étaient considérés comme positifs.

Le DIC¹ ne variait pas de manière notable selon la règle d'interprétation choisie (166, 168, 173 et 175 lorsque les résultats douteux étaient interprétés selon le contexte, exclus, considérés comme négatifs ou considérés comme positifs, respectivement).

Afin de poursuivre l'étude de la sensibilité du modèle, les analyses ont ensuite été répétées en utilisant des distributions *a priori* de plus en plus diffuses (Enøe *et al.*, 2000). Les analyses ont également été conduites en étudiant différentes combinaisons de deux, trois ou quatre tests parmi les cinq, à l'aide du même modèle adapté à l'étude de deux, trois ou quatre tests dans une population. Les estimations moyennes des paramètres d'intérêt n'étaient pas affectées de manière significative par ces variations.

¹ DIC : Deviance Information Criterion

4.2 Sensibilité et spécificité des tests utilisés pour le dépistage de la brucellose porcine en Polynésie française

Les résultats croisés aux cinq tests étudiés dans la population porcine polynésienne sont présentés dans le [Tableau 12](#). Dans la sous-population « présumée indemne », 86,5% des porcs présentaient des résultats négatifs aux cinq tests étudiés. Dans la sous-population « présumée infectée », 67,3% des porcs présentaient un résultat positif à au moins l'un des cinq tests.

La proportion de porcs présentant des résultats douteux en FPA et/ou en I-ELISA (désignés par le terme « individus douteux » dans la suite du texte) était de 7,8%. 61,3% d'entre eux provenaient de la sous-population « présumée indemne ».

72 porcs parmi les 76 individus douteux appartenant à la sous-population « présumée indemne » et 20 porcs parmi les 48 individus douteux appartenant à la sous-population « présumée infectée » obtenaient un résultat douteux en FPA et des résultats négatifs aux quatre autres tests.

Tableau 12 : Résultats croisés aux cinq tests de dépistage de la brucellose porcine chez 1471 porcs polynésiens dans chacune des deux sous-populations étudiées

(Après exclusion de 124 porcs présentant des résultats douteux en FPA et / ou en I-ELISA)

Résultats aux tests					Nombre de porcs	
EAT	FPA	I-ELISA	C-ELISA ₁	C-ELISA ₂	Sous-population	
					Présumée Infectée	Présumée indemne
0 ¹	0	0	0	0	203	779
1 ²	0	0	0	0	8	6
0	1	0	0	0	33	0
1	1	0	0	0	7	0
0	0	1	0	0	9	2
1	0	1	0	0	3	0
0	1	1	0	0	17	1
1	1	1	0	0	7	0
0	0	0	1	0	5	8
1	0	0	1	0	2	1
0	1	0	1	0	1	0
1	1	0	1	0	1	0
0	0	1	1	0	2	2
1	0	1	1	0	3	0
0	1	1	1	0	1	0
1	1	1	1	0	4	0
0	0	0	0	1	3	24
1	0	0	0	1	0	0
0	1	0	0	1	2	0
1	1	0	0	1	4	0
0	0	1	0	1	3	0
1	0	1	0	1	2	0
0	1	1	0	1	19	0
1	1	1	0	1	36	0
0	0	0	1	1	0	1
1	0	0	1	1	0	0
0	1	0	1	1	1	0
1	1	0	1	1	1	0
0	0	1	1	1	3	1
1	0	1	1	1	29	0
0	1	1	1	1	46	0
1	1	1	1	1	191	0
TOTAL					646	825

¹ « 0 » : Résultat négatif ; ² « 1 » : Résultat positif

Les sensibilités et les spécificités des cinq tests estimées en Polynésie Française à l'aide d'un modèle classe latente par une approche bayésienne sont présentées dans le [Tableau 13](#). La prévalence dans l'échantillon était estimée à 0,210 [0,136; 0,293]_{ICr 95%}. Le C-ELISA₂ était le test le plus sensible (Se C-ELISA₂ = 0,954 [0,889; 0,992]_{ICr 95%}) et le C-ELISA₁ était le test le plus spécifique (Sp C-ELISA₁ = 0,856 [0,806; 0,915]_{ICr 95%}).

Tableau 13 : Résultats d'estimation des sensibilités et spécificités des tests étudiés en Polynésie française par une approche bayésienne

(Analyse « Résultats douteux exclus »)

Paramètre		Valeur moyenne [ICr 95%]
EAT	Se ¹	0,712 [0,489 ; 0,921]
	Sp ²	0,853 [0,812 ; 0,898]
FPA	Se	0,751 [0,554 ; 0,939]
	Sp	0,819 [0,779 ; 0,858]
I-ELISA	Se	0,850 [0,708 ; 0,978]
	Sp	0,824 [0,787 ; 0,862]
C-ELISA₁	Se	0,644 [0,356 ; 0,973]
	Sp	0,856 [0,806 ; 0,915]
C-ELISA₂	Se	0,954 [0,889 ; 0,992]
	Sp	0,849 [0,817 ; 0,879]
Prévalence		0,210 [0,136 ; 0,293]
DIC		134

¹ Intervalle de crédibilité à 95% ; ² Se = Sensibilité ; ³ Sp = Spécificité

Les résultats des estimations effectuées en incluant les résultats douteux (en FPA et/ou en I-ELISA) sont présentés dans l'[Annexe 14](#). De même que précédemment, ces résultats n'étaient pas significativement différents de ceux obtenus en excluant les résultats douteux ($p > 0,05$).

Les DIC des analyses « Résultats douteux exclus », « Résultats douteux considérés comme négatifs » et « Résultats douteux considérés comme positifs » étaient proches (134, 135 et 134 respectivement). Le DIC de l'analyse « Résultats douteux interprétés selon le contexte » était en revanche nettement inférieur (DIC = 76).

4.3 Bilan : comparaison des caractéristiques des tests dans les deux zones géographiques étudiées

Les résultats obtenus en France métropolitaine et en Polynésie Française sont récapitulés, respectivement, dans la [Figure 12](#) et la [Figure 13](#).

Figure 12 : Sensibilités et spécificités des cinq tests étudiés en France métropolitaine

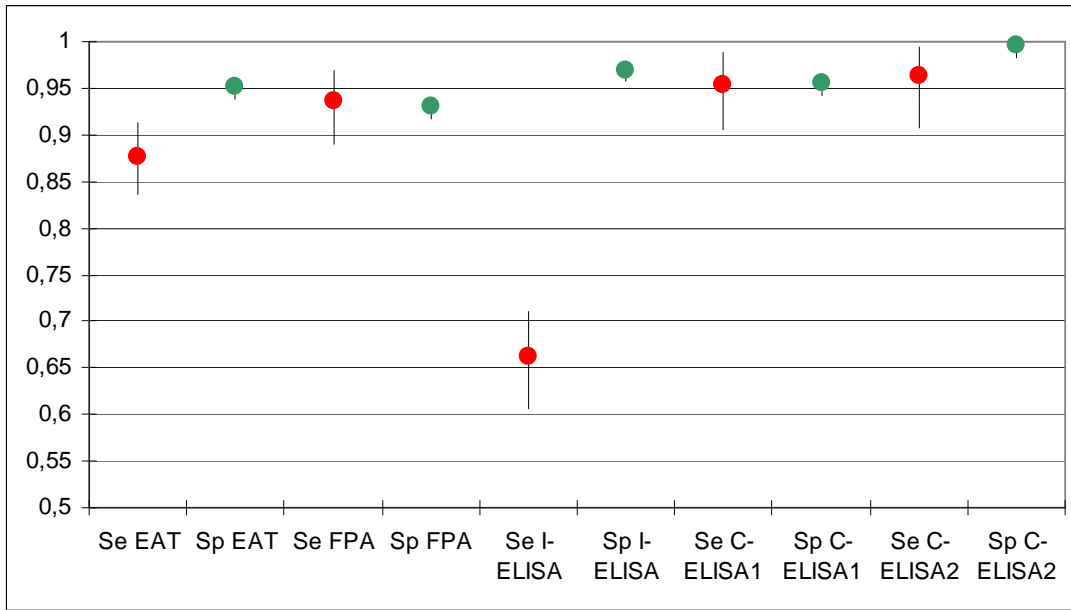
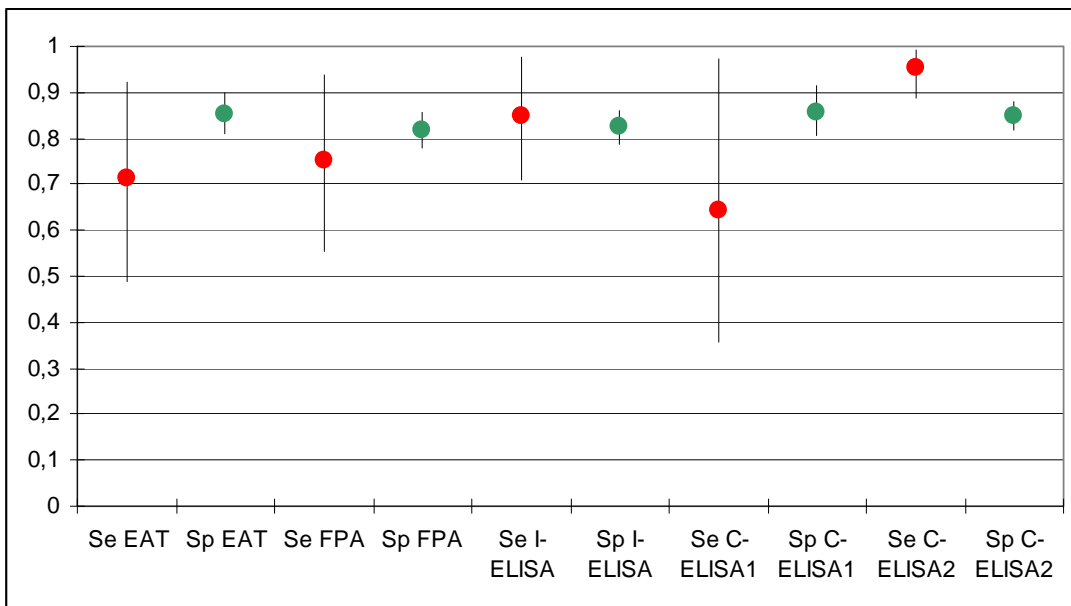


Figure 13 : Sensibilités et spécificités des cinq tests étudiés en Polynésie française



La comparaison des caractéristiques des tests dans les deux populations montre que les estimations des sensibilités moyennes des tests sont assez proches pour le C-ELISA₂. Les intervalles de crédibilité calculés pour les sensibilités des autres tests se recoupent largement, sauf dans le cas de l'I-ELISA qui est plus sensible dans la population polynésienne que dans la population métropolitaine.

Les spécificités des cinq tests varient en revanche de manière significative d'une population à l'autre : les cinq tests sont plus spécifiques dans la population métropolitaine que dans la population polynésienne.

5 Discussion

Les objectifs de cette étude étaient d'estimer les caractéristiques de cinq tests de dépistage de la brucellose porcine en France métropolitaine d'une part et en Polynésie Française d'autre part, en vue d'une utilisation à l'échelle nationale. Aucune référence n'était disponible concernant le statut infectieux individuel des animaux mais le contexte épidémiologique d'origine des porcs testés était connu.

Le modèle choisi était un modèle à classe latente autorisant la dépendance conditionnelle entre les tests. En effet, les cinq tests étudiés étaient fondés sur le même principe biologique (c'est-à-dire la détection d'anticorps anti-LPS-S ; Nielsen, 2002), ce qui induisait une dépendance conditionnelle entre eux (Gardner *et al.*, 2000). Lorsqu'elle existe, cette relation de dépendance conditionnelle entre les tests étudiés doit impérativement être prise en compte : dans le cas contraire, les erreurs de classification biaisent les estimations de sensibilité et de spécificité (Vacek, 1985). Les résultats de covariance de la sensibilité et de la spécificité des tests confirmaient pour la plupart des paires de tests l'hypothèse de dépendance, avec des valeurs de covariances faibles. Afin de limiter le risque d'une dépendance additionnelle (liée à l'observateur ou à l'animal), les tests ont été effectués à l'aveugle et chaque animal n'a été introduit qu'une seule fois dans l'étude. Il est par ailleurs probable qu'il existe une dépendance entre animaux provenant d'un même cheptel (effet « cluster », Donald *et al.*, 1994). Les effets de cette dépendance n'ont pas pu être pris en compte car les informations concernant la provenance des animaux (numéro du cheptel d'origine) n'étaient pas disponibles pour tous les animaux. Etant donné le grand nombre d'animaux constituant les échantillons, il est toutefois probable que l'influence de cet effet « cluster » sur les estimations ne soit pas très forte.

Les sensibilités et spécificités présentées dans le paragraphe 4 ont été estimées à l'aide d'un modèle adapté à l'étude de cinq tests dans une population.

Dans une première approche, il avait été choisi d'étudier séparément les deux types de sous-populations (« Présumée indemne » vs. « Présumée infectée ») composant chaque population, en utilisant un modèle adapté à l'étude de cinq tests dans deux sous-populations. Cette démarche est

couramment utilisée pour estimer les paramètres d'un modèle non identifiable lorsque l'on dispose de deux populations dans lesquelles la prévalence de la maladie est supposée significativement différente, dans le but d'augmenter le nombre de degrés de liberté autorisé par les données.

Notons toutefois que dans la sous-population « présumée indemne », la prévalence de la maladie tendait probablement vers 0, surtout en France métropolitaine, où le contexte sanitaire et le mode d'élevage des animaux reproducteurs provenant de centres de reproduction animale sont très étroitement contrôlés. Or, lorsque la prévalence dans l'une des deux sous-populations étudiées tend vers une limite (0 ou 1), les estimations fournies par le modèle risquent d'être biaisées (Nielsen et Toft, 2002). Cette approche par un modèle « cinq tests, deux sous-populations » n'a donc pas été présentée dans les résultats finaux de l'étude.

Le nombre de paramètres à estimer était supérieur au nombre de degrés de liberté autorisé par les données. Une approche bayésienne a donc été choisie. Les lois de distribution des hypothèses *a priori* ont été déterminées à l'aide de données disponibles dans la littérature et de l'avis d'experts. Etant donné le faible nombre d'études portant sur les tests de dépistage de la brucellose porcine, les distributions ont été rendues plus diffuses sur la base de résultats d'études conduites chez d'autres espèces animales. Il est par conséquent probable que les hypothèses *a priori* ne soient pas parfaitement adaptées aux données. Dans le cas présent, l'effet de ces priors est toutefois atténué par la grande taille des échantillons.

Le premier objectif était de choisir, parmi les tests étudiés, un test utilisable pour le dépistage individuel des porcs reproducteurs. Ce test devait être suffisamment sensible pour repérer rapidement la présence de *Brucella suis* chez les animaux reproducteurs avant que l'infection ne se répande dans les élevages porcins, mais également suffisamment spécifique pour limiter la survenue de résultats faussement positifs, dans un contexte épidémiologique indemne (en métropole). Ce test a pour vocation d'être utilisé au plan national. La population porcine étudiée en France métropolitaine était représentative de la population porcine européenne par ses origines génétiques (à l'exception des exploitations spécialisées dans l'élevage de races locales) (San Cristobal *et al.*, 2006). Leurs conditions d'élevage étaient similaires à celles des porcs élevés dans l'Union Européenne. De ce fait, les résultats obtenus dans la population métropolitaine sont probablement extrapolables à la population de porcs européens.

Les estimations de sensibilité et de spécificité des tests montrent que le C-ELISA₂ est le test le plus sensible, en France métropolitaine comme en Polynésie Française. Il est également le test le plus spécifique dans la population de porcs métropolitains. Il présente l'avantage de fournir des résultats binaires (positif ou négatif) et d'être facilement automatisable et standardisable.

Les valeurs de sensibilité et de spécificité des tests estimées dans l'étude menée en France métropolitaine concordent globalement avec les résultats publiés dans la littérature (Silva Paulo *et al.*, 2000 ; Nielsen *et al.*, 2008 ; Muma *et al.*, 2009). Ces enquêtes ont été conduites dans des populations très différentes (taille des échantillons, origine géographique, race et mode d'élevage des porcs testés). Les modalités de réalisation et d'interprétation des tests (laboratoires dans lesquels les analyses étaient effectuées, kits commerciaux utilisés, seuils de positivité et règles d'interprétation appliquées pour les résultats douteux) étaient variables, tout comme l'approche épidémiologique et statistique adoptée (estimation brute des caractéristiques des tests par rapport à une référence ou modélisation).

L'une des questions posées au cours de l'analyse des données concernait les modalités d'interprétation des résultats douteux aux tests FPA et I-ELISA. Nous avons estimé les caractéristiques des tests d'abord en excluant les résultats douteux, puis en les incluant, interprétés comme des résultats négatifs, positifs ou selon le contexte épidémiologique de la sous-population d'où provenaient les animaux (résultats douteux considérés comme négatifs dans les sous-populations « présumées indemnes » et comme positifs dans les sous-populations « présumées infectées »). La comparaison des sensibilités et des spécificités estimées n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative entre ces quatre modalités d'interprétation, hormis la spécificité du FPA qui diminuait significativement lorsque les résultats douteux étaient considérés comme positifs ($p < 0,05$). En France métropolitaine, l'adaptation des modèles aux données était similaire pour ces quatre analyses. Cela peut s'expliquer par le faible nombre de résultats douteux au regard de la taille de l'échantillon. En Polynésie Française en revanche, l'adaptation du modèle s'est avérée nettement meilleure lorsque les résultats douteux étaient interprétés selon le contexte épidémiologique. La taille de l'échantillon étant un peu plus restreinte, il est probable que l'influence du mode d'interprétation des résultats douteux ait été plus forte.

La majorité des individus « douteux » de Polynésie Française provenaient des sous-populations « présumées indemnes » et obtenaient un résultat douteux en FPA et des résultats négatifs aux quatre autres tests. Cette observation signe une bonne connaissance des élevages par les services vétérinaires locaux, puisque la sélection de la sous-population « présumée indemne » était effectuée selon leur expertise. Dans la sous-population « présumée infectée » métropolitaine au contraire, la plupart des individus « douteux » obtenaient un résultat douteux en I-ELISA et des résultats positifs aux quatre autres tests. Il est donc fortement probable que les résultats douteux en FPA soient assimilables à des résultats négatifs en situation de faible prévalence et que les résultats douteux en I-ELISA soient assimilables à des résultats positifs en situation de haute prévalence.

Un cinquième type d'analyse a été exploré en interprétant les résultats douteux en FPA et en I-ELISA au regard des résultats obtenus aux trois autres tests. Pour les animaux présentant des résultats

positifs à au moins deux autres tests, les résultats douteux en FPA et en I-ELISA ont été considérés comme positifs. L'application d'une telle règle décisionnelle sur le terrain nécessiterait de réaliser au moins quatre tests sur chaque animal, ce qui est économiquement et techniquement irréalisable. Pour cette raison, les résultats de cette approche ne sont pas présentés dans ce manuscrit.

Une dernière possibilité de gestion des résultats douteux serait de les « supprimer » en utilisant des seuils de positivité variables en fonction du contexte épidémiologique dans lequel est réalisé le test :

- un seuil bas permettant de privilégier la sensibilité en contexte infecté, avec un objectif d'éradication rapide des animaux atteints ;
- un seuil élevé en contexte indemne (contrôles en centre de reproducteurs) afin de limiter le risque de survenue de résultats faussement positifs.

Le second objectif était de comparer les caractéristiques des tests dans deux zones géographiques dans lesquelles le contexte épidémiologique de la brucellose porcine était très différent.

Les sensibilités des tests étudiés en Polynésie Française ne sont pas significativement différentes des sensibilités estimées en France métropolitaine, sauf dans le cas de l'I-ELISA dont la sensibilité a paru plus élevée en métropole qu'en Polynésie ($p < 0,05$). En revanche, les spécificités des cinq tests varient de manière significative d'une population à l'autre et sont notablement plus élevées en métropole qu'en Polynésie. Les variations des caractéristiques de certains tests d'une population à l'autre peuvent très probablement être expliquées par les différences majeures existant entre les populations. Greiner et Gardner (2000) ont montré qu'un grand nombre de facteurs biologiques peuvent faire varier la sensibilité et la spécificité d'un test.


Tout d'abord, la brucellose porcine sévit sur un mode enzootique en Polynésie Française, alors qu'elle est absente de la plupart des élevages métropolitains et y sévit de manière sporadique. Dans les élevages métropolitains, la brucellose porcine induit des signes cliniques aisément repérables alors que la maladie circule à bas bruit dans les élevages polynésiens et s'y manifeste souvent par une simple baisse de fertilité des animaux. Les foyers de brucellose porcine sont donc plus facilement et plus rapidement mis en évidence en métropole qu'en Polynésie. Par ailleurs, comme mentionné précédemment, le biovar 2 de *Brucella suis* est le plus fréquemment incriminé en France métropolitaine, tandis que le biovar 1 de la bactérie est le plus souvent isolé dans les foyers polynésiens. A notre connaissance, aucune étude n'a prouvé de différence de comportement des tests sérologiques dans la détection de chacun de ces deux biovars mais cette hypothèse ne doit pas être exclue.

Ensuite, les caractéristiques génétiques des porcs étaient très homogènes dans l'échantillon métropolitain (races Large White, Landrace et Piétrain majoritairement) tandis que la plupart des

porcs polynésiens étaient des hybrides ou appartenait à des races locales. Lagrange *et al.* (1979) ont montré que les réactions immunitaires spécifique et non spécifique étaient en partie déterminées génétiquement. Ainsi, des porcs provenant d'origines différentes sont susceptibles de réagir différemment à un même test sérologique.

Enfin, les conditions d'élevage des porcs métropolitains et polynésiens étaient elles aussi différentes. En métropole, les porcs de la sous-population « présumée infectée » provenaient d'élevages de plein air du grand Ouest et les porcs de la sous-population « présumée indemne » de centres de reproducteurs ou d'élevages industriels. Ces animaux subissent des contrôles stricts à leur entrée dans les centres de reproducteurs et n'ont de contact avec aucun animal extérieur, qu'il soit domestique ou sauvage. Leur environnement est moins riche en agents pathogènes divers responsables de réactions croisées. Au contraire, la population porcine étudiée en Polynésie Française était hétérogène (races hybrides), élevée dans des élevages familiaux ou semi-industriels, dans des conditions de maîtrise des risques sanitaires beaucoup moins sévères. Il est probable que ces différences de conditions d'élevage puissent expliquer que la spécificité des cinq tests soit nettement supérieure en métropole qu'en Polynésie.

Certains agents opportunistes tels que *Yersinia enterocolitica* O:9 sont fréquemment portés à l'état latent dans l'espèce porcine et engendrent des réactions croisées du fait de communautés antigéniques (notamment au niveau du S-LPS) avec *Brucella suis*. Jungersen *et al.* (2006) ont toutefois montré que la positivité aux tests sérologiques suite à une infection par *Y. enterocolitica* O:9 est limitée dans le temps (2 à 9 semaines), tandis que les animaux brucelliques fournissent une réponse positive durable, ce qui permet généralement de différencier les réactions spécifiques des réactions croisées.

 **En conclusion, le test C-ELISA₂ apparaît comme le mieux adapté au dépistage individuel de la brucellose porcine** dans les centres de reproducteurs **métropolitains**, comme dans les élevages **polynésiens**. Il s'agit du test le plus sensible et le plus spécifique parmi les 5 tests étudiés, ce qui suggère la possibilité de l'employer dans les zones à faible prévalence comme dans les zones à forte prévalence. Il présente également des avantages techniques et économiques. L'usage de ce test pourrait donc être recommandé en première intention, en France métropolitaine comme en Polynésie Française, dans le cadre du dépistage systématique chez les reproducteurs ou dans un contexte de suspicion (suite à l'observation de signes cliniques).

**CHAPITRE III : ETUDE DES CARACTERISTIQUES D'UN
TEST DE DEPISTAGE INDIVIDUEL EN L'ABSENCE DE
REFERENCE ET ELABORATION D'UN SCHEMA
DECISIONNEL INCLUANT CE TEST POUR LA
CERTIFICATION A L'EXPORT : APPLICATION AU
DEPISTAGE DE L'EPIDIDYMITE CONTAGIEUSE DU BELIER**

1 Introduction et contexte

1.1 Agent pathogène responsable de l'épididymite du bélier et physio-pathogénie de l'infection

L'épididymite contagieuse du bélier est exclusivement causée par un coccobacille gram négatif, *Brucella ovis*, dont le pouvoir pathogène est limité aux seuls ovins. Il n'existe qu'un seul biovar de *B. ovis*, dont l'affinité est significativement plus grande pour le tractus génital mâle que pour le tractus génital femelle.

La principale source de contamination est constituée par les béliers infectés, qui peuvent excréter *B. ovis* de manière inapparente dans leurs urines et surtout dans leur sperme durant plus de quatre ans (Ganière *et al.*, 2011). L'infection se transmet majoritairement par voie vénérienne (accouplement de plusieurs mâles avec la même brebis au cours d'un cycle œstral ou contamination homosexuelle entre jeunes béliers).

Chez le bélier, la période d'incubation est assez longue (6 à 18 semaines). Après une multiplication locorégionale, *B. ovis* diffuse à l'ensemble de l'organisme puis se localise dans l'appareil génital. Chez la brebis, *B. ovis* disparaît du site d'entrée en deux cycles œstraux (Grillo *et al.*, 1999) mais cette période peut s'étendre à trois mois (Muhammed *et al.*, 1975). On observe ensuite une bactériémie prolongée, puis une réapparition de *B. ovis* dans le tractus génital environ 3 mois plus tard. Après avortement ou parturition, une brebis infectée excrète *B. ovis* durant une dizaine de jours. Certains auteurs font état d'un portage chronique chez la brebis (Afzal et Kimberling, 1986 ; Marco *et al.* 1994) mais cette hypothèse est controversée.

La contamination des troupeaux indemnes se fait le plus souvent par introduction de reproducteurs infectés (achat ou prêt de béliers, transhumance). L'infection engendre, dans les élevages atteints, des pertes économiques dues à une diminution importante de la fertilité des animaux.

Chez les brebis, on observe une augmentation du nombre de cycles improductifs. La proportion d'avortements et de mortalités périnatales varie de 0 à 8% selon les études d'infection expérimentale. Par ailleurs, les agneaux conçus après deux ou trois cycles improductifs ont un poids

plus faible au sevrage, ce qui correspond à une perte d'environ 10 à 20 US\$¹ pour chaque cycle improductif (Kimberling *et al.*, 2010).

Chez les béliers, l'impact de l'infection sur la fertilité à l'échelle individuelle dépend de l'étendue des lésions : lorsqu'un seul testicule est atteint, le taux de fécondation peut passer sous le seuil des 70%, contre 90% pour un bélier en bonne santé (Kimberling *et al.*, 2010). Des conséquences sur la natalité sont observables à l'échelle du troupeau lorsque 10% des béliers de l'effectif sont infectés (Ganière *et al.*, 2011).

L'infection engendre également des pertes indirectes : raccourcissement de la carrière des reproducteurs, diminution de la valeur économique des béliers à la vente et augmentation du nombre de béliers nécessaires dans le troupeau (Paolicchi *et al.*, 1992).

1.2 Contexte épidémiologique et réglementation française

Les premiers cas d'épididymite contagieuse ont été rapportés en 1953, en Australie et en Nouvelle-Zélande (OIE, 2011a). L'épididymite contagieuse est aujourd'hui répandue dans de nombreux pays (Australie, Nouvelle-Zélande, USA, Afrique du Sud, Russie, Europe de l'Est) (OIE, 2011a).

En France, le nombre de foyers d'épididymite contagieuse du bélier a augmenté depuis l'arrêt de la vaccination contre la brucellose à *B. melitensis* à l'aide du vaccin Rev.1 en 2008 (Garin-Bastuji, 2010, LNR Brucellose, *communication personnelle*). L'infection par *B. ovis* évolue sur un mode enzootique dans certains départements du Sud de la France (Services Vétérinaires et GDS² locaux, 2010, *communication personnelle*).

En France, l'épididymite contagieuse du bélier n'est pas une Maladie Réputée Contagieuse (MARC), mais une Maladie à Déclaration Obligatoire (MADO)³, ce qui signifie que le propriétaire des animaux atteints ne peut être contraint à aucune mesure particulière, hormis la déclaration de l'infection aux autorités sanitaires.

A l'heure actuelle, l'épididymite contagieuse du bélier ne fait l'objet d'aucun protocole de dépistage systématique dans les cheptels français ou européens. Aucun programme d'éradication n'est par ailleurs envisagé.

¹ Soit 8 à 16 euros (Au 01/06/12, 1 € = 1,24 US \$)

² Groupement de défense sanitaire

³ Remarque : En 2012, les notions de MARC et de MADO vont disparaître et seront remplacées par la notion de « Maladies réglementées » appartenant à trois catégories hiérarchisées selon leur gravité. La liste des maladies appartenant à chacune de ces catégories n'est pas connue au moment de la rédaction de ce manuscrit.

Toutefois, afin d'éviter la contamination de nouveaux troupeaux dans les zones géographiques indemnes de la maladie, certaines catégories d'animaux sont soumises à un dépistage systématique :

- les béliers destinés aux échanges intracommunautaires dans l'Union européenne ou à l'exportation vers des pays tiers¹;
- les animaux des coopératives de reproduction (monte publique, insémination artificielle, transfert d'embryons).

Pour le dépistage de l'infection chez ces deux catégories d'animaux, le test de référence est la fixation du complément (FC). Le diagnostic de certitude requiert, quant-à-lui, une recherche directe de *B. ovis* par culture sur prélèvement de sperme pour les animaux destinés à la reproduction.

1.3 Modalités de diagnostic de l'épididymite contagieuse du bélier

Chez le mâle, l'infection peut être mise en évidence cliniquement par palpation des testicules. Les lésions résultent d'une inflammation localisée à la queue de l'épididyme, qui évolue le plus souvent en deux phases : une phase aiguë (altération du sperme, baisse de la fertilité, rarement inflammation et œdème du testicule, atteinte transitoire de l'état général) et une phase chronique (induration circonscrite et nodulaire de la queue de l'épididyme, le plus souvent unilatérale). Lorsque la maladie évolue depuis assez longtemps, on observe une déformation de l'épididyme, voire du testicule et une baisse de la fertilité pouvant aller jusqu'à la stérilité en cas d'atteinte bilatérale. Les lésions observées sont très peu spécifiques et de nombreuses autres affections doivent être incluses dans le diagnostic différentiel : brucellose ovine ou mélitococcie (*B. melitensis*), infections à *Actinobacillus seminis*, *Actinobacillus actinomycetens-comitans*, *Corynebacterium*, *Pasteurella*, *Staphylococcus*, etc. De plus, plus de 50% des béliers atteints ne présentent aucune lésion détectable à la palpation (Blasco, 1990).

Chez la brebis, l'infection est le plus souvent inapparente. Lorsque qu'elle s'exprime, sous la forme d'une cervicovaginite transitoire, d'endométrite ou de salpingite, elle entraîne une baisse de la fertilité ou, exceptionnellement, des avortements ou une mortinatalité.

1.3.1 Mise en évidence de l'agent pathogène au laboratoire


Il est également possible d'effectuer une recherche directe de *B. ovis* sur du sperme ou des sécrétions vaginales après coloration différentielle et mise en culture, mais les béliers infectés

¹ Directive Européenne 91/68/EEC du 28 janvier 1991

excrètent la bactérie de manière intermittente, ce qui peut engendrer des erreurs de détection par défaut (Worthington *et al.*, 1985).

1.3.2 Diagnostic sérologique

Trois tests sérologiques sont utilisables pour le dépistage de l'épididymite contagieuse du bélier : le test de fixation du complément (FC) ; l'immunodiffusion en gel ou AGID (Agar Gel Immunodiffusion) et l'ELISA indirect (I-ELISA). Chez le bélier, les anticorps sont détectables 3 à 6 semaines après l'infection, mais la réponse peut devenir négative au stade d'infection chronique. Chez la brebis, le test n'est pas utilisé car la réaction sérologique est faible et peu durable.

 **Remarque** : Les tests habituellement utilisés pour le diagnostic de la brucellose animale (EAT par exemple) reposent sur des antigènes de *Brucella* en phase lisse (« smooth ») (antigène = S-LPS). Ils ne peuvent pas être employés pour détecter *B. ovis*, *Brucella* naturellement et invariablement en phase rugueuse (antigène = R-LPS).

Le test recommandé actuellement par l'OIE (Organisation Mondiale de la Santé Animale) et l'Union Européenne pour le dépistage de l'épididymite contagieuse chez les béliers destinés aux échanges internationaux et intra-communautaires est le test de fixation du complément (FC) (OIE, 2011a et b). Sa sensibilité et sa spécificité sont bonnes (*cf.* paragraphe 3.4.1) mais il présente certains inconvénients techniques : incompatibilité avec un sérum hémolysé ou à activité anti-complémentaire et phénomène de zone¹ (Searson, 1982 ; Worthington *et al.*, 1985 ; Marin *et al.*, 1989). Par ailleurs, sa réalisation technique représente une charge de travail importante pour les techniciens et nécessite une bonne technicité (Gall *et al.*, 2003).

Les autres tests, et en particulier les I-ELISA disponibles dans le commerce, n'ont pas encore été complètement évalués dans leurs conditions d'utilisation sur le terrain. D'après les études déjà effectuées, les I-ELISA semblent plus sensibles que la FC (Estein, 1999 ; OIE, 2011b) et présentent des avantages techniques (Gall *et al.*, 2003), mais ces études ont été réalisées dans des contextes épidémiologiques (zones géographiques, races et modes d'élevage des animaux, évolution de la maladie au sein de la population) extrêmement variables, avec des kits et des seuils de positivité variables (Spencer et Burgess, 1984 ; Nunez-Torrez *et al.*, 1997 ; Estein, 1999 ; Gall *et al.*, 2003 ;

¹ Phénomène de zone : absence de réaction d'un sérum avec l'antigène lorsque le sérum renferme un très haut titre en anticorps spécifiques

Alvarez *et al.*, 2007). De plus, la plupart de ces études évaluent la sensibilité et la spécificité des nouveaux tests par rapport à celles de la FC, bien que ce test ne soit pas parfait.

2 Objectifs de l'étude

Le dépistage de l'épididymite contagieuse n'est réalisé de manière systématique que chez les béliers destinés au commerce international ou à la reproduction. Le test officiellement recommandé par l'OIE et l'Union Européenne (la FC) présente des inconvénients techniques. De nouveaux tests (I-ELISA) sont disponibles mais leurs caractéristiques n'ont pas encore été évaluées dans les conditions d'utilisation du test sur le terrain.



Les objectifs de cette étude étaient les suivants :

- **évaluer les caractéristiques** (sensibilité et spécificité) **d'un kit I-ELISA** et les **comparer à celles du test officiellement recommandé** pour le dépistage de l'épididymite contagieuse du bélier (FC) ;
- **évaluer la possibilité de remplacer la FC par l'I-ELISA** étudié pour dépister l'infection par *B. ovis* chez les béliers destinés au commerce international ou intracommunautaire ;
- **proposer un arbre décisionnel utilisant l'un et/ou l'autre des deux tests étudiés** pour dépister l'infection par *B. ovis* chez les béliers destinés au commerce international ou intracommunautaire.

Cette étude a fait l'objet d'un **article publié** dans une revue internationale à comité de lecture :

PRAUD A., CHAMPION J.L., CORDE Y., DRAPEAU A., MEYER L., GARIN-BASTUJI B., 2012. Assessment of diagnostic sensitivity and specificity of an indirect ELISA kit for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *BMC Veterinary Research*, **8**: 68. (cf. [Annexe 2](#))

3 Matériels et méthodes

3.1 Source des données et échantillon

L'étude a porté sur 4599 béliers élevés dans le Sud de la France, dans des régions où l'épididymite contagieuse du bélier sévit sur un mode enzootique. 3063 béliers provenaient des

Pyrénées Atlantiques (sous-population 1, prévalence d'environ 22% selon des études préliminaires effectuées en 2006 services vétérinaires locaux), 1340 de la région Provence-Alpes-Côte d'Azur (sous-population 2, maladie évoluant sur un mode enzootique mais prévalence inconnue) et 196 étaient de jeunes béliers âgés de 12 à 14 mois et provenant d'une coopérative où *B. ovis* avait été isolée chez plusieurs animaux dans les mois précédents (sous-population 3).

Une autre population, comprenant 3792 béliers détenus dans des centres d'insémination animale reconnus officiellement indemnes d'épididymite contagieuse, dont les caractéristiques épidémiologiques (sexe, âge, statut sanitaire, conditions d'élevage et provenance) différaient de la population de béliers destinés à l'export habituellement testés dans les élevages, a été utilisée pour la construction des distributions *a priori*. Les raisons de ce choix sont discutées dans le paragraphe 5.

3.2 Tests étudiés

Le test de fixation du complément (FC), recommandé par l'OIE et l'Union Européenne et un nouveau test I-ELISA à évaluer (Chekit *B. ovis*, Idexx, France) ont été réalisés en parallèle sur chacun des 4599 sérums de béliers provenant de zones d'enzootie, ainsi que sur les 3792 sérums de béliers indemnes. Les prélèvements de sang ont été effectués dans le cadre d'opérations de dépistage de routine d'autres maladies.

Les antigènes utilisés ont été préparés selon les recommandations de l'OIE (OIE, 2011a). L'antigène utilisé pour la FC a été standardisé à l'aide du Sérum Standard International anti-*Brucella ovis* (IsaBoS ; AHVLA, Royaume-Uni) et le test a été réalisé conformément aux recommandations de l'Union Européenne et de l'OIE, avec un seuil de positivité de 50 ICFTU/mL¹ (OIE, 2011a).

Les seuils de détection prévus par le fabricant de l'I-ELISA étudié comprenaient trois intervalles : le résultat était négatif lorsque le pourcentage de densité optique (% D.O.)² de l'échantillon était inférieur à 10%, douteux lorsqu'il était compris entre 10 et 50% et positif lorsqu'il était supérieur à 50%.

Les analyses sérologiques ont été effectuées au LNR Brucellose, par deux techniciens expérimentés. Les tests ont été réalisés « en aveugle » : les techniciens n'avaient connaissance ni de la provenance des béliers testés, ni de leur statut présumé vis-à-vis de l'infection, ni des résultats qu'ils avaient obtenus à l'autre test.

¹ ICFTU : International complement fixation test units ; Directive européenne 91/68/EEC

² Les % de densité optique (D.O.) sont obtenus selon la formule normalisée suivante :

% D.O. = (D.O.Echantillon – D.O.Témoin Négatif) / (D.O.Témoin positif – D.O.Témoin Négatif)

3.3 Adaptation des seuils de positivité

Dans un premier temps, les caractéristiques du test I-ELISA ont été estimées en utilisant les seuils d'interprétation (ou « cut-offs ») recommandés par le fabricant (*cf.* paragraphe 3.2).

Dans un second temps, afin de faciliter l'interprétation des résultats, nous avons choisi d'adapter les seuils de l'I-ELISA dans le but d'éliminer les résultats douteux sans détériorer la concordance entre les résultats du test officiel (FC) et de l'I-ELISA étudié. Les résultats de cette étude préliminaire sont détaillés dans le paragraphe 4.1.

3.4 Modélisation et approche statistique

3.4.1 Estimation des caractéristiques des deux tests étudiés

La sensibilité et la spécificité de chaque test ont été estimées par le biais d'une approche bayésienne implémentée par des algorithmes MCMC (Markov Chain Monte Carlo) utilisant l'échantillonneur de Gibbs. Les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel WinBUGS (Lunn *et al.*, 2000), sur 51 000 itérations (dont une phase de « burn-in » de 1000 itérations). Les résultats sont exprimés par une valeur moyenne affectée d'un intervalle de crédibilité à 95% (25^{ème} et 95^{ème} percentiles ; ICr 95%).

Une analyse de sensibilité a également été réalisée en utilisant des distributions *a priori* de plus en plus diffuses afin de vérifier que l'estimation des paramètres d'intérêt n'était influencée que de manière mineure par ces variations.



Remarque : Les méthodes utilisées sont identiques à celles présentées dans le chapitre II et ne seront par conséquent pas détaillées dans la suite du texte.

Le modèle choisi pour l'estimation des caractéristiques des tests de dépistage de l'épididymite contagieuse du bélier a été utilisé à plusieurs reprises dans la littérature (Gardner *et al.*, 2000 ; Dendukuri *et al.*, 2001 ; Georgiadis *et al.*, 2003 ; Branscum *et al.*, 2005). Il permet notamment d'estimer la force de la relation de dépendance entre les tests de dépistage grâce à l'évaluation de la covariance des résultats positifs (γ_{Se}) d'une part et négatifs (γ_{Sp}) d'autre part. En effet, les deux tests étudiés sont basés sur le même processus biologique : ils utilisent la même préparation d'antigène

HS (« Hot Saline ») et détectent principalement les anticorps anti-*Brucella*-R-LPS. Ils peuvent par conséquent être considérés comme conditionnellement dépendants (Enøe *et al.*, 2000).

Dans une population donnée, on définit les résultats des animaux soumis aux deux tests de la façon suivante :

y_{11} : nombre d'animaux fournissant un résultat positif au test 1 (T_1) et au test 2 (T_2) ;

y_{10} : nombre d'animaux fournissant un résultat positif à T_1 et un résultat négatif à T_2 ;

y_{01} : nombre d'animaux fournissant un résultat négatif à T_1 et un résultat positif à T_2 ;

y_{00} : nombre d'animaux fournissant un résultat négatif à T_1 et à T_2 .

Les données sont exprimées sous la forme du vecteur $y = (y_{11}, y_{10}, y_{01}, y_{00})$.

Soient pr_{11} , pr_{10} , pr_{01} , pr_{00} les probabilités respectives de survenue des événements y_{11} , y_{10} , y_{01} , y_{00} . Le vecteur y suit une loi multinomiale : $y \sim dmultinomiale (pr_{11}, pr_{10}, pr_{01}, pr_{00})$.

Les probabilités de survenue (pr_{11} , pr_{10} , pr_{01} , pr_{00}) des combinaisons de résultats (y_{11} , y_{10} , y_{01} , y_{00}) peuvent être exprimées comme suit :

$$pr_{11} = \text{prev} * (Se_1 * Se_2 + \gamma Se) + (1 - \text{prev}) * ((1 - Sp_1) * (1 - Sp_2) + \gamma Sp)$$

$$pr_{10} = \text{prev} * (Se_1 * (1 - Se_2) - \gamma Se) + (1 - \text{prev}) * ((1 - Sp_1) * Sp_2 - \gamma Sp)$$

$$pr_{01} = \text{prev} * ((1 - Se_1) * Se_2 - \gamma Se) + (1 - \text{prev}) * (Sp_1 * (1 - Sp_2) - \gamma Sp)$$

$$pr_{00} = \text{prev} * ((1 - Se_1) * (1 - Se_2) + \gamma Se) + (1 - \text{prev}) * (Sp_1 * Sp_2 + \gamma Sp).$$

Les limites des covariances des sensibilités et des spécificités des tests sont définies de la manière suivante :

$$\text{Max}(-(1 - Se_1) * (1 - Se_2), -Se_1 * Se_2) \leq \gamma Se \leq \text{Min}(Se_1 * (1 - Se_2), Se_2 * (1 - Se_1))$$

$$\text{Max}(-(1 - Sp_1) * (1 - Sp_2), -Sp_1 * Sp_2) \leq \gamma Sp \leq \text{Min}(Sp_1 * (1 - Sp_2), Sp_2 * (1 - Sp_1))$$

Le code utilisé sous WinBUGS figure en [Annexe 15](#).

Etant donné que le nombre de paramètres à estimer était plus élevé que le nombre de degrés de liberté autorisés par les données, des priors informatifs ont été introduits dans le modèle. Les distributions *a priori* des caractéristiques de la FC ont été modélisées en combinant des résultats de la littérature et l'opinion d'experts. Seuls les résultats d'études comparables (par la méthode de laboratoire et la démarche d'analyse utilisées) ont été introduits. Selon ces études, la sensibilité moyenne de la FC était comprise entre 89,3% et 98,7% et sa spécificité moyenne était comprise entre 89,3% et 100%. La sensibilité la plus basse était de 77% et la spécificité la plus basse 78% (Searson,

1982 ; Worthington *et al.*, 1985 ; Cho et Niilo, 1987 ; Kittelberger *et al.*, 1994 ; Vigliocco *et al.*, 1997 ; Ficapal *et al.*, 1998 ; Cerri *et al.*, 2000).

Les informations *a priori* concernant la spécificité du kit I-ELISA étudié provenaient de l'étude préliminaire réalisée sur les sérums de 3792 béliers sélectionnés par tirage au sort dans des centres de reproduction animale officiellement indemnes de brucellose (soumis à des contrôles réguliers et détenus dans des conditions de maîtrise des risques sanitaires). Etant donné le mode d'élevage très particulier de ces animaux (milieu strictement contrôlé, faible contamination de l'environnement par des agents pathogènes responsables de réactions croisées, absence de contact avec d'autres animaux, domestiques ou sauvages), une spécificité artificiellement élevée était attendue. Ces animaux reproducteurs n'étant pas représentatifs de la population étudiée constituée par des béliers provenant d'élevages du Sud de la France, il a été choisi de ne pas les inclure dans l'étude de terrain mais de les utiliser pour construire la distribution *a priori* de la spécificité du kit I-ELISA. Dans cette population indemne, la spécificité de l'I-ELISA, calculée de manière directe, était de 99,74% (3782 résultats négatifs sur 3792 béliers indemnes testés). Une distribution diffuse a été utilisée afin de tenir compte de la surestimation de la spécificité liée au contexte de cette étude.

Aucune information n'était disponible concernant la sensibilité du kit I-ELISA étudié, la prévalence dans la population étudiée, ni les covariances des sensibilités et des spécificités des deux tests. Des distributions Beta(1,1) non informatives ont donc été utilisées pour ces quatre paramètres.

Les paramètres des distributions Beta(*a,b*) informatives introduites dans le modèle sont présentés dans le [Tableau 14](#).

Tableau 14 : Paramètres des distributions beta(*a,b*) utilisées comme priors pour l'estimation des paramètres d'intérêt

Paramètre	Moyenne	Limite inférieure (95%)	Paramètres des distributions beta(<i>a,b</i>) <i>a priori</i>		
			<i>a</i>	<i>b</i>	
FC	Se ¹	0.9	0.8	31.5	3.5
	Sp ²	0.95	0.8	7.07	0.37
I-ELISA	Se	Inconnue	Inconnue	1	1
	Sp	0.98	0.9	11.03	0.23
Prévalence	Inconnue	Inconnue	1	1	
γ Se ³	Inconnue	Inconnue	1	1	
γ Sp ⁴	Inconnue	Inconnue	1	1	

¹Se : Sensibilité ; ²Sp : Spécificité ; ³ γ Se : Covariance des sensibilités ; ⁴ γ Sp : Covariance des spécificités

3.4.2 Etablissement d'une séquence de tests de dépistage de l'épididymite contagieuse du bélier adaptée au contexte épidémiologique et aux contraintes du terrain

Après avoir estimé la sensibilité et la spécificité des deux tests, deux associations de ces tests ont été étudiées. Les caractéristiques de chaque association ont été estimées et leurs possibilités d'utilisation sur le terrain ont été évaluées.

Dans le cas de l'association dite « en série », le résultat global de la séquence était considéré comme positif pour les animaux obtenant un résultat positif à chacun des deux tests. Dans le cas de l'association dite « en parallèle » en revanche, le résultat global était considéré comme positif pour les animaux obtenant un résultat positif à l'un ou l'autre des tests. L'estimation de la sensibilité et de la spécificité des deux séquences a été réalisée en tenant compte de l'existence d'une relation de dépendance conditionnelle entre les deux tests (Gardner *et al.*, 2000) (*cf.* Chapitre I, paragraphe 3.4).

La sensibilité et la spécificité de l'association en série étaient définies comme suit:

$$Se_{SERIE} = Se_{IELISA} * Se_{FC} + \gamma Se$$

$$Sp_{SERIE} = 1 - ((1 - Sp_{IELISA}) * (1 - Sp_{FC})) - \gamma Sp.$$

La sensibilité et la spécificité de l'association en parallèle étaient définies comme suit :

$$Se_{PARALLELE} = 1 - ((1 - Se_{IELISA}) * (1 - Se_{FC})) - \gamma Se$$

$$Sp_{PARALLELE} = Sp_{IELISA} * Sp_{FC} + \gamma Sp.$$

4 Résultats

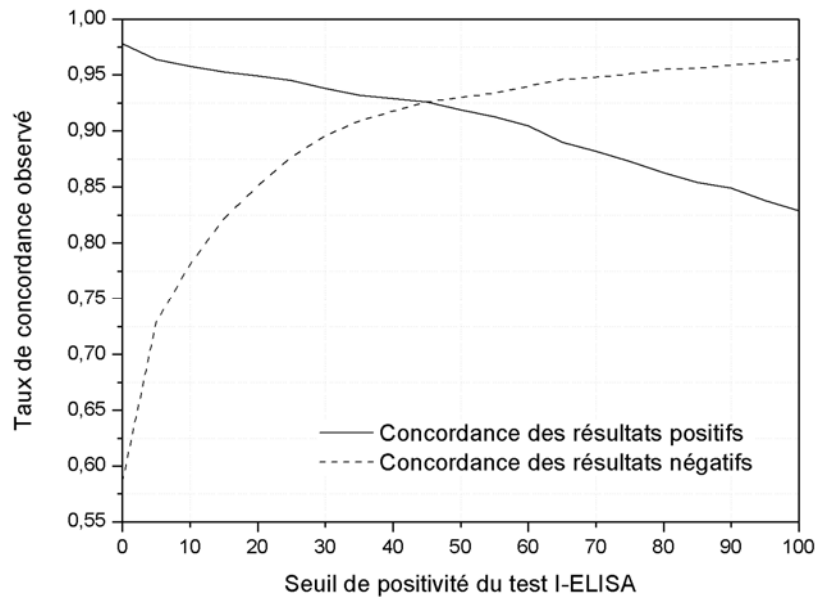
4.1 Adaptation des seuils de positivité de l'I-ELISA

En première approche, les caractéristiques de l'I-ELISA ont été estimées en interprétant les résultats du test selon les seuils de positivité recommandés par le fabricant. La concordance des résultats positifs et négatifs des deux tests (FC et I-ELISA) était de 92,6%. L'objectif poursuivi d'une bonne concordance s'imposait pour rendre acceptable par les autorités sanitaires, le cas échéant, l'adjonction de l'I-ELISA à la liste des tests officiels aux échanges.

Dans un second temps, un seuil de positivité unique a été établi pour l'I-ELISA dans le but d'éliminer les résultats douteux sans diminuer la concordance de ses résultats avec ceux du test officiellement recommandé (FC). Un seuil de 45% D.O. constituait le meilleur compromis pour optimiser à la fois la concordance des résultats positifs et des résultats négatifs de l'I-ELISA avec ceux

de la FC (Figure 14). Avec ce nouveau seuil, les deux tests donnaient encore des résultats concordants pour 4 161 béliers (92,6% des béliers).

Figure 14 : Evolution des concordances des résultats positifs et négatifs aux tests FC et I-ELISA selon le seuil de positivité choisi pour l'I-ELISA (% DO)



4.2 Prévalence dans la population étudiée

En utilisant ce seuil unique permettant d'éliminer les résultats douteux (45% D.O.), la prévalence apparente déterminée à l'aide de l'I-ELISA dans l'échantillon étudié était de 25,6%. La prévalence apparente déterminée à l'aide de la FC était de 21,3%. Les résultats croisés aux deux tests pour les 4 599 béliers sont présentés dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Résultats croisés aux deux tests chez 4 599 béliers du Sud de la France

Résultat		Nombre de béliers	%
FC	I-ELISA		
Négatif	Négatif	3 335	72,8
Négatif	Positif	270	5,9
Positif	Négatif	72	1,6
Positif	Positif	902	19,7
TOTAL		4 599	100

Les résultats de la modélisation ont permis d'estimer que la prévalence réelle de l'infection était de 0,238 [0,187; 0,284]_{ICr95%}.

4.3 Estimation de la sensibilité et de la spécificité des deux tests

Les résultats obtenus en conservant les seuils de positivité et de négativité recommandés par le fabricant de l'I-ELISA figurent en [Annexe 16](#).

En utilisant le nouveau seuil permettant la suppression des résultats « douteux » en I-ELISA, la valeur moyenne de sensibilité de l'I-ELISA était plus élevée que celle de la FC mais les intervalles de crédibilité à 95% (ICr 95%) se recoupaient largement ($Se_{I-ELISA} = 0,917 [0,822; 0,992]_{ICr95\%}$; $Se_{CFT} = 0,860 [0,740; 0,967]_{ICr95\%}$). La valeur moyenne de spécificité de la FC était légèrement supérieure à celle de l'I-ELISA ($Sp_{CFT} = 0,988 [0,947; 1,0]_{ICr95\%}$; $Sp_{I-ELISA} = 0,952 [0,901; 1,0]_{ICr95\%}$).

La covariance des sensibilités était de 0,0241 [-0,00773; 0,0949]_{ICr95%} et celle de la spécificité était de 0,00521 [-4,61 10⁻⁷; 0,0361]_{ICr95%}. Le DIC était de 25.

Aucune différence significative n'était observable entre les sensibilités et les spécificités estimées en utilisant les seuils recommandés par le fabricant de l'I-ELISA et celles estimées en utilisant le nouveau seuil.

4.4 Etude des deux tests utilisés en association

L'estimation des valeurs de sensibilité et de spécificité des associations en série (I-ELISA puis FC) et en parallèle a été effectuée sur la base des sensibilités et des spécificités estimées en utilisant le nouveau seuil de positivité. La sensibilité de l'association en série était de 0,812 [0,699; 0,980]_{ICr95%} et sa spécificité était de 0,995 [0,994; 0,996]_{ICr95%}. La sensibilité de l'association en parallèle était de 0,967 [0,902 ; 0,983]_{ICr95%} et sa spécificité était de 0,946 [0,854 ; 1,0]_{ICr95%}.

5 Discussion

Les objectifs de cette étude étaient d'estimer les caractéristiques d'un nouveau test de dépistage de l'épididymite contagieuse du bélier (I-ELISA) afin de les comparer aux caractéristiques du test recommandé officiellement par l'OIE et l'Union Européenne (FC), puis d'évaluer les

possibilités d'utiliser l'I-ELISA en alternative ou en association avec la FC. Cette seconde étape devait permettre de concevoir un protocole de dépistage utilisable sur le terrain adapté au contexte épidémiologique, et en particulier la recherche de l'infection chez des animaux destinés au commerce international ou intracommunautaire.

Comme expliqué précédemment, il n'existe à l'heure actuelle aucun plan de dépistage systématique de l'épididymite contagieuse chez le bélier. Seuls les animaux reproducteurs des stations de collecte de semence et les béliers destinés à l'export subissent un test sérologique de dépistage de l'infection par *B. ovis* (FC), dont on sait qu'il n'est pas parfait et dont les caractéristiques estimées varient d'une étude à l'autre. La notion d'élevage « officiellement indemne » d'épididymite contagieuse du bélier n'existe pas dans la réglementation française et la recherche de *B. ovis* sur les animaux abattus dans les foyers est trop coûteuse pour être effectuée de manière systématique. Aucune référence individuelle concernant le statut infectieux des béliers étudiés vis-à-vis de *B. ovis* n'était disponible : ainsi, l'utilisation de l'approche par un modèle à classe latente se justifiait pleinement pour estimer les caractéristiques des tests.

Nous avons choisi de grouper les résultats obtenus dans les trois sous-populations et d'utiliser un modèle « deux tests, une population ». Dans des cas similaires, plusieurs études proposent l'utilisation d'un modèle distinguant les trois sous-populations (modèle « deux tests, trois populations ») mais ce choix n'est pertinent que si les prévalences dans ces sous-populations sont suffisamment différentes pour permettre un réel apport d'informations dans le modèle. Ce n'était pas le cas dans notre étude, puisque les prévalences dans les trois sous-populations étaient inconnues et probablement assez proches. Un essai de modélisation par cette approche a été effectué, mais l'adaptation du modèle aux données était moins satisfaisante qu'avec le modèle « deux tests, une population » et les résultats n'ont donc pas été présentés dans ce manuscrit.

Le premier objectif de cette étude était d'évaluer la possibilité d'utiliser le kit I-ELISA comme alternative au test de fixation du complément. En effet, la FC est suffisamment sensible et spécifique pour l'usage qui en est fait mais présente certains désavantages techniques. En considérant une analyse quotidienne de 90 échantillons de sérum, les équipes du LNR Brucellose EU/OIE/FAO ont estimé que l'utilisation de la FC était plus coûteuse que celle du kit I-ELISA (Garin-Bastuji, LNR Brucellose, 2011, *communication personnelle*). Cette différence de coût est principalement due à la charge de travail induite par chacun des deux tests : l'I-ELISA étudié est plus rapide, plus facile à réaliser et peut être automatisé pour accélérer les processus, ce qui permet la réalisation d'un plus grand nombre de tests par technicien et par jour. Par ailleurs, le kit I-ELISA est standardisé, tandis que les antigènes produits pour la réalisation de la FC sont des antigènes « maison », introuvables sur le marché européen. De plus, les performances du kit I-ELISA ne sont pas affectées par la présence

d'un sérum hémolysé ou anti-complémentaire, contrairement à la FC (Vigliocco *et al.*, 1997 ; Gall *et al.*, 2003). Enfin, l'effet de zone n'existe pas avec l'I-ELISA.

L'étude des caractéristiques des deux tests a montré que la sensibilité et la spécificité de l'I-ELISA n'étaient pas significativement différentes de celles de la FC ($p > 0,05$). La valeur moyenne de sensibilité de l'I-ELISA était légèrement plus élevée que celle de la FC. La valeur moyenne de spécificité de la FC était en revanche légèrement supérieure à celle de l'I-ELISA. Le test I-ELISA pourrait donc être utilisé comme alternative à la FC, sans majorer le risque d'erreur de détection par défaut engendré par le protocole.

L'un des principaux problèmes posés par le kit I-ELISA étudié dans les conditions d'interprétation prévues par le fabricant est l'existence d'un intervalle de résultats douteux (entre 10% D.O. et 50% D.O.). Etant donné l'objectif de l'étude, c'est-à-dire l'évaluation de l'I-ELISA comme alternative à la FC, nous avons choisi de déterminer un seuil de positivité unique permettant de supprimer les résultats douteux sans dégrader la concordance entre les résultats des deux tests. La construction d'une courbe ROC n'a pas pu être réalisée en raison de l'absence d'information sur le statut infectieux individuel des animaux (et par conséquent de référence positive).

Pour éviter l'obtention de résultats douteux, il serait également possible d'utiliser des seuils de positivité différents selon le contexte épidémiologique d'utilisation du test I-ELISA.

- Les béliers exportés proviennent uniquement d'élevages considérés comme indemnes, dans lesquels la maladie est absente (ou éventuellement, présente à une prévalence très faible). Dans ces conditions, la valeur prédictive positive du test est mauvaise. La survenue de résultats faussement positifs engendre des conséquences économiques considérables car elle induit un blocage commercial de l'élevage concerné, le temps de mener des investigations complémentaires. On souhaite donc optimiser la spécificité du protocole. Dans ces conditions, l'utilisation d'un seuil de positivité élevé (par exemple, 50 ou 60% DO) limiterait le nombre de résultats faussement positifs sans pour autant entraîner un risque sanitaire trop important étant donné le contexte de très faible prévalence.
- En revanche, lorsque le test est utilisé sur les animaux provenant d'un foyer avéré ou pour confirmer le diagnostic chez des individus présentant des lésions observables cliniquement, l'objectif principal est la détection précoce et l'éradication rapide de la maladie. Dans ce contexte d'urgence, la survenue de résultats faussement négatifs risque de ralentir l'éradication de la maladie : pour cette raison et sous certaines conditions, il pourrait être acceptable d'abattre « par erreur » des animaux séropositifs mais non infectés. Par conséquent, dans un

contexte de haute prévalence, un seuil de positivité bas pourrait être utilisé (par exemple, 10 ou 30% D.O.).

Afin de pallier les défauts de sensibilité et de spécificité des deux tests étudiés, il serait possible de les utiliser en association. L'association en série (règle d'interprétation « ET », cf. Chapitre I – paragraphe 3.4) permet d'augmenter la spécificité du dépistage et peut par conséquent être recommandée pour le dépistage systématique des béliers destinés au commerce. L'association en parallèle (règle d'interprétation « ET », cf. Chapitre I – paragraphe 3.4) permet quant-à-elle d'augmenter la sensibilité du dispositif et est davantage adaptée à un contexte de risques élevés d'infection (foyer avéré, zone de haute prévalence de la maladie).

Les résultats concernant les performances des tests et les connaissances disponibles sur les modalités de transmission de la maladie suggèrent différentes stratégies de dépistage ou de diagnostic possibles.

- Les béliers destinés à l'exportation doivent obligatoirement provenir de troupeaux indemnes de la maladie. Dans ce cas, les animaux pourraient être testés avec l'I-ELISA seul. Si tous les résultats des animaux du cheptel sont négatifs, l'export devrait être autorisé. Dans les élevages dans lesquels un ou plusieurs animaux ont obtenu un résultat positif au test I-ELISA, le commerce devrait être bloqué et des investigations supplémentaires devraient être menées afin de confirmer ou d'infirmer la suspicion (examen clinique, test FC, culture sur semence ou PCR).
- Dans les troupeaux infectés dans lesquels *Brucella ovis* a été mise en évidence, l'objectif principal des tests est de détecter rapidement les animaux infectés afin de procéder à une éradication rapide de la maladie. Pour ce faire, tous les animaux du cheptel (y compris les femelles) devraient être soumis aux deux tests (I-ELISA et FC) en parallèle.

Les animaux obtenant un résultat positif à l'un ou l'autre des deux tests devraient être abattus et remplacés par des animaux jeunes, n'ayant pas débuté leur activité sexuelle et provenant de troupeaux indemnes de la maladie.

Les animaux restants présentant des résultats négatifs aux deux tests pourraient être conservés dans le troupeau mais ne devraient ni être vendus, ni être exportés. De nouveaux tests devraient être réalisés régulièrement, par exemple tous les 45 à 60 jours jusqu'à assainissement du cheptel (*i.e.* jusqu'à ce que tous les animaux aient obtenu deux résultats négatifs consécutifs). Ce type de stratégie pose toutefois un problème économique majeur en raison des coûts engendrés par la réalisation des deux tests sur tous les animaux du troupeau et par l'abattage systématique des animaux obtenant des résultats non négatifs.

- Dans l'ensemble des troupeaux ovins français, enfin, les animaux devraient être soumis à un examen clinique deux mois avant le début de la saison de lutte. Les béliers présentant des signes cliniques d'épididymite devraient être écartés de la reproduction et soumis à un test I-ELISA. Les béliers présentant des résultats non négatifs à ce test devraient subir d'autres examens (culture de semence) afin de confirmer ou d'infirmer la présence de *B. ovis*.



En conclusion, **l'utilisation de l'I-ELISA paraît intéressante**, tant du point de vue de ses **performances diagnostiques** qui ne diffèrent pas significativement de celles de la FC, que d'un point de vue **technique et économique**.

Les seuils de positivité de l'I-ELISA utilisés dans cette étude ont été déterminés dans le but de limiter le nombre de résultats douteux sans modifier la concordance entre FC et I-ELISA. Il serait intéressant de mener une **réflexion sur les seuils de positivité utilisés afin de les adapter au contexte** dans lequel le test est effectué.

Les défauts de sensibilité et de spécificité de l'I-ELISA et de la FC suggèrent l'intérêt de les **utiliser en association, en particulier pour la mise en œuvre de protocoles de dépistage à l'échelle collective**, soit en série pour statuer sur le devenir des élevages indemnes dans lesquels des résultats positifs ont été observés chez des béliers destinés à l'export, soit en parallèle pour accélérer l'éradication de la maladie dans les élevages foyers.

**CHAPITRE IV : ÉTUDE DES CARACTERISTIQUES D'UN
TEST DE DEPISTAGE A L'ECHELLE INDIVIDUELLE ET
COLLECTIVE EN PRESENCE D'UNE REFERENCE ;
REFLEXION SUR LES SEUILS DE POSITIVITE OPTIMAUX ;
EVALUATION DE L'ARBRE DECISIONNEL INCLUANT CE
TEST : APPLICATION A LA TUBERCULOSE BOVINE**

1 Introduction et contexte

La tuberculose est une maladie infectieuse commune à l'être humain et à un grand nombre d'espèces animales puisque toutes les espèces de vertébrés peuvent en être atteintes. Les bacilles tuberculeux appartiennent à l'ordre des Actinomycétales, à la famille des Mycobacteriaceae et au genre *Mycobacterium*.

On distingue trois types de mycobactéries, selon la nature de leur pouvoir pathogène :

- les mycobactéries pathogènes : elles sont réparties en deux groupes principaux, le complexe *Mycobacterium tuberculosis* et le complexe *Mycobacterium avium* intracellulare ;
- les mycobactéries opportunistes : elles peuvent, dans certaines conditions, provoquer des troubles chez l'Être humain ou l'animal (thélite nodulaire à *M. gordonae*, affections pulmonaires à *M. kansasii*, nodules cutanés et mammites à *M. fortuitum*, etc). Ces affections sont bénignes et peu contagieuses ;
- les mycobactéries saprophytes : elles sont présentes dans le milieu naturel (eau, sol, végétaux) et chez les animaux (lait, muqueuses, peau, tube digestif).

Les mycobactéries opportunistes et saprophytes peuvent être responsables de réactions faussement positives lors de dépistage de la tuberculose par test tuberculinique (cf. paragraphe 1.4.1).

1.1 Agent pathogène responsable de la tuberculose bovine et physio-pathogénie de l'infection

La tuberculose bovine est principalement due à *Mycobacterium bovis*, ou, plus rarement, à *Mycobacterium tuberculosis*. Les bovins sont également réceptifs à *Mycobacterium avium* et aux mycobactéries atypiques mais les infections résultantes ne font pas partie des maladies réglementées.

Dans la forme respiratoire, qui est la plus fréquente, les individus tuberculeux excrètent le bacille de manière précoce et durable, parfois massivement, mais l'intensité de l'excrétion est irrégulière dans le temps. Les matières virulentes sont le jetage, la salive, les expectorations, les tissus et le sang dans les formes évolutives de tuberculose. La mycobactérie peut également être excrétée dans les excréments, le lait, les urines et les sécrétions génitales selon la localisation de l'infection.

Chez les bovins, la contamination se fait essentiellement de manière directe et horizontale, par aérosols dans 95% des cas et plus rarement par voie digestive ou par voie vénérienne (OIE, 2011b). En raison de la résistance des mycobactéries dans le milieu extérieur, une transmission indirecte est possible, par l'intermédiaire de matériel, locaux et pâturages contaminés.

Lors de l'infection, l'organisme développe une réaction immunitaire cellulaire, par le biais d'une activation des lymphocytes T (Ritacco *et al.*, 1991). Cette réponse immune est à la fois un mécanisme de défense et à l'origine d'une inflammation chronique induisant la formation de granulomes (Pritchard, 1988). L'immunité résultante n'est que partielle et relative. Dans un second temps se développe une hypersensibilité retardée (HSR), suivie tardivement par la production d'anticorps antituberculeux (Neill *et al.*, 2001). Leur concentration sérique est fluctuante, ce qui explique le manque de fiabilité des tests sérologiques pour le dépistage de la tuberculose (cf.paragraphe 1.4.2).

1.2 La tuberculose bovine en France: contexte épidémiologique et réglementation

La tuberculose bovine est cosmopolite. Elle demeure rare en Europe occidentale et en Amérique du Nord mais fréquente en Amérique du Sud et en Afrique. Au 10 mai 2011, quatorze états membres de l'Union Européenne étaient officiellement indemnes de tuberculose bovine¹ (Tableau 16). La France bénéficie de ce statut depuis décembre 2000².

En France, la lutte contre la tuberculose bovine a débuté en 1954, avec la mise en place d'une prophylaxie facultative par les Groupements de Défense Sanitaire (GDS), devenue obligatoire à l'échelle nationale en 1965. On estime qu'en 1955, le taux d'incidence annuel de la maladie à l'échelon « élevage » était de 28% (Bénet *et al.*, 2011). La mise en œuvre d'un dépistage systématique a porté ses fruits puisqu'en 2004, le taux d'incidence annuel était de 0,02% (Figure 15).

¹ Décision 2003/467/CE modifiée le 10 mai 2011 ; le statut « officiellement indemne » tolère une prévalence résiduelle de 0,1%

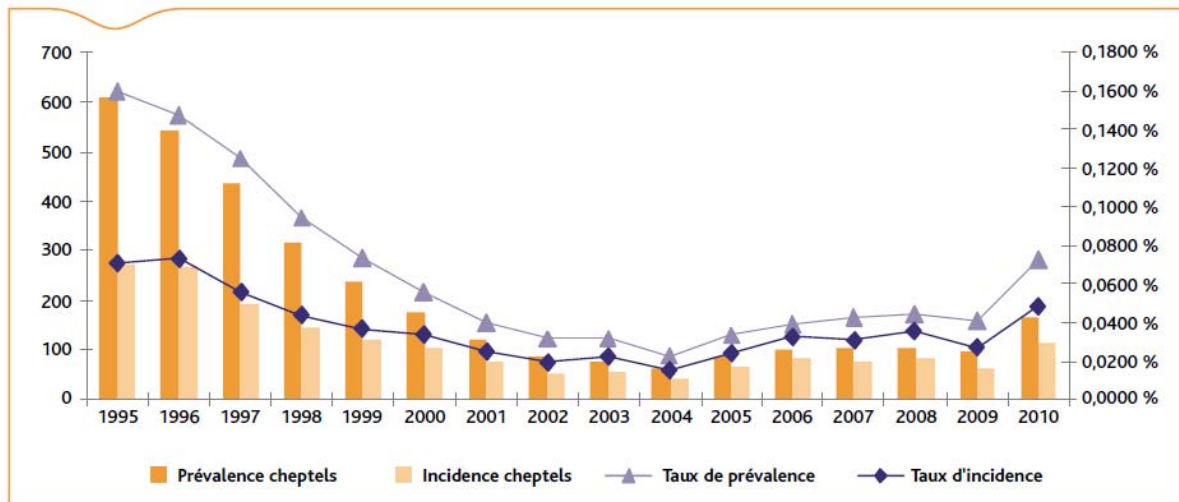
² Décision 2001/26/CE

Tableau 16 : Liste des Etats membres de l'UE officiellement indemnes de tuberculose bovine

(Décision 2003/467/CE modifiée le 10 mai 2011)

Etat membre
Belgique
République tchèque
Danemark
Allemagne
Estonie
France
Luxembourg
Pays-Bas
Autriche
Pologne
Slovénie
Slovaquie
Finlande
Suède

Figure 15 : Evolution de l'incidence, de la prévalence et des taux d'incidence et de prévalence de la tuberculose bovine en France, de 1995 à 2010 (d'après Fediaevsky et al., 2011)



Des mesures de lutte basées sur un dépistage régulier par intradermotuberculination dans les cheptels, associé à l'abattage systématique des bovins réagissant, la restriction des mouvements dans les foyers et l'inspection des carcasses à l'abattoir ont permis l'éradication de la tuberculose bovine dans plusieurs pays européens, l'Australie, la Suisse, le Canada et la majorité des états des Etats-Unis (Caffrey, 1994 ; Clifton-Hadley and Wilesmith, 1995 ; Cousins *et al.*, 1998 ; Cousins, 2001). Dans d'autres pays comme la France, l'Irlande ou la Grande-Bretagne, cette approche n'a pas suffi à éradiquer la tuberculose bovine (De la Rua-Domenech *et al.*, 2006).

Depuis quelques années, une recrudescence du nombre de foyers est même observée dans plusieurs départements français. C'est notamment le cas en Dordogne et en Côte d'Or, où le nombre de foyers de tuberculose bovine représentait en 2009 environ 46 % du nombre total de foyers français. Depuis 2006, on dénombre en moyenne 70 nouveaux foyers par an en France (Source :

à celle de la Grande-Bretagne et de l'Irlande, où l'infection s'est répandue chez ces animaux à partir des élevages bovins. Le blaireau (et le cerf dans certaines régions irlandaises), y constitue à présent un réservoir sauvage qui complique le processus d'éradication (Krebs *et al.*, 1997 ; More, 2009).

Comme évoqué précédemment, la tuberculose bovine engendre des pertes économiques importantes dans les troupeaux infectés mais constitue également un problème de santé publique puisqu'il s'agit d'une zoonose majeure. *M. bovis* peut être transmise à l'Être humain par aérosols ou, plus rarement, par voie orale ou cutanée. C'était une zoonose très fréquente en France avant la mise en place des premières mesures sanitaires réglementaires (pasteurisation du lait¹ et abattage systématique des bovidés réagissant à la tuberculine²) (Bénet *et al.*, 2011). A cette époque, la prévalence de *M. bovis* chez les patients tuberculeux était de 1,5%. En 1995, l'incidence de la tuberculose à *M. bovis* chez l'Être humain était estimée à 0,07 pour 100 000 habitants (Boulaïbal *et al.*, 1998).

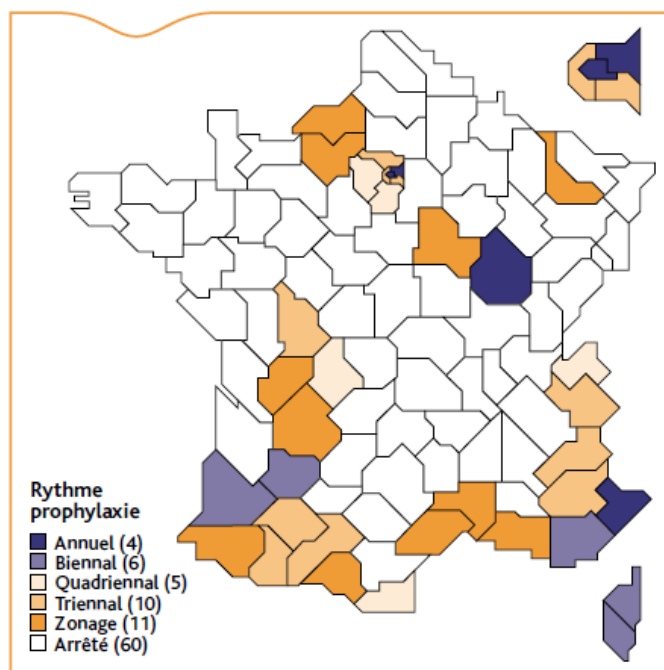
1.3 Mesures de lutte contre la tuberculose bovine en France et réglementation française

Les principes actuels de la lutte contre la tuberculose bovine en France sont définis par l'Arrêté du 4 janvier 2011 (modifiant l'arrêté du 15 septembre 2003) et par la directive CE/64/432 du 26 juin 1964. Dans la majorité des départements français (60 départements en 2010), le dépistage régulier par tuberculination a été abandonné en raison de la forte diminution du nombre de cas observés entre 1955 et 2000 et de la diminution corrélée de la valeur prédictive positive des résultats obtenus. Dans les autres départements, la périodicité du dépistage est annuelle à quadriennale (Fediaevsky *et al.*, 2011 ; Figure 17). Certains départements « sensibles », dans lesquels des foyers de tuberculose ont été identifiés ces dernières années, subissent un dépistage renforcé (prophylaxie annuelle en Dordogne, Côte d'Or et Camargue) par intradermotuberculination, éventuellement associée au dosage d'interféron gamma (DGAL, 2011, *communication personnelle*). La réglementation prévoit également une surveillance étroite des cheptels à risque (anciens foyers, anciens suspects, élevages à fort taux de rotation...).

¹ Décret n°55-771 du 21 mai 1955


² Décret n°63-301 du 19 mars 1963

Figure 17 : Rythme de dépistage de la tuberculose bovine dans les départements de France métropolitaine au cours de l'année 2010 (D'après Fediaevsky *et al.*, 2011)



Les principes réglementaires aboutissant au placement d'un troupeau sous suspicion (Arrêté Préfectoral de Mise sous Surveillance ou APMS) sont présentés dans le [Tableau 17](#).

Le cheptel suspect est alors soumis à des investigations approfondies afin de confirmer ou d'infirmer la suspicion. Les principes réglementaires permettant la confirmation de l'infection sont énumérés dans le [Tableau 18](#). La totalité des animaux des foyers doivent être abattus¹. Le traitement antibiotique des animaux atteints est interdit en raison des risques encourus pour la santé publique.

 **Remarque** : Dans le département de la Côte d'Or, en raison du grand nombre de résultats faussement positifs observés, une dérogation à l'abattage total peut éventuellement être obtenue. On procède alors à plusieurs séries de tests avec abattage systématique des animaux réagissants.

¹ Arrêté du 4 mai 1999 ; Abattage total du troupeau dans les 30 jours suivant la découverte du foyer, à l'exception des races d'intérêt local pour lesquelles une dérogation peut être accordée

Tableau 17 : Définition réglementaire d'un troupeau bovin suspect d'être infecté de tuberculose : observation des résultats suivants sur un animal du troupeau

(Arrêté du 4 janvier 2011 modifiant l'arrêté du 15 septembre 2003)

Examen effectué	Résultat
Dépistage systématique	Résultat non négatif à une IDS ¹ ou une IDC ²
	Résultat non négatif à l'IFN ³
Abattoir ou autopsie	Lésions macroscopiques évocatrices de tuberculose
Examen d'un prélèvement histologique	Lésions histologiques évocatrices de tuberculose
	Résultat positif en PCR

¹IDS : intradermotuberculination simple ; ²IDC : intradermotuberculination comparative ; ³IFN : Test de dosage de l'interféron gamma

Tableau 18 : Définition réglementaire d'un troupeau bovin infecté de tuberculose : observation des résultats suivants sur un même animal du troupeau

(Arrêté du 4 janvier 2011 modifiant l'arrêté du 15 septembre 2003)

Examen effectué	Résultat
Examen clinique	Signes cliniques de tuberculose
ET	ET
Dépistage systématique	IDS ¹ ou IDC ² positive
Dépistage systématique	IDC positive ET lésions histologiques évocatrices de tuberculose
ET	
Examen d'un prélèvement histologique	IDC ou IDC positive ET résultat positif en PCR
	Lésions histologiques évocatrices de tuberculose
Examen histologique, bactériologique ou par PCR d'un prélèvement	ET résultat positif en PCR
	Isolement et identification de <i>M. bovis</i> ou <i>M. tuberculosis</i>
	Résultat positif en PCR chez un animal provenant d'un troupeau suspect d'être infecté de tuberculose

¹IDS : intradermotuberculination simple ; ²IDC : intradermotuberculination comparative

1.4 Modalités du diagnostic *ante-mortem* de la tuberculose bovine

La symptomatologie de la tuberculose bovine est habituellement fruste. La maladie évolue sous la forme d'une maladie débilitante chronique évoluant sur plusieurs mois à années. On peut observer une adénomégalie accompagnée de signes respiratoires et/ou de troubles digestifs. En phase terminale, l'animal est émacié et présente une dyspnée aiguë. Ce type de tableau clinique est

très rarement observé de nos jours en France. Il est donc impossible de fonder le dépistage de la maladie sur un simple examen clinique et seuls des tests sont susceptibles de détecter l'infection dans ses stades les plus précoces (De la Rua-Domenech *et al.*, 2006).

1.4.1 Dépistage allergique

Le dépistage allergique de la tuberculose se fait par injection intradermique de tuberculine, selon deux méthodes : l'intradermotuberculation simple (IDS) ou l'intradermotuberculation comparative (IDC).

La tuberculine est un allergeo-haptène dont l'injection permet de révéler le phénomène d'hypersensibilité retardée (HSR) (Francis, 1947 ; Snider, 1982). Lorsque la tuberculine est injectée à un animal qui n'a jamais été sensibilisé aux antigènes présents dans la tuberculine, aucune réaction inflammatoire locale n'est significativement observable. En revanche, si l'animal a déjà été sensibilisé (*i.e.* est infecté, car la vaccination est aujourd'hui interdite), on observe une réaction inflammatoire locale dans les 48 à 72 heures suivant l'injection (Lepper *et al.*, 1977). L'intradermotuberculation comparative (IDC) repose sur les mêmes principes que l'IDS mais permet de différencier les réactions d'HSR dues à l'infection par *M. bovis* (ou *M. tuberculosis*) de celles engendrées par des mycobactéries atypiques. Elle est plus coûteuse et engendre plus de contraintes pratiques (manipulation des animaux, injections et mensurations multiples) que l'IDS.

Les principes généraux et les modalités de lecture et d'interprétation des résultats d'IDS et d'IDC sont présentés en [Annexe 17](#).

L'HSR s'installe 15 jours à 6 mois après la pénétration du bacille dans l'organisme (Francis, 1947) – période d'*ante*-allergie. La réaction allergique peut ensuite fluctuer selon l'animal considéré : la réaction est atténuée chez les jeunes animaux, les femelles proches du part et les animaux atteints de maladies intercurrentes (De la Rua-Domenech *et al.*, 2006). Il existe également un phénomène d'anergie lors d'injections répétées de tuberculine : un délai d'au minimum 42 jours doit réglementairement séparer deux injections de tuberculine¹. Par ailleurs, en fin d'évolution de la maladie, les capacités de l'organisme sont saturées et la réaction allergique n'est plus observée (Lepper *et al.*, 1977). Enfin, certains animaux demeurent totalement anergiques au cours de leur existence. Ils représentent 1 à 5% de la population totale (Bénet *et al.*, 2011).

¹ Directive Européenne 64/432 du 26 juin 1964

La sensibilité individuelle moyenne (Se_i) de l'IDS est estimée à 83,9%. Elle peut varier de 63,2% à 100% selon les caractéristiques de l'infection ou les modalités de réalisation (De la Rua-Domenech *et al.*, 2006). La spécificité individuelle moyenne (Sp_i) de l'IDS est estimée 96,8% (75,5% à 99,0% selon les études) (De la Rua-Domenech *et al.*, 2006). Elle varie selon la fréquence et l'étiologie des réactions non spécifiques dans la population. La sensibilité moyenne de l'IDC est comprise entre 52,0% et 100% (avec une valeur médiane de 80,0%) et sa spécificité est comprise entre 78,8% et 100% avec une valeur médiane de 99,5% (De la Rua-Domenech *et al.*, 2006).

1.4.2 Dépistage sérologique

Certains tests sérologiques tels que le test par polarisation de fluorescence (FPA) ou des ELISA ont été mis au point pour le bétail, mais leur utilisation demeure restreinte à des conditions expérimentales et à ce jour, aucun d'entre eux ne s'est avéré suffisamment fiable pour être utilisé sur le terrain (Cousins, 2001 ; Wood et Jones, 2001 ; Pollock & Neill, 2002).

1.4.3 Dépistage par dosage de l'Interféron gamma (IFN)


Un autre test réalisé sur prélèvement de sang, le dosage de l'interféron gamma (IFN), a été développé en Australie dans les années 1980, pour le dépistage de la tuberculose bovine en association avec l'IDS au pli sous-caudal (Wood *et al.*, 1991 ; Wood et Rothel, 1994 ; Wood et Jones, 2001). Il permet de détecter la libération d'interféron gamma dans une culture de sang total stimulé par de la tuberculine (Rothel *et al.*, 1990). L'interféron gamma est une cytokine produite majoritairement par les lymphocytes T en réponse à une stimulation antigénique, notamment lors d'une infection par les mycobactéries (Pollock & Neill, 2002). Le principe du test de dosage de l'interféron gamma est décrit en [Annexe 18](#).

Ce test a été approuvé comme méthode officielle de diagnostic de la tuberculose bovine par les autorités australiennes en 1991 et en Nouvelle-Zélande à la fin des années 1990 (Wood et Rothel, 1994 ; Cousins *et al.*, 1998). Il est à l'heure actuelle en cours de validation dans plusieurs pays européens (Allemagne, Belgique, Espagne, France, Grande-Bretagne, Hongrie, Irlande, Pays-Bas, Pologne).

Le kit de dosage de l'interféron gamma Bovigam® commercialisé par Prionics (Suisse) a fait l'objet de plusieurs études en Australie, au Brésil, en Ethiopie, en Grande-Bretagne, en Italie, en

Nouvelle-Zélande, en Irlande, en Espagne et aux USA (Wood et Jones, 2001). La sensibilité du test était comprise entre 73,0% et 100,0% (valeur médiane : 87,6%). Sa spécificité était comprise entre 85,0% et 99,6% avec une valeur médiane de 96,6% (De la Rúa-Domenech *et al.*, 2006). Les caractéristiques du test varient selon le contexte épidémiologique, les seuils de positivité employés, les lots d'antigènes utilisés et le test de référence utilisé pour déterminer le statut réel des animaux vis-à-vis de l'infection. Le test Bovigam® est également en cours d'évaluation pour d'autres espèces animales telles que le blaireau (Dalley *et al.*, 2004).

D'autres « cocktails » d'antigènes (ESAT-6, CFP-10) peuvent être utilisés pour améliorer la spécificité du test. Ils sont en cours de validation, et aucun kit commercial contenant ces antigènes n'est pour l'instant disponible.

 En France, le dosage de l'IFN γ fait actuellement l'objet d'une procédure de validation et a été introduit très récemment dans les textes réglementaires¹. Il est utilisé à l'essai depuis plusieurs années, dans quelques départements français : la Côte d'Or, la Dordogne et les trois départements constituant la région naturelle de Camargue (Bouches-Rhône, Gard et Hérault).

1.5 Modalités diagnostiques *post-mortem*

A l'autopsie (ou à l'inspection *post-mortem* en abattoir), la tuberculose bovine est caractérisée par la présence de granulomes nodulaires appelés « tubercules ». Les tubercules se présentent comme des nodules de taille variable, jaunâtres et de consistance caséuse, caséo-calcaire ou calcifiée. La recherche de lésions tuberculeuses est la première étape de l'inspection, mais ne permet pas de poser le diagnostic avec certitude. Elle est suivie d'un examen histologique des lésions, puis d'une mise en culture à des fins d'isolement de la bactérie. La culture des bacilles tuberculeux nécessite l'emploi de milieux enrichis sur lesquels les souches croissent lentement : 10 jours à 2 mois selon le bacille, en moyenne 4 à 6 semaines pour *M. bovis* (Bénet *et al.*, 2011).

L'amplification génique ou PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique de plus en plus utilisée pour la mise en évidence directe des mycobactéries. Elle a été introduite récemment dans les textes réglementaires¹. Malgré quelques réserves (prise en compte des communautés entre mycobactéries, maîtrise de la technique par le laboratoire), la fiabilité de la PCR sur des prélèvements mis en culture une quinzaine de jours est bonne (Boschioli, LNR Tuberculose, 2012, *communication personnelle*). Cette méthode permet entre autres de gagner du temps par rapport aux méthodes

¹ Arrêté du 4 janvier 2011 modifiant l'arrêté du 15 septembre 2003

faisant appel à la bactériologie classique. L'utilisation de la PCR de manière directe, sur des broyats de prélèvements est encore en cours de validation (Faye *et al.*, 2011) mais semble prometteuse, en particulier du fait de sa rapidité.

2 Objectifs de l'étude

Les outils disponibles pour le dépistage de la tuberculose bovine (intradermotuberculinations ; ID) sont imparfaits, et la situation de fin d'éradication engendre une diminution de la valeur prédictive positive des tests.

Une recrudescence du nombre de foyers de tuberculose bovine a été observée ces dernières années dans trois zones géographiques françaises (Côte d'Or, Dordogne, Camargue). Les difficultés liées à la réalisation et/ou à l'interprétation des résultats d'intradermotuberculation allant croissant dans ces zones, les autorités ont mis en place un protocole de dépistage expérimental incluant un nouveau test en cours de validation, le dosage de l'interféron gamma. Ce dispositif a permis de relancer le dépistage de la tuberculose bovine dans les zones concernées, en améliorant la motivation des acteurs locaux. Afin d'encadrer au mieux l'utilisation de l'IFN sur le terrain, des « arbres décisionnels » ont été appliqués dans les départements à risque à des fins expérimentales. Ces protocoles prévoyaient l'utilisation de l'IFN en première intention en Camargue, pour le dépistage systématique annuel de l'intégralité des troupeaux. En Côte d'Or et en Dordogne en revanche, l'IFN était utilisé en série après une intradermotuberculation non négative, pour confirmer ou infirmer le résultat d'ID. Dans un petit nombre de troupeaux enfin, l'IFN a été utilisé en parallèle à l'ID pour accélérer l'éradication dans les troupeaux foyers en abattage partiel (Côte d'Or) ou pour améliorer la surveillance dans les troupeaux en suivi renforcé¹ (Dordogne). Cette dernière utilisation n'est pas prévue par la réglementation européenne². Cette non-conformité a été reprochée à la France par l'Union Européenne dans un rapport de l'Office Alimentaire et Vétérinaire (OAV, 2012).

¹ Troupeaux en suivi renforcé : troupeaux présentant un risque particulier vis-à-vis de la tuberculose bovine (principalement : anciens foyers ou en lien épidémiologique avec un foyer).

² Directive CE/64/432

Les objectifs de notre étude étaient les suivants :

- évaluer les caractéristiques du test de dosage de l'interféron gamma dans ses conditions d'utilisation en Côte d'Or, Dordogne et Camargue et les comparer aux caractéristiques de l'intradermotuberculation ;

- proposer d'éventuelles améliorations au test utilisé actuellement : « cocktails » d'antigènes utilisés, seuils de positivité, modalités d'interprétation des résultats obtenus avec les différents antigènes ;

- comparer l'efficacité du protocole de dépistage de la tuberculose bovine intégrant l'IFN (appliqué entre 2009 et 2012 en Côte d'Or et en Dordogne) au protocole utilisant uniquement l'intradermotuberculation (recommandé par la réglementation européenne¹).

Cette étude a fait l'objet d'un article actuellement en cours de révision dans une revue internationale à comité de lecture : PRAUD A., BOSCHIROLI M.L., BENET J.J., MEYER L., GARIN-BASTUJI B., DUFOUR B. Evaluation of the efficiency of the gamma interferon test used in series after SICCT for the diagnosis of bovine tuberculosis in Côte d'Or (France). *Transboundary and Emerging Diseases* (En révision). (cf. Annexe 4)

3 Matériels et méthodes

Trois études ont été menées, dans trois zones géographiques dans lesquelles le dosage de l'interféron gamma est utilisé à titre expérimental depuis plusieurs années : la Côte d'Or, la Dordogne et les trois départements constituant la région Camargue.


3.1 Source des données utilisées

3.1.1 Etude conduite dans le département de Côte d'Or

❖ Origine et modalités de collecte des données

Cette étude a été conduite à l'aide des données recueillies par la Direction Départementale de la Protection des Populations de Côte d'Or (DDPP 21) au cours des campagnes de prophylaxie de la tuberculose bovine organisées entre novembre 2009 et janvier 2012. L'organisation de la collecte

informatisée systématique des résultats de dépistage de la tuberculose bovine y est récente. Depuis septembre 2009, le Groupement de Défense Sanitaire de Côte d'Or (GDS 21) a mis au point une base de données utilisant le logiciel Access®. Notre travail sur la tuberculose bovine a donc débuté, en septembre 2009, par une période de concertation avec les acteurs de terrain de la DDPP 21 dans le but de trouver un compromis entre les besoins d'information utiles à la recherche, les besoins d'information de la DDPP 21 et les contraintes de terrain.

 Remarque : Ces données ont été collectées par la DDPP21 pour suivre la lutte conduite sur le terrain. Elles n'ont donc, à l'origine, pas été produites pour des besoins d'épidémiologie. Néanmoins, ces données constituaient les seules informations disponibles concernant l'utilisation du dosage de l'interféron gamma en France selon les protocoles appliqués ces dernières années, dont il était nécessaire d'évaluer l'efficacité. Un travail important de réorganisation des données, de croisement et de vérification des informations saisies dans la base a donc été effectué. De ce travail est née une seconde base, épurée d'un nombre important d'animaux et de troupeaux pour lesquels l'information était incomplète.

❖ Zonage

On distingue deux zones épidémiologiquement distinctes en Côte d'Or ([Annexe 19](#)):

- la « zone blanche » est une zone à bas risque de tuberculose bovine ;
- la « zone rouge » est une zone historiquement connue comme étant à haut risque de tuberculose bovine. C'est également dans cette zone que se concentrent les réactions faussement positives en intradermotuberculation dues à des mycobactéries atypiques.

❖ Tests étudiés

Deux types de tests étaient très majoritairement utilisés au cours des opérations de prophylaxie en Côte d'Or entre 2009 et 2012 :


- l'intradermotuberculation comparative (IDC), choisie pour son gain de spécificité par rapport à l'IDS;
- le dosage de l'interféron gamma, réalisé à l'aide de deux types d'antigènes : le kit Bovigam® (Prionics, Suisse) et un peptide recombinant, l'ESAT-6.

Le seuil de positivité utilisé par le laboratoire vétérinaire départemental de Côte d'Or correspondait à un seuil de densité optique normalisé de 0,04 pour le Bovigam® et pour l'ESAT-6. Les modalités de calcul sont détaillées en [Annexe 18](#). Les modalités d'interprétation des résultats individuels du dosage de l'IFN par ce laboratoire sont présentées dans le [Tableau 19](#).

Tableau 19 : Interprétation des résultats du dosage de l'interféron gamma au Laboratoire Vétérinaire Départemental (LVD) de Côte d'Or

Bovigam®	ESAT-6	Résultat de l'IFN « global » *
Positif	Positif	Positif
Positif	Négatif	Divergent
Négatif	Positif	Divergent
Négatif	Négatif	Négatif

* IFN « global » : association en parallèle du Bovigam® et de l'ESAT-6

 **Remarque :** Dans la suite du texte, le terme « IFN global » désigne l'interprétation en parallèle (règle d'interprétation « OU ») des résultats aux tests Bovigam® et ESAT-6.

L'arbre décisionnel utilisé en Côte d'Or pour la lutte contre la tuberculose bovine au cours de la période d'étude (2009-2012) est présenté en [Annexe 20](#). Ce protocole prévoyait la réalisation d'un IFN sur les animaux ayant présenté des résultats petits douteux¹ en IDC dans un contexte épidémiologique défavorable, ou des résultats grands douteux² en IDC dans un contexte épidémiologique favorable. Cette interprétation a légèrement évolué durant la campagne 2011-2012, au cours de laquelle un grand nombre d'animaux ayant obtenu un résultat d'IDC grand douteux ont été soumis à l'IFN quelle que soit la nature du contexte.

- en cas de résultat positif à l'IFN, les animaux concernés étaient soumis à un abattage diagnostique ;
- si le résultat d'IFN était douteux : soit les animaux concernés étaient soumis à un abattage diagnostique, soit le cheptel était maintenu sous limitation de mouvements et un re-contrôle par IDC était effectué 2 mois plus tard ;
- en cas de résultat négatif à l'IFN, la suspicion était levée.

L'IFN était également utilisé en parallèle à l'IDC dans les troupeaux en abattage partiel, avec élimination systématique des animaux ayant obtenu un résultat positif à l'un ou l'autre des deux tests.

¹ Résultat « petit douteux » : DB compris entre 2 et 4 mm et DB-DA compris entre 1 et 4 mm

² Résultat « grand douteux » : DB supérieur à 4 mm et DB-DA compris entre 1 et 4 mm

3.1.2 Etude conduite dans le département de Dordogne

❖ Origine et modalités de collecte des données

L'étude conduite en Dordogne reposait principalement sur les résultats des opérations de lutte contre la tuberculose bovine en Dordogne menées entre 2009 et 2012. La saisie des données a été effectuée à l'aide d'une base construite sur le modèle de celle utilisée en Côte d'Or.


❖ Zonage

Depuis 2007, un zonage a été mis en place par arrêté préfectoral. La zone « à risque » regroupe les cantons dans lesquels sont localisés la majorité des foyers ([Annexe 21](#)).

❖ Tests étudiés

Au cours des campagnes de prophylaxie 2009 à 2012, deux types de tests étaient très majoritairement utilisés en Dordogne :

- l'intradermotuberculation simple (IDS) ;
- le dosage de l'interféron gamma, réalisé à l'aide de deux types d'antigènes : le kit Bovigam® (Prionics, Suisse) et un « cocktail » de deux peptides recombinants (ESAT-6 et CFP-10 ; appelés « Recombinants » dans la suite du texte). Les résultats des tests Bovigam® et Recombinants étaient interprétés de la même manière qu'en Côte d'Or pour donner un résultat d'interféron « global » ([Tableau 19](#)).

 Remarque : La période d'étude de l'IFN en Dordogne s'étend de 2009 à 2011. Les raisons de ce choix sont exposées dans le paragraphe 3.2. Quelques nuances ont été introduites dans le protocole utilisé au cours de la campagne 2011-2012 et dans les seuils de positivité du test IFN. Elles ne seront pas détaillées dans ce manuscrit.

Les seuils de positivité (normalisés) utilisés par le laboratoire vétérinaire départemental de Dordogne de 2009 à 2011 étaient de 0,05 pour le Bovigam® et de 0.03 pour les Recombinants.

L'arbre décisionnel utilisé en Dordogne pour la lutte contre la tuberculose bovine au cours de la période d'étude est présenté en [Annexe 22](#). Durant cette période, le test de l'IFN était réalisé systématiquement sur les animaux présentant un résultat d'IDS non négatif :

- un résultat d'IFN négatif conduisait à la levée de la suspicion ;

- en cas de résultat d'IFN positif ou divergent (avec résultat positif en Recombinants), la suspicion était maintenue et les animaux réagissants étaient soumis à un abattage diagnostique ;
- en cas de résultat d'IFN divergent (avec résultat positif en Bovigam®), le cheptel était soumis à une analyse du contexte épidémiologique par la DDCSPP24 afin de statuer sur la suite de la procédure (levée de la suspicion ou re-contrôle).

En plus de ce protocole, certains cheptels étaient placés sous suivi renforcé (anciens foyers, cheptels en lien épidémiologique avec un foyer...) et soumis à un dépistage annuel à l'aide d'une IDS et d'un IFN réalisés en parallèle chez tous les animaux.

3.1.3 Etude conduite dans la région de la Camargue


En complément aux études conduites en Côte d'Or et en Dordogne, les données collectées entre septembre 2009 et mars 2012 au cours des opérations de prophylaxie de la tuberculose bovine dans chacun des trois départements de Camargue (Bouches-du-Rhône, Gard, Hérault) ont été analysées. Dans ces trois départements, le dosage de l'IFN (au moyen du kit Bovigam®) était utilisé annuellement en prophylaxie de manière systématique sur tous les bovins âgés de plus de 24 mois à la place de l'intradermotuberculination. Cette dernière n'est plus utilisée en « routine » en raison des caractéristiques propres à la production bovine dans cette région (manades très étendues, contention des animaux difficile à mettre en œuvre, animaux élevés pour le combat...) qui compliquent la réalisation et l'interprétation de l'intradermotuberculination.

Le seuil de positivité (normalisé) utilisé par le laboratoire vétérinaire départemental de l'Hérault pour l'interprétation des résultats de Bovigam® était de 0,04.

3.2 Estimation directe des caractéristiques des tests utilisés en prophylaxie pour le dépistage de la tuberculose bovine par rapport à une référence disponible

Les tests de dépistage de la tuberculose bovine étudiés étaient les suivants :

- l'intradermotuberculination simple (IDS)
- l'intradermotuberculination comparative (IDC)
- le dosage de l'interféron gamma (IFN) : kit Bovigam®, antigènes recombinants (ESAT-6 seul ou « cocktail » associant ESAT-6 et CFP-10) et interprétation en parallèle des résultats obtenus avec ces deux types d'antigènes, telle qu'elle est présentée dans le [Tableau 19](#).

 **ATTENTION :** En Côte d'Or et en Dordogne, étant donné les conditions d'utilisation de l'IFN, tous les tests IFN ont été réalisés dans des troupeaux ayant fait l'objet d'une suspicion suite à l'observation de résultats non négatifs en intradermotuberculation. **Les spécificités de l'IFN calculées dans ces deux départements étaient donc conditionnelles à l'existence de réactions non négatives en ID dans le troupeau.**

En raison des différences fondamentales existant entre les contextes épidémiologiques, les profils des bovins testés, les modalités de réalisation des tests et les règles d'interprétation des séquences de tests dans ces trois zones géographiques, les analyses ont été conduites séparément pour la Côte d'Or, la Dordogne et la Camargue.

 **Remarques :**

- lorsqu'un petit nombre de résultats individuels chez des animaux infectés (calcul de la sensibilité) ou indemnes (calcul de la spécificité) étaient disponibles, un seul animal a été tiré au sort par troupeau afin de préserver l'indépendance des individus. Ce tirage au sort n'a pas été effectué lorsque les échantillons étaient de grande taille (dizaines de milliers d'animaux) ;
- l'estimation directe des caractéristiques des tests de dépistage de la tuberculose bovine en Dordogne a été réalisée par Mlle Jennifer Dhé, dans le cadre d'un CRD ENVA / ANSES, sous mon encadrement.

3.2.1.1 Sensibilité des tests


Dans chaque zone géographique, la sensibilité individuelle des tests a été étudiée dans une population d'animaux pour lesquels *M. bovis* a été isolé au Laboratoire National de Référence Tuberculose¹. La sensibilité troupeau des tests a été étudiée dans les troupeaux dans lesquels *M. bovis* a été isolé par le LNR sur au moins un animal du troupeau et dont les résultats aux tests étaient disponibles dans une fenêtre chronologique correspondant à la date de l'APDI \pm 2 mois (notion de « foyer en cours » dans la suite du texte). Les troupeaux étudiés étaient de taille² similaire.

Deux types de sensibilités ont été définis :

¹ LNR Tuberculose, Laboratoire de Santé Animale, ANSES, Maisons-Alfort

² Nombre d'animaux du troupeau


- la « **sensibilité brute** » pour le calcul de laquelle seuls les résultats positifs ont été retenus (les résultats douteux assimilés à des résultats négatifs) ;
- la « **sensibilité UE** » pour le calcul de laquelle les critères de l'Union Européenne ont été retenus (résultats douteux assimilés à des résultats positifs).

 Remarques :

- dans certains départements, le nombre de résultats disponibles individuellement à un test était plus faible que le nombre de résultats collectifs disponibles pour ce même test, en raison de la présence de résultats incomplets et d'**individus infectés pour lesquels les résultats individuels n'étaient pas disponibles** (découvertes fortuites d'abattoir notamment) ;
- le test réalisé en première intention **en Côte d'Or** était l'IDC, à l'exception de quelques animaux (contrôle lors de vente). Pour certains animaux, les mesures de pli de peau suite à l'injection de tuberculine bovine d'une part et de tuberculine aviaire d'autre part étaient disponibles : **les résultats d'IDS ont alors pu être déduits des résultats d'IDC** ;
- en **Camargue**, les intradermotuberculinations ne sont plus utilisées en routine et **seuls les résultats d'IFN** étaient saisis dans les bases de données.

3.2.1.2 Spécificité des tests

Dans chacune des trois zones géographiques, la spécificité individuelle des tests a été étudiée chez des animaux provenant d'élevages indemnes de tuberculose bovine, situés dans des zones à faible risque épidémiologique de tuberculose bovine, dans lesquels aucun foyer n'a été mis en évidence au cours de la période d'étude (en Camargue), depuis 2004 (en Côte d'Or) ou depuis 2000 (en Dordogne) et n'ayant pas été en lien épidémiologique avec un foyer de tuberculose au cours de la période d'étude. La spécificité collective (« spécificité troupeau ») des tests a été étudiée à partir de ces mêmes troupeaux.

 Remarque : En Dordogne et en Côte d'Or, les résultats de prophylaxie (IDS et IDC) étaient saisis collectivement sans qu'il soit possible d'identifier individuellement les bovins concernés. Or, chaque bovin du département a subi un test annuel, ce qui signifie que la base globale contenait au minimum un résultat par campagne étudiée pour un même bovin. Pour limiter le biais dû au défaut d'indépendance des résultats, les spécificités ont été calculées campagne par campagne. Le problème ne se posait pas pour l'IFN, dont les résultats étaient traités et saisis individuellement.

3.3 Estimation des seuils de positivité optimaux pour le test de dosage de l'Interféron gamma en Côte d'Or et en Camargue

Une courbe ROC a été construite pour chaque type d'antigène utilisé : Bovigam® (en Côte d'Or et en Camargue) et ESAT-6 (en Côte d'Or), afin de proposer un seuil de positivité permettant d'optimiser à la fois la sensibilité et la spécificité du test. Les résultats des tests ont été exprimés à l'aide de la formule dite « normalisée » (Faye *et al.*, 2008) afin de limiter les variations de résultats liées aux différents lots de kit utilisés (*cf.* Annexe 18). Les calculs ont été effectués à l'aide du package DiagnosisMed du logiciel R.

En Côte d'Or, les données chiffrées nécessaires à la construction de ces courbes étaient complètes pour 19 bovins infectés (9 résultats en Bovigam® et 19 résultats en ESAT-6) et 40 bovins indemnes (en Bovigam® et en ESAT-6). En Camargue, les données nécessaires à la construction des courbes étaient disponibles pour 31 bovins infectés et 73 bovins indemnes.



Remarque : Les données nécessaires à la construction de courbes ROC n'étaient pas disponibles dans la base de données de Dordogne.

3.4 Estimation du risque d'erreur par défaut lié à l'application des protocoles utilisant l'IFN en Côte d'Or et Dordogne et comparaison au risque d'erreur par défaut lié à l'application de la directive européenne CE/64/432

Le dernier volet de cette étude consistait en l'estimation du risque d'erreur par défaut (c'est-à-dire le risque de non détection d'un animal infecté de tuberculose) engendré par l'application du protocole utilisé en Côte d'Or entre 2009 et 2012 comparé au risque d'erreur par défaut lié à l'application de la directive européenne CE/64/432. Le protocole décisionnel prévu par cette directive est présenté en Annexe 23.

Le protocole utilisé en Côte d'Or prévoyait la réalisation d'un IFN chez les animaux ayant présenté des résultats douteux en IDC. Le schéma appliqué en Dordogne prévoyait la réalisation d'un dosage de l'IFN chez les animaux ayant présenté des résultats douteux en IDS. La directive CE/64/432, quant à elle, prévoit l'utilisation exclusive de l'intradermotuberculination avec réalisation d'une IDC sur les animaux ayant présenté des résultats non négatifs en IDS.

Dans une approche simplifiée, nous avons considéré que ces trois protocoles correspondaient à l'utilisation des tests en série (règle d'interprétation « ET »). Les tests étudiés (IDS, IDC et dosage de l'IFN gamma) étant basés sur le même principe biologique (c'est-à-dire la détection d'une réaction allergique, *in vivo* et *in vitro* respectivement), ils ont été considérés comme non indépendants (Enøe

et al., 2000). La sensibilité (SeSERIE) de l'association en série de tests liés par une relation de dépendance conditionnelle en fonction de leurs sensibilités respectives (Se₁ et Se₂) et de la covariance de leurs sensibilités (γ Se) est définie comme suit :

$$\text{SeSERIE} = \text{Se}_1 * \text{Se}_2 + \gamma\text{Se}$$


Le risque d'erreur par défaut de cette association est : $\beta = 1 - \text{SeSERIE}$.


Les estimations directes de sensibilités et de spécificités des tests (cf. première partie de cette étude) reposaient sur un faible nombre d'individus, appartenant à des populations très particulières (animaux sur lesquels *M. bovis* avait été isolée et animaux provenant d'élevages à bas risque de tuberculose), non représentatives de l'ensemble de la population bovine soumise au test IFN. D'autre part, l'estimation des sensibilités et des risques d'erreur par défaut des associations de tests nécessitait de disposer d'informations concernant la covariance des sensibilités des tests.

Des résultats croisés en IFN et en ID étaient disponibles pour un grand nombre d'individus provenant d'élevages de statuts épidémiologiques variés mais dont le statut infectieux individuel était inconnu. Dans une seconde approche, nous avons donc estimé les sensibilités et les spécificités des trois tests étudiés et leurs covariances à l'aide d'un modèle à classe latente.

En Côte d'Or, cette étude a été conduite dans une population de 2879 animaux pour lesquels les résultats croisés à deux ou trois de ces tests (IDS, IDC, IFN) étaient disponibles (dont 2871 animaux dont on disposait des résultats en IFN et en IDC, 1788 en IFN et en IDS et 1787 en IDC et en IDS).

En Dordogne, une analyse similaire a été effectuée dans une population de 1500 animaux pour lesquels on disposait de résultats croisés en IDS et en IFN. Les résultats croisés d'IDS et d'IDC n'étaient disponibles que pour 12 bovins et n'ont, par conséquent, pas été analysés.

 **Remarque** : Les résultats douteux ou divergents aux tests ont été interprétés comme que le prévoyaient les schémas décisionnels utilisés sur le terrain et selon les exigences de la réglementation européenne : ils ont donc été assimilés à des résultats positifs (sensibilités « UE »).

 **ATTENTION** : La majorité des animaux de la population étudiée, pour lesquels des résultats individuels étaient disponibles, avaient été soumis à un test IFN suite à une intradermotuberculination non négative. Cette approche ne nous a donc pas permis d'estimer la spécificité des intradermotuberculinations.

Le modèle choisi permettait l'estimation des caractéristiques de deux tests liés par une relation de dépendance conditionnelle, dans une population (Gardner *et al.*, 2000 ; Dendukuri *et al.*, 2001 ; Georgiadis *et al.*, 2003 ; Branscum *et al.*, 2005). Il est décrit dans le Chapitre III, Paragraphe 3.4.1 de ce manuscrit. Le nombre de paramètres à estimer par le modèle excédait le nombre de degrés de liberté permis par les données : une approche bayésienne a donc été utilisée pour l'estimation des caractéristiques des tests.

Les tests étudiés avaient déjà fait l'objet de plusieurs études publiées dans la littérature, récapitulées par De la Rua-Domenech *et al.* en 2006 (Tableau 20).

Tableau 20 : Valeurs de sensibilité et de spécificité disponibles dans la littérature* pour les trois tests étudiés (Intervalles de confiance à 95%)

	Sensibilité	Spécificité
IDS	83,9% [63,2% ; 100%]	96,8% [75,5% ; 99,0%]
IDC	80% [52,0% ; 100%]	98,8% [78,8% ; 100%]
IFN	87,6% [73% ; 100%]	96,6% [85,0% ; 99,6%]

* De la Rua-Domenech *et al.* (2006)

Dans l'échantillon de Côte d'Or, le nombre d'animaux présentant des résultats positifs en culture était de 41. Le nombre de bovins présentant des résultats positifs en PCR mais négatifs en culture était de 16. On pouvait donc considérer que la prévalence minimale dans l'échantillon étudié était de 0,1% (41 bovins / 2879) et que sa valeur la plus hautement probable était proche de 0,2% (57 bovins / 2879). Dans l'échantillon provenant de Dordogne, le nombre d'animaux présentant des résultats positifs en culture était de 12. On pouvait donc considérer que la prévalence minimale dans l'échantillon étudié était de 0,1% (12 bovins / 1500). Les résultats de PCR étaient incomplets et n'apportaient pas d'information complémentaire.

Compte tenu de ces informations, les paramètres a et b des distributions *a priori* des sensibilités et des spécificités des tests, de leurs covariances ainsi que de la prévalence dans les échantillons ont été déterminés selon la méthode présentée précédemment (Chapitre I – Paragraphe 4.5) et sont présentés dans le Tableau 21. En Dordogne, des distributions identiques à celles définies en Côte d'Or ont été utilisées.

Tableau 21 : Paramètres des distributions beta (α, b) a priori

Test	Paramètre	Médiane	Limite inférieure (95%)	Paramètres des distributions beta (α, b)	
				a	b
IDS	Se ¹	83,9%	63,2%	9,4	1,79
	Sp ²	96,8%	75,5%	0,10	0,001
IDC	Se	80,0%	52,0%	5,73	1,43
	Sp	98,8%	78,8%	1,59	0,05
IFN	Se	87,6%	73,0%	21,11	2,88
	Sp	96,6%	85,0%	6,87	0,21
Prévalence		0,2%	0,1%	15,66	767,34
γ Se ³ (Pour les 3 paires de tests)		Inconnues	Inconnues	1	1
γ Sp ⁴ (Pour les 3 paires de tests)		Inconnues	Inconnues	1	1

¹Se : Sensibilité ; ²Sp : Spécificité ; ³ γ Se : Covariance des sensibilités ; ⁴ γ Sp : Covariance des spécificités

L'implémentation a été réalisée par des algorithmes MCMC (Markov Chain Monte Carlo) utilisant l'échantillonneur de Gibbs. Les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel WinBUGS (Lunn *et al.*, 2000). 51 000 itérations ont été lancées (dont une phase de « burn-in » de 1000 itérations). Une analyse de sensibilité a également été conduite en utilisant des distributions *a priori* de plus en plus diffuses afin de vérifier que l'estimation des paramètres d'intérêt n'était influencée que de manière mineure par ces variations.



Remarque : Les méthodes utilisées sont identiques à celles présentées dans le chapitre III et ne seront par conséquent pas détaillées ici.

Les paramètres estimés ont ensuite été utilisés pour calculer les sensibilités et les risques d'erreurs par défaut associés aux séquences de tests appliquées en Côte d'Or et en Dordogne d'une part et celles recommandées par la réglementation européenne d'autre part.



Remarque : Dans un souci de simplification des arbres décisionnels appliqués en Côte d'Or et Dordogne, nous avons considéré que les bovins présentant des résultats douteux ou positifs en ID étaient soumis à un second test (interprétation en série). En pratique, sur le terrain, ces animaux

étaient le plus souvent soumis à un abattage diagnostique. Cette approche surestime donc les risques d'erreurs par défaut des protocoles utilisant l'IFN par rapport à leurs valeurs réelles.

4 Résultats

4.1 Estimation directe des caractéristiques intrinsèques des tests de dépistage de la tuberculose bovine

4.1.1 Résultats obtenus dans le département de Côte d'Or

Les résultats de sensibilité et de spécificité obtenus en Côte d'Or par estimation directe sont récapitulés dans le [Tableau 22](#) et le [Tableau 23](#), respectivement.

Les sensibilités individuelles et collectives des trois types de tests n'étaient pas significativement différentes à l'exception de l'IDC, dont la sensibilité individuelle était supérieure à celle du Bovigam® lorsque ses résultats étaient interprétés conformément à la réglementation européenne ($p < 0,05$).

Le test le plus spécifique à l'échelle individuelle était l'IDC ($p < 0,05$). Les spécificités individuelle et collective du test Bovigam® étaient les plus faibles ($p < 0,05$), engendrant une faible spécificité de l'IFN global ($Sp_{INDIVIDUELLE\ BOVIGAM} = 59,5\% [53,4\% ; 64,6\%]_{IC95\%}$ et $Sp_{TROUPEAU\ BOVIGAM} = 57,0\% [49,1\% ; 64,9\%]_{IC95\%}$). A l'échelle collective en revanche, les spécificités des ID et du Bovigam® étaient basses et le test le plus spécifique était l'ESAT-6 ($Sp_{TROUPEAU\ ESAT-6} = 88,3\% [83,2\% ; 93,4\%]_{IC95\%}$). On observe une baisse de la spécificité de l'IDC au cours des trois campagnes et une augmentation corrélée de la spécificité de l'IDS sur cette même période.

Tableau 22 : Résultats de sensibilité obtenus par estimation directe en Côte d'Or

(Valeurs moyennes et intervalles de confiance à 95%)

TEST	Sensibilité individuelle (Se_I)			Sensibilité troupeau (Se_T)		
	n^1	Se_I Brute	Se_I UE	n'^2	Se_T Brute	Se_T UE
ID	IDC	45 64% [50% ; 78%]	98% [93% ; 100%]	45	80% [68% ; 92%]	98% [93% ; 100%]
	IDS	23 70% [51% ; 88%]	87% [73% ; 100%]	33	72% [58% ; 88%]	93% [86% ; 100%]
IFN	Bovigam®	23 65% [46% ; 85%]		28	93% [83% ; 100%]	
	ESAT-6	22 82% [66% ; 98%]		28	96% [90% ; 100%]	
	Global	22 55% [34% ; 75%]	91% [79% ; 100%]	28	96% [90% ; 100%]	

¹n : nombre d'animaux infectés ; ²n' : nombre de troupeaux foyers


Tableau 23 : Résultats de spécificité obtenus par estimation directe en Côte d'Or

(Valeurs moyennes et intervalles de confiance à 95%)

TEST (et campagne)	Spécificité individuelle (Sp_I)		Spécificité troupeau (Sp_T)	
	n^1	Sp_I	n'^2	Sp_T
IDC	2009-2010	63 017 98,77% [98,68% ; 98,86%]	722	77,70% [74,67% ; 80,74%]
	2010-2011	62 640 98,57% [98,48% ; 98,66%]	724	58,3% [54,7% ; 61,9%]
	2011-2012	19 722 97,81% [97,61% ; 98,01%]	231	41,99% [35,63 ; 48,35%]
IDS	2009-2010	63 017 96,74% [96,60% ; 96,88%]	722	46,54% [42,90% ; 50,18%]
	2010-2011	62 640 96,32% [96,17% ; 96,47%]	724	56,8% [53,2% ; 60,4%]
	2011-2012	19 722 96,30% [96,04% ; 96,56%]	231	62,77% [56,36% ; 69,00%]
IFN	Bovigam®	353 59,5% [53,4% ; 64,6%]	151	57,0% [49,1% ; 64,9%]
	ESAT-6	360 90,0% [86,9% ; 93,1%]	154	88,3% [83,2% ; 93,4%]
	Global	352 56,8% [51,6% ; 62,0%]	148	53,4% [45,3% ; 61,4%]

¹n : nombre d'animaux indemnes ; ²n' : nombre de troupeaux indemnes

4.1.2 Résultats obtenus dans le département de Dordogne

 **Rappel** : L'estimation directe des caractéristiques des tests de dépistage de la tuberculose bovine dans le département de Dordogne a été réalisée par Mlle Jennifer Dhé, dans le cadre d'un CRD ENVA/ANSES, sous mon encadrement.

Les résultats de sensibilité et de spécificité obtenus en Dordogne sont récapitulés dans le [Tableau 24](#) et le [Tableau 25](#), respectivement. Les sensibilités (individuelles et collectives) des tests étudiés n'étaient pas significativement différentes ($p > 0,05$). A l'échelle individuelle comme à l'échelle collective, les tests IFN (Bovigam[®], Recombinants et global) étaient significativement moins spécifiques que l'IDS ($p < 0,05$).

Tableau 24 : Résultats de sensibilité obtenus par estimation directe en Dordogne
(Valeurs moyennes et intervalles de confiance à 95%)

TEST	Sensibilité individuelle (Se_I)			Sensibilité troupeau (Se_T)		
	n^1	Se_I Brute	Se_I UE	n'^2	Se_T Brute	Se_T UE
ID	IDC	14 93% [79% ; 100%]	100% [78% ; 100%]	17	94% [83% ; 100%]	100% [82% ; 100%]
	IDS	18 92% [76% ; 100%]	100% [78% ; 100%]	20	93% [79% ; 100%]	100% [84% ; 100]
	Bovigam [®]	13 92% [78% ; 100%]		12	94% [82% ; 100%]	
IFN	Recombinants	13 100% [77% ; 100%]		12	100% [76% ; 100%]	
	Global	13 92% [78% ; 100%]	100% [77% ; 100%]	13	81%* [62% ; 100%]	100% [77% ; 100%]

¹n : nombre d'animaux infectés ; ²n' : nombre de troupeaux foyers

* La sensibilité troupeau de l'IFN global est plus faible que la sensibilité individuelle, en raison des résultats divergents de 2 troupeaux infectés dans lesquels aucun résultat d'IFN n'est disponible pour le bovin infecté. Il s'agit soit d'une découverte fortuite en abattoir pour le premier troupeau et d'une découverte au cours de l'abattage total pour le second troupeau.

Tableau 25 : Résultats de spécificité obtenus par estimation directe en Dordogne

(Valeurs moyennes et intervalles de confiance à 95%)

TEST (campagne)	Spécificité individuelle (Sp_I)		Spécificité troupeau (Sp_T)	
	n^1	Sp_I	n'^2	Sp_T
IDC	2011/2012	20 95% [85% ; 100%]	20	95% [85% ; 100%]
	2009/2010	36 252 99,85% [99,81%; 99,89%]	934	98,0% [97,1%; 98,9%]
IDS	2010/2011	35 156 99,68% [99,62%; 99,74%]	919	94,7% [93,2%; 96,1%]
	2011/2012	741 99,7% [99,4%; 100,0%]	33	97% [91%; 100%]
IFN	Bovigam®	66 89% [82% ; 97%]	66	86% [78% ; 95%]
	Recombinant	66 86% [78% ; 95%]	66	84% [74% ; 92%]
	Global	66 79% [69% ; 89%]	66	73% [62% ; 83%]

¹n : nombre d'animaux indemnes ; ²n' : nombre de troupeaux indemnes

4.1.3 Récapitulatif des résultats dans la région Camargue

Les résultats de sensibilité et de spécificité obtenus en Camargue sont récapitulés dans le [Tableau 26](#) et le [Tableau 27](#), respectivement. Les valeurs de sensibilité observées en Camargue étaient proches de celles observées en Dordogne. La spécificité troupeau du test Bovigam® était similaire à celle observée en Côte d'Or.

Tableau 26 : Résultats de sensibilité obtenus par estimation directe en Camargue

(Valeurs moyennes et intervalles de confiance à 95%)

TEST	Sensibilité individuelle (Se_I)			Sensibilité troupeau (Se_T)		
	n^1	Se_I Brute	Se_I UE	n'^2	Se_T Brute	Se_T UE
Kit Bovigam®	21	81 % [64% ; 98%]	100% [85% ; 100%]	17	86 % [71% ; 100%]	100 % [82% ; 100%]

¹n : nombre d'animaux infectés ; ²n' : nombre de troupeaux foyers

Tableau 27 : Résultats de spécificité obtenus par estimation directe en Camargue

(Valeurs moyennes et intervalles de confiance à 95%)

TEST	Spécificité individuelle (Sp_I)		Spécificité troupeau (Sp_T)	
	n^1	Sp_I	n'^2	Sp_T
Kit Bovigam®	9606	98,21% [97,94% ; 98,47%]	179	60,9% [53,8% ; 68,0%]

¹n : nombre d'animaux indemnes ; ²n' : nombre de troupeaux indemnes

4.2 Estimation des seuils de positivité optimaux pour le test de dosage de l'Interféron gamma en Côte d'Or et en Camargue

Deux courbes ROC ont été construites pour le kit Bovigam® (Figure 18), en Côte d'Or et en Camargue (Figure 19). Une courbe ROC a été construite pour le test ESAT-6 (Figure 20) en Côte d'Or.

Le seuil de positivité optimal pour le kit Bovigam® étudié en Côte d'Or correspondait à une DO normalisée de **0,13**. L'aire sous la courbe (AUC) était de 0,928 [0,853 ; 1,000]_{IC95%}. La sensibilité au seuil optimal était de 0,889 [0,565 ; 0,980]_{IC95%} et la spécificité associée était de 0,825 [0,681 ; 0,913]_{IC95%}. **Le seuil de positivité optimal pour le kit Bovigam® étudié en Camargue** correspondait à une DO normalisée de **0,015**. L'aire sous la courbe (AUC) était de 0,960 [0,925 ; 0,996]_{IC95%}. La sensibilité au seuil optimal était de 0,936 [0,793 ; 0,982]_{IC95%} et la spécificité associée était de 0,904 [0,815 ; 0,953]_{IC95%}.

Le seuil de positivité optimal pour l'antigène ESAT-6 étudié en Côte d'Or correspondait à une DO normalisée de **0,01**. L'aire sous la courbe (AUC) était de 0,940 [0,882 ; 0,997]_{IC95%}. La sensibilité au seuil optimal était de 0,947 [0,754 ; 0,991]_{IC95%} et la spécificité associée était de 0,825 [0,681 ; 0,913]_{IC95%}.

Figure 18 : Courbe ROC pour le test Bovigam® étudié en Côte d'Or

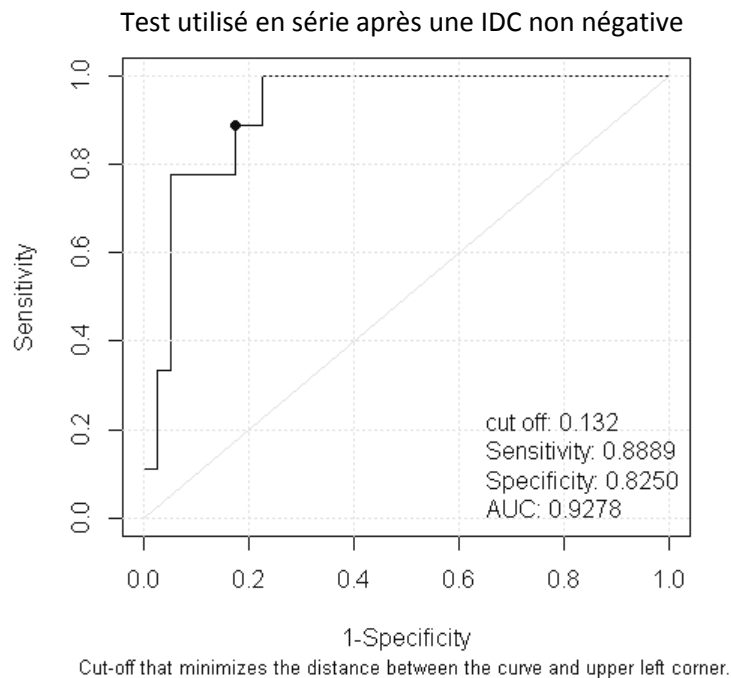


Figure 19 : Courbe ROC pour le test Bovigam® étudié en Camargue

Test utilisé en première intention pour la prophylaxie annuelle dans l'ensemble des troupeaux

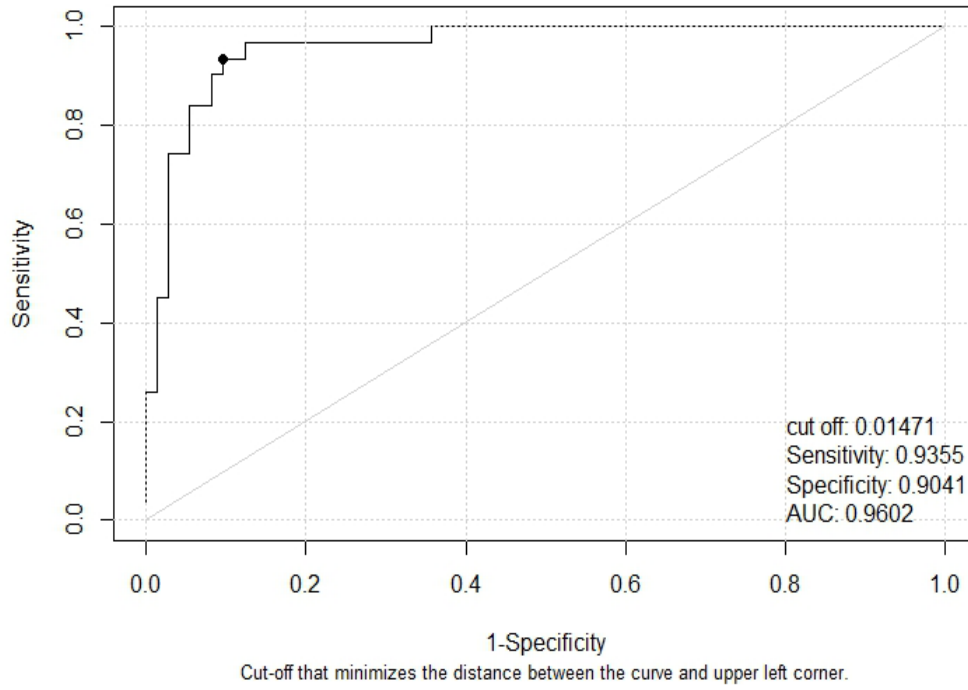
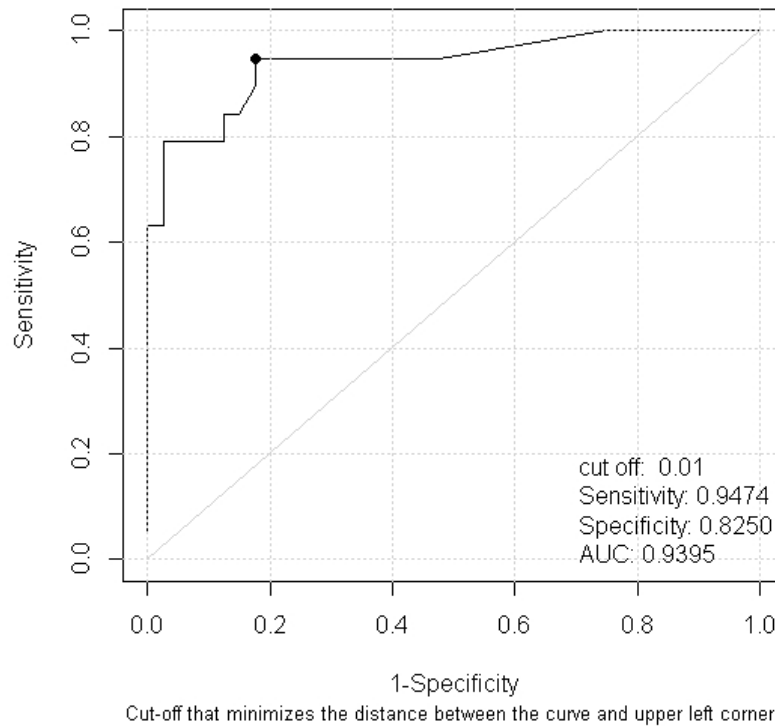


Figure 20 : Courbe ROC pour le test ESAT étudié en Côte d'Or

Test utilisé en série après une IDC non négative



4.3 Estimation du risque d'erreur par défaut engendré par l'utilisation des protocoles expérimentaux français incluant l'IFN et comparaison au risque d'erreur par défaut lié à l'application de la directive européenne CE/64/432

4.3.1 Utilisation de l'IDC et de l'IFN en série (protocole appliqué en Côte d'Or)

4.3.1.1 Résultats croisés aux tests et estimation des sensibilités des tests, de leurs covariances et de la spécificité de l'IFN par une approche bayésienne

Les résultats croisés aux paires de tests dans la population de bovins étudiés en Côte d'Or sont présentés dans le [Tableau 28](#), le [Tableau 29](#) et le [Tableau 30](#). Les estimations de sensibilité et de spécificité individuelles de l'IDS, de l'IDC et de l'IFN « global » et les estimations des covariances de sensibilité et de spécificité pour chaque paire de test, par une approche bayésienne sont présentées dans le [Tableau 31](#).

Les sensibilités des trois tests n'étaient pas significativement différentes ($p > 0,05$). La spécificité de l'IFN était basse ($Sp\ IFN = 62,3\% [60,2\% ; 64,5\%]_{IC95\%}$). Les valeurs de covariances des sensibilités des trois paires de tests étaient faibles à modérées. Leurs intervalles de crédibilité incluait la valeur « 0 ».


 **Remarque** : Les spécificités des ID et les covariances des spécificités ne sont pas présentées dans ce tableau car **la majorité des animaux de la population étudiée, pour lesquels des résultats individuels étaient disponibles, avaient été soumis à un test IFN suite à une intradermotuberculation non négative** (à l'exception des animaux provenant de troupeaux en abattage partiel). Les spécificités estimées de l'IDS et de l'IDC sont donc anormalement faibles, en raison de ce biais de sélection. Elles n'ont pas de signification épidémiologique. L'intégralité des résultats est présentée en [Annexe 24](#).

Tableau 28 : Résultats croisés d'IDC et d'IFN de 2871 animaux de Côte d'Or

IDC	IFN	Nombre d'animaux
Positif	Positif	1046
Négatif	Positif	139
Positif	Négatif	1503
Négatif	Négatif	183
TOTAL		2871

Tableau 29 : Résultats croisés d'IDS et d'IFN de 1788 animaux de Côte d'Or

IDS	IFN	Nombre d'animaux
Positif	Positif	624
Négatif	Positif	27
Positif	Négatif	1063
Négatif	Négatif	74
TOTAL		1788

Tableau 30 : Résultats croisés d'IDS et d'IDC de 1787 animaux de Côte d'Or

IDS	IDC	Nombre d'animaux
Positif	Positif	1499
Négatif	Positif	187
Positif	Négatif	19
Négatif	Négatif	82
TOTAL		1787

Tableau 31 : Estimation des sensibilités de l'IDS, de l'IDC et de l'IFN gamma, de leurs covariances et de la spécificité de l'IFN par une approche bayésienne : étude en Côte d'Or

Test	Paramètre	Moyenne	Bornes de l'intervalle de crédibilité à 95%	
IDC	Se ¹	0,803	0,616	0,980
IDS	Se	0,842	0,590	0,982
IFN	Se	0,881	0,728	0,975
	Sp ²	0,623	0,602	0,645
IDC et IDS	γ Se ³	0,025	-0,048	0,122
IDC et IFN	γ Se	0,023	-0,038	0,105
IDS et IFN	γ Se	0,026	-0,025	0,105

¹Se : Sensibilité ; ²Sp : Spécificité ; ³ γ Se : Covariance des sensibilités

4.3.1.2 Estimation des caractéristiques de l'association en série IDC – IFN d'une part et IDS – IDC d'autre part

La sensibilité et le risque d'erreur par défaut de chaque protocole (séquence de tests utilisée en Côte d'Or vs. séquence de tests recommandée par la réglementation européenne) ont été déduits des estimations de sensibilités et de covariances de sensibilité présentées *ci-dessus*. Les résultats figurent dans le [Tableau 32](#). Dans le cas du protocole utilisé en Côte d'Or (IDC et IFN associés en

série), la probabilité d'erreur de détection par défaut était de 26,9% [0,0% ; 58,9%]_{IC95%}. L'application du protocole prévu par la directive CE/64/432 (IDS et IDC associées en série) engendrait un risque d'erreur par défaut de 29,9% [0,0% ; 68.5%]_{IC95%}.

Tableau 32 : Sensibilités et risques d'erreur par défaut comparés des deux schémas décisionnels étudiés (étude du protocole appliqué en Côte d'Or)

Protocole	Sensibilité	Risque d'erreur par défaut
Côte d'Or (IDC – IFN)	73,1% [41,1% ; 100,0%]	26,9% [0,0% ; 58,9%]
UE (IDS – IDC)	70,1% [31,5% ; 100,0%]	29,9% [0,0% ; 68.5%]

4.3.2 Utilisation de l'IDS et de l'IFN en série (protocole appliqué en Dordogne)

4.3.2.1 Résultats croisés aux tests et estimation des sensibilités des tests, de leurs covariances et de la spécificité de l'IFN

Les résultats croisés aux deux tests (IDS et IFN « global ») dans la population de bovins étudiés en Dordogne sont présentés dans le [Tableau 33](#). Les estimations de sensibilité individuelle de l'IDS et de l'IFN « global » et la covariance des sensibilités des tests, réalisées à partir des résultats croisés disponibles en Dordogne sont présentées dans le [Tableau 34](#).

De même que précédemment, les valeurs de sensibilité de l'IDS et de l'IFN n'étaient pas significativement différentes ($p > 0,05$). La spécificité de l'IFN était basse ($Sp_{IFN} = 60,8\% [58,2\% ; 63,3\%]_{IC\ 95\%}$). La covariance des sensibilités de l'IDS et de l'IFN était faible et son intervalle de crédibilité incluait la valeur « 0 ».


 **Remarque** : La spécificité de l'IDS et la covariance des spécificités de l'IDS et de l'IFN ne sont pas présentées dans ce tableau en raison du fait que **la majorité des animaux de la population étudiée, pour lesquels des résultats individuels étaient disponibles, avaient été soumis à un test IFN suite à une intradermotuberculination non négative** (à l'exception des animaux provenant de cheptels sous suivi renforcé). La spécificité estimée de l'IDS est donc anormalement faible, en raison de ce biais de sélection. Elle n'a pas de signification épidémiologique. L'intégralité des résultats est présentée en [Annexe 25](#).

Tableau 33 : Résultats croisés d'IDS et d'IFN de 1500 animaux de Dordogne

(Interprétation « UE » : résultats douteux et divergents considérés comme positifs)

IDS	IFN	Nombre d'animaux
Positif	Positif	345
Positif	Négatif	757
Négatif	Positif	257
Négatif	Négatif	141
TOTAL		1500

Tableau 34 : Estimation des sensibilités de l'IDS et de l'IFN gamma, de leur covariance et de la spécificité de l'IFN par une approche bayésienne : étude en Dordogne

Test	Paramètre	Moyenne	Bornes de l'intervalle de crédibilité à 95% (ICr 95%)	
IDS	Se ¹	0,882	0,758	0,975
	Se	0,842	0,589	0,981
IFN	Sp ²	0,608	0,582	0,633
	γ Se ³	0,026	-0,026	0,104

¹Se : Sensibilité ; ²Sp : Spécificité ; ³ γ Se : Covariance des sensibilités

Remarque : En raison de l'utilisation très majoritaire de l'IDS en Dordogne, le nombre de résultats croisés en IDS et IDC disponibles était très faible (12 animaux). Ces données n'ont pas été utilisées, et le risque d'erreur engendré par le protocole prévu par la réglementation européenne en Dordogne n'a donc pas pu être estimé.

4.3.2.2 Evaluation des caractéristiques de l'association en série IDS – IFN

La sensibilité et le risque d'erreur par défaut du protocole appliqué en Dordogne ont été déduits des estimations *ci-dessus*. Les résultats sont présentés dans le [Tableau 35](#).

Tableau 35 : Sensibilité et risque d'erreur par défaut liés à l'utilisation du protocole appliqué en Dordogne

Protocole	Sensibilité	Risque d'erreur par défaut
Dordogne (IDS – IFN)	76,8% (42,1% ; 100,0%)	23,2% [0,0% ; 58,0%]

La sensibilité et le risque d'erreur par défaut du protocole appliqué en Dordogne (IDS et IFN gamma associés en série) ont été déduits des estimations *ci-dessus*. La probabilité d'erreur de détection par défaut était de 23,2% [0,0% ; 58,0%]_{IC95%}.

5 Discussion

5.1 Estimation directe des caractéristiques des tests de dépistage de la tuberculose bovine

La première partie de cette étude avait pour but de réaliser une estimation directe des sensibilités et des spécificités du dosage de l'IFN dans ses conditions d'utilisation de terrain et de les comparer à celles des tests habituels (intradermotuberculinations simple et comparative). Ces estimations ont été faites en utilisant comme référence positive l'isolement de *M. bovis* au LNR (après abattage) et comme référence négative l'appartenance à un cheptel indemne depuis plusieurs années et ne présentant pas de risque épidémiologique particulier vis-à-vis de la tuberculose bovine. L'isolement de *M. bovis* en culture a été choisi en tant que référence positive en raison de sa spécificité parfaite (absence de résultats faussement positifs), mais elle présente l'inconvénient de ne pas avoir une sensibilité parfaite. Par ailleurs, les animaux présentant des résultats positifs en culture constituent probablement une population particulière dans laquelle la maladie a évolué suffisamment longtemps pour que les bacilles tuberculeux soient retrouvés dans les nœuds lymphatiques ou pour avoir engendré des lésions. Ces deux points engendrent un biais de sélection des animaux infectés et un biais dans l'estimation des caractéristiques des tests.

Pour chacune de ces estimations, **les calculs ont été effectués à partir d'un nombre très limité d'animaux**, ce qui engendre à la fois une piètre précision des résultats obtenus et une faible puissance statistique. Par ailleurs, **les tests sont utilisés dans des contextes très particuliers** (usage en série, difficultés de contrôle des foyers de tuberculose, fréquence des mycobactéries atypiques en Côte d'Or, bovins de combat en Camargue...). **Avant de procéder à toute interprétation de ces résultats, il est indispensable de garder à l'esprit ces deux points.**

En Côte d'Or, la sensibilité et la spécificité individuelles du test ESAT-6 étaient particulièrement satisfaisantes comparées à celles du Bovigam®. La sensibilité individuelle brute de l'IFN global¹ était faible mais sa sensibilité individuelle « UE »² était satisfaisante et n'était pas significativement différente de celle de l'IDC ($p > 0,05$). A l'échelle collective, la sensibilité « troupeau » du test Bovigam® n'était pas significativement différente de celle de l'ESAT-6 ($p > 0,05$).

¹ Interprétation en parallèle des résultats au test Bovigam® et à l'ESAT-6

² Résultats douteux assimilés à des résultats positifs, interprétation prévue par la réglementation européenne et appliquée sur le terrain

Les spécificités individuelle et collective de l'IFN global étaient basses, en raison de la faible spécificité du test Bovigam®. Le seul test IFN dont la spécificité (individuelle et collective) était correcte était l'ESAT-6.

Les sensibilités individuelles moyennes du test Bovigam® et de l'IFN global étaient plus élevées en Dordogne qu'en Côte d'Or. Cette observation peut être mise en relation avec l'utilisation d'un seuil de positivité pour le Bovigam® plus bas en Dordogne (0,03% D.O.) qu'en Côte d'Or (0,04% D.O.). Les sensibilités des tests IFN à l'échelle collective étaient similaires dans les deux départements.

Les spécificités individuelles et collectives du test Bovigam® et du test IFN global étaient plus élevées en Dordogne qu'en Côte d'Or ($p < 0,05$). En revanche, le gain de spécificité attendu du fait de l'utilisation du CFP-10 dans le cocktail d'antigènes recombinants en Dordogne, par comparaison avec l'utilisation de l'antigène ESAT-6 seul en Côte d'Or n'a pas pu être mis en évidence. Ces deux points peuvent être dus à l'utilisation d'un seuil de positivité plus élevé pour les Recombinants en Dordogne (0,05% D.O.) qu'en Côte d'Or (0,04% D.O.).

En Camargue enfin, les sensibilités moyennes (individuelles et collectives) du test Bovigam® étaient plus élevées qu'en Côte d'Or et légèrement inférieures à celles observées en Dordogne. Sa spécificité individuelle était élevée mais sa spécificité « troupeau », faible, se rapprochait de celle observée en Côte d'Or.

Seuls les résultats disponibles en Camargue permettaient une estimation non conditionnelle des caractéristiques du dosage de l'IFN, ce qui pose la question de la légitimité d'une comparaison des résultats obtenus dans ces deux contextes différents. En effet, en Côte d'Or et en Dordogne, tous les animaux étudiés provenaient de cheptels dans lesquels des résultats non négatifs en ID avaient été observés, et avaient subi une ID trois jours avant la réalisation du prélèvement de sang pour le dosage de l'IFN. Certaines études ont suggéré que la production d'interféron gamma pouvait être augmentée par l'administration de tuberculine au pli sous-caudal 7 à 59 jours auparavant (Rothel *et al.*, 1992), mais ce phénomène n'a pas pu être mis en évidence dans d'autres études (Doherty *et al.*, 1995 ; Ryan *et al.*, 2000 ; Gormley *et al.*, 2004). Bien qu'à notre connaissance aucune étude n'ait été publiée à ce sujet, il n'est pas exclu que s'il existe une influence de l'administration intradermique de tuberculine sur le résultat de l'IFN, elle ne soit pas strictement identique selon le type et la quantité de tuberculine utilisée (IDS vs. IDC).

Les sensibilités individuelles et collectives, des intradermotuberculinations n'étaient pas significativement différentes en Dordogne et en Côte d'Or ($p > 0,05$).

En Côte d'Or comme en Dordogne, la spécificité individuelle des tests allergiques était satisfaisante. Les spécificités « troupeaux » des intradermotuberculinations étaient significativement plus élevées

en Dordogne qu'en Côte d'Or ($p < 0,05$), en raison de la fréquence des réactions croisées avec des mycobactéries atypiques de l'environnement et de la grande taille des troupeaux de Côte d'Or.

L'étude de l'évolution des spécificités « troupeau » de l'IDS et de l'IDC en Côte d'Or au cours des trois campagnes pose question. L'augmentation de la spécificité collective de l'IDS peut être liée au fait que certains vétérinaires « ferment les yeux » sur un pli de peau légèrement augmenté en tuberculine bovine, en particulier dans les cheptels qui ont été sujets à des résultats faussement positifs les années précédentes. La diminution corrélée de la spécificité collective de l'IDC tendrait à montrer qu'à partir du moment où la réaction à la tuberculine bovine est considérée comme positive par le vétérinaire, la mesure de la réaction à la tuberculine aviaire est réalisée avec soin. De plus, une lecture objective par mensuration du pli de peau est effectuée de manière systématique lors de la réalisation des IDC. En Dordogne au contraire, la lecture des IDS est subjective (lecture « à la main »).

Dans la littérature, le dosage de l'IFN est considéré comme au moins aussi sensible que l'ID, voire plus (Neill *et al.*, 1994 ; Wood et Jones, 2001 ; Pollock *et al.*, 2003), en raison du fait que le dosage de l'IFN détecte les animaux infectés à un stade plus précoce que l'ID (avec un délai entre infection et détection compris entre une et cinq semaines pour l'IFN [Pollock *et al.*, 2003], contre 15 jours à 6 mois, avec une moyenne de 3 à 8 semaines pour l'ID [Francis, 1958]). D'autre part, il a été prouvé que le délai entre l'infection et le moment auquel le dosage de l'IFN est en mesure de la détecter n'est pas dépendant de la dose infectante (Dean *et al.*, 2005). Ces éléments sont intéressants car le dosage de l'IFN serait susceptible de détecter une infection par de faibles doses de *M. bovis* dès ses premiers stades. Il présente toutefois (tout comme l'ID) le désavantage de ne pas détecter les individus en phase d'anergie.

Par ailleurs, il n'existe pas un unique test de dosage de l'interféron gamma mais de multiples modalités techniques utilisables. A l'heure actuelle, seul le kit Bovigam® (Prionics, Suisse) est commercialisé. Une nouvelle version du kit est d'ailleurs en cours d'évaluation, ce qui signifie que les caractéristiques du test tel qu'il sera disponible dans quelques années seront probablement assez différentes de celles du test étudié (Moyen, LVD 24, 2012, *communication personnelle*). Les autres cocktails d'antigènes utilisés (ESAT-6, CFP- 10) sont fabriqués « maison » par les laboratoires et ne sont donc pas identiques d'un laboratoire vétérinaire départemental à l'autre.

La technique d'interprétation à l'aide de la formule normalisée (Faye *et al.*, 2008) et non de la densité optique brute est une spécificité française. Nous avons également évoqué l'existence de variations dans les seuils de positivité d'un laboratoire à l'autre et d'une année sur l'autre.

Ces particularités, ajoutées aux variations classiquement rencontrés dans les études d'évaluation de tests (origine et profil de la population animale étudiée, contexte épidémiologique, laboratoire dans lequel sont réalisés les tests, méthodes d'interprétation des résultats douteux et

modalités des analyses statistiques conduites) engendrent une grande variation des chiffres publiés dans la littérature (De la Rua-Domenech *et al.*, 2006). Ces observations justifient pleinement la mise au point de protocoles adaptés à chaque région et à chaque contexte, et montrent à quel point il serait difficile (et probablement délétère) de proposer un protocole unique pour l'ensemble du territoire.

D'un point de vue pratique, l'utilisation du dosage de l'IFN présente l'avantage de n'imposer qu'une seule contention des animaux testés et de fournir des résultats non dépendants du vétérinaire, contrairement à l'intradermotuberculination qui impose de contenir les animaux deux fois à 72 heures d'intervalle et dont la lecture est dépendante de l'opérateur. Une étude menée actuellement (Bekkara *et al.*, 2012, *résultats non publiés*) montre qu'il existe un fort effet « opérateur » (vétérinaire) sur la qualité de réalisation des intradermotuberculinations et le respect des règles imposant la déclaration de résultats non négatifs. Au contraire, la réalisation de l'IFN est standardisée et ses résultats ne sont donc pas soumis à la subjectivité du vétérinaire. En considérant certains cas extrêmes relatés par les services vétérinaires départementaux, l'utilisation de l'IFN évite également que le vétérinaire ne subisse de pression de la part d'un éleveur souhaitant éviter la déclaration de résultats non négatifs en ID et le blocage de son exploitation qui en résulterait. De plus, l'enregistrement des résultats individuels d'IFN par le laboratoire améliore la traçabilité et l'archivage.

Parmi les inconvénients inhérents à l'utilisation de l'IFN, citons la nécessité d'un transport des prélèvements sanguins au laboratoire dans un délai de 4 à 6 heures suivant le prélèvement. Les conditions de conservation de l'échantillon peuvent influencer sur le résultat du test (Rothel *et al.*, 1990 ; Waters *et al.*, 2007) et le coût de ce test qui s'élève à 40 à 60 euros par animal (Boschiroli, LNR Tuberculose, 2012, *communication personnelle*). Dans certains cas, le résultat du test est ininterprétable, ce qui impose de procéder à un nouveau prélèvement de sang.

A titre de comparaison, chez l'Être humain, les tests utilisés pour diagnostiquer une tuberculose latente sont similaires à ceux mis en œuvre dans l'espèce bovine. Deux tests de dosage de l'interféron gamma sont commercialisés (Quantiféron® et Elispot®, Herrmann *et al.*, 2006). Une méta-analyse des informations disponibles dans la littérature (Menzies *et al.*, 2007) aboutit à la conclusion que la sensibilité du test cutané à la tuberculine (test de Mantoux) et des deux IFN étudiés est sous-optimale. La spécificité des IFN est plus marquée que celle du test à la tuberculine chez les sujets vaccinés avec le BCG (ou sensibilisés par d'autres mycobactéries non tuberculeuses). Toutefois, comme chez les bovins, les résultats discordants entre tests cutanés et IFN sont fréquents et inexplicables, avec un nombre important de conversions d'un IFN positif à un IFN négatif. Actuellement, chez l'Être humain, les IFN sont essentiellement utilisés pour le diagnostic de l'infection

tuberculeuse latente autour d'un cas de tuberculose, chez les migrants infectés dans leur pays d'origine ou chez les groupes à risque (L'Hadj *et al.*, 2006).

5.2 Etude des seuils de positivité optimaux pour le dosage de l'interféron gamma

Le second objectif était de proposer un seuil de positivité pour deux antigènes disponibles (Bovigam® et ESAT-6), selon le contexte dans lequel ils sont utilisés. Il apparaît en effet qu'il existe de grandes variations du seuil optimal selon la population considérée et les modalités d'utilisation du test. Il a été montré que la production d'IFN était nettement diminuée chez l'Être humain dans des conditions d'immunodépression telles que la grossesse chez les femmes atteintes du HIV (Jonnalagadda *et al.*, 2012). Chez l'animal, le taux basal d'interféron gamma produit par les lymphocytes est susceptible de varier selon la race bovine considérée : les bovins de combat élevés en Camargue ont un taux d'interféron gamma « basal » inférieur à celui des autres races bovines françaises (Schiller *et al.*, 2010). Par ailleurs, lors de la contention des animaux (et en particulier d'animaux peu manipulés et sensibles au stress, tels les bovins camarguais), il n'est pas exclu que le déclenchement d'un pic de cortisol lié au stress modifie la réponse aux test allergiques (Dondo *et al.*, 1996 ; Schiller *et al.*, 2010), y compris la production d'IFN par les lymphocytes T. Enfin, chez l'Être humain, la quantité d'IFN produite peut varier en fonction du spoligotype de la souche de *Mycobacterium* responsable de l'infection (Rakotosamimanana *et al.*, 2010).

D'après notre étude, en Côte d'Or, le seuil optimal pour le Bovigam® est de 0,1. Ce constat reflète bien les défauts de spécificité du test Bovigam® tel qu'il est utilisé entre 2009 et 2012, avec un seuil d'interprétation de 0,04. Le seuil optimal pour l'ESAT-6 est de 0,01.

En Camargue en revanche, le seuil optimal pour le Bovigam® est de 0,01, reflétant le manque de spécificité du test tel qu'il est utilisé en Camargue.

La comparaison trois courbes ROC montre que leurs allures étaient similaires et que leurs AUC ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$), ce qui suggère une qualité similaire des tests étudiés.

Etant donné le contexte de dépistage en Côte d'Or et en Dordogne (zone infectée), il apparaît opportun de conserver un seuil suffisamment bas pour détecter une majorité de bovins infectés, à quelques nuances près. En Côte d'Or, le test est utilisé en série après l'IDC et les réactions faussement positives en ID, comme en IFN, sont fréquentes : le seuil de positivité choisi ne doit donc toutefois pas être trop bas sous peine d'engendrer le blocage à tort des cheptels. Dans les troupeaux foyers en abattage partiel en revanche, le seuil choisi doit permettre d'optimiser la sensibilité au

détriment de la spécificité (seuil très bas) dans le but d'éradiquer rapidement la maladie, quitte à abattre des animaux dont le résultat est faussement positif. Dans ces foyers, l'utilisation de l'IFN est d'autant plus intéressante que l'utilisation de la tuberculine forte permettant d'augmenter la sensibilité de l'ID (au détriment de sa spécificité) n'est plus possible en raison de l'arrêt de sa production¹.

En Camargue enfin, l'IFN est le seul test utilisé : il constitue la seule « chance » de détecter l'infection et le seuil choisi ne doit pas être trop élevé.

Il est également indispensable de prendre en compte le fait que le dépistage est réalisé à l'échelle collective, ce qui engendre une augmentation de la sensibilité dans les troupeaux infectés. Cette considération doit être tempérée en raison du faible nombre d'individus infectés présents dans les troupeaux foyers : souvent un ou deux bovins sur 200 à 300 bêtes (DPP21, 2012, *communication personnelle*).

5.3 Estimation des caractéristiques des tests par une approche bayésienne

Comme expliqué précédemment (paragraphe 3.4), les estimations directes de sensibilité réalisées dans la première partie de notre étude portent sur un très petit nombre d'individus, provenant d'une population infectée particulière. Afin d'évaluer les sensibilités des tests et leurs covariances dans un échantillon représentatif de la population dans laquelle le test IFN est utilisé sur le terrain (troupeaux ayant obtenu des résultats non négatifs en intradermotuberculination, troupeaux en abattage partiel et troupeaux sous suivi renforcé), une approche bayésienne par un modèle à classe latente incluant des priors informatifs a été utilisée. Ces estimations ont été effectuées à partir d'un nombre important d'animaux dont le statut infectieux individuel n'était pas connu mais pour lesquels des résultats croisés aux trois tests étaient disponibles.

L'IFN et les intradermotuberculinations étant basés sur le même principe biologique, le modèle choisi autorisait donc l'existence d'une dépendance conditionnelle entre les tests (Enøe *et al.*, 2000).

Les sensibilités de l'IFN et des intradermotuberculinations ne différaient pas de manière significative ($p > 0,05$). Les résultats moyens de covariance des sensibilités suggéraient l'existence d'une relation de dépendance faible entre les tests, mais ne permettaient pas d'exclure l'absence de dépendance (inclusion de la valeur 0 dans les intervalles de crédibilité à 95%). La spécificité de l'IFN était proche de celle estimée par la méthode directe. Les spécificités des intradermotuberculinations

¹ Note de service DGAI/SDSPA/N2010-8305 du 8 novembre 2010

n'ont pas été interprétées en raison du fait qu'elles ont été calculées dans une population d'animaux pour lesquels des résultats individuels étaient disponibles, c'est-à-dire des animaux ayant présenté des résultats non négatifs en intradermotuberculation (à l'exception d'un nombre restreint d'animaux provenant de troupeaux en abattage partiel en Côte d'Or ou en suivi renforcé en Dordogne). Elles n'ont donc pas de signification épidémiologique.

La comparaison des résultats obtenus avec ceux de l'estimation directe montre que la sensibilité de l'IFN était probablement surestimée dans les populations infectées avec isolement de *M. bovis* et que sa spécificité était surestimée dans la population indemne de Dordogne. Cette dernière observation n'est pas retrouvée en Côte d'Or, probablement en raison de la présence de mycobactéries atypiques dans l'environnement, dont le nombre peut être très variable d'un élevage à l'autre (DDPP 21, 2012, *communication personnelle*) et qui engendrent des réactions croisées d'intensité variable selon les animaux étudiés.

Deux études récentes ayant pour objet l'estimation des caractéristiques des intradermotuberculinations et du dosage de l'IFN gamma par une approche bayésienne ont été publiées par des équipes de recherche espagnole (Alvarez *et al.*, 2012) et irlandaise (Clegg *et al.*, 2011). Le test IFN étudié était le Bovigam®, avec un seuil de positivité de 0,05 et 0,1 respectivement (exprimé en D.O. brute). Les résultats obtenus dans ces deux études sont résumés dans le [Tableau 36](#).

Tableau 36 : Résultats de deux études récentes portant sur la comparaison des caractéristiques de l'IFN et des intradermotuberculinations par une approche bayésienne

Test	Paramètre	Clegg <i>et al.</i> , 2011	Alvarez <i>et al.</i> , 2012	Praud <i>et al.</i> , 2012	
		Irlande	Espagne	Côte d'Or (France)	Dordogne (France)
IDC ¹	Se ³	65,9% [62,1% ; 69,8%] ⁵		80,3% [61,6% ; 98,0%]	
	Sp ⁴	99,3% [98,9% ; 99,7%]			
IDS ¹	Se		69,4% [40,1% ; 92,2%]	84,2% [59,0% ; 98,2%]	88,2% [75,8% ; 97,5%]
	Sp		99,4% [98,7% ; 99,9%]		
IFN	Se	64,1% [60,8% ; 67,5%]	89,3% [77,5% ; 97,2%]	88,1% [72,8% ; 97,5%]	84,2% [58,9% ; 98,1%]
	Sp	88,7% [87,4% ; 90,0%]	85,7% [74,4% ; 87,6%]	62,3% [60,2% ; 64,5%]	60,8% [58,2% ; 63,3%]

¹ Interprétation « UE » dite « sévère » ; ² Se : Sensibilité ; ³ Sp : Spécificité ; ⁴ Intervalle de crédibilité à 95%

Les sensibilités des intradermotuberculinations estimées dans notre étude n'étaient pas significativement différentes de celles obtenues par Clegg *et al.* (2011) et Alvarez *et al.*, (2012). La sensibilité de l'IFN dans les deux départements français était similaire à celle estimée en Espagne mais supérieure à celle estimée en Irlande. La spécificité de l'IFN en France était inférieure à celle estimée en Irlande et en Espagne.

Ces observations peuvent être expliquées par la nature du test (utilisation du Bovigam® seul en Irlande et en Espagne vs. utilisation du Bovigam® et de recombinants en Dordogne et en Côte d'Or) et par ses modalités d'utilisation. En Espagne et en Irlande, l'IFN est utilisé en parallèle à l'intradermotuberculation, afin d'accélérer l'éradication de la tuberculose bovine dans les foyers. Dans ces deux pays, comme en France (troupeau en abattage partiel ou résultat positif en ID dans un troupeau suspect, conduisant directement à l'abattage diagnostique de l'animal concerné) les animaux « meilleurs répondants » en ID sont donc éliminés immédiatement sans subir d'IFN, quel que soit le contexte du test et ne sont donc pas représentés dans l'échantillon étudié. Il est donc probable que la sensibilité de l'IFN soit sous-estimée.

5.4 Comparaison du risque d'erreur par défaut engendré par l'application des protocoles associant ID et IFN au risque d'erreur par défaut engendré par l'application de la directive européenne CE/64/432

Le dernier objectif de nos travaux était de comparer le risque de ne pas détecter l'infection chez un bovin tuberculeux en appliquant des protocoles associant l'intradermotuberculation et l'IFN en série, au risque encouru en appliquant le protocole prévu par la réglementation européenne qui associe l'IDS et l'IDC en série.

Les sensibilités des associations en série des trois paires de tests ont été estimées à partir des résultats obtenus par approche bayésienne. Les risques d'erreur par défaut engendrés par le protocole IDC – IFN (26,9% [0,0% ; 58,9%]_{IC95%}) et le protocole IDS – IFN (23,2% [0,0% ; 58,0%]_{IC95%}) n'étaient pas significativement différents du risque d'erreur par défaut lié à l'application de la réglementation européenne (29,9% [0,0% ; 68,5%]_{IC95%}) ($p < 0,05$).

Aucun excès de risque lié à l'utilisation des protocoles expérimentaux mis en œuvre en Dordogne et en Côte d'Or, et donc à la commercialisation dans l'Union Européenne de bovins soumis à un dépistage associant l'ID et l'IFN en série, n'a pu être mis en évidence. Etant donné les conditions très particulières d'étude de l'IFN, il importe néanmoins de rester extrêmement précautionneux quant à l'interprétation de ces résultats.



En conclusion, **l'utilisation du test IFN telle qu'elle a été mise en œuvre en France ne semble pas avoir majoré le risque d'erreur par défaut dans la détection des bovins infectés**, et ce d'autant plus que le fait de considérer les schémas décisionnels français comme des associations en série de l'ID et de l'IFN surestime le risque d'erreur par défaut par rapport à la situation de terrain. En effet, dans les conditions pratiques, les animaux ayant obtenu un résultat d'ID positif (et souvent, grand douteux) subissent un abattage diagnostique sans être soumis à un test IFN : ils ne représentent donc pas de danger.

Les résultats de l'estimation des caractéristiques des tests par une approche directe doivent être interprétés avec prudence en raison des faibles effectifs. Ils tendent à confirmer les données de la littérature concernant **l'intérêt d'utiliser des antigènes recombinants en Côte d'Or comme en Dordogne**. L'utilisation du Bovigam® seul (sans recombinants) en Camargue paraît satisfaisante.

Les résultats obtenus par l'approche bayésienne montrent que la **sensibilité de l'IFN « global » est satisfaisante mais que ce test s'avère moins spécifique que l'ID**.

Les limites du test IFN sont à la fois liées à ses caractéristiques diagnostiques et aux contraintes techniques et économiques qu'il engendre. Son utilisation en tant qu'unique test de dépistage devrait par conséquent être réservée à des conditions très particulières, telles que celles rencontrées en Camargue.

Cette étude montre **l'importance de la connaissance du contexte technique et épidémiologique** dans lequel est utilisé un test en cours de validation (seuils de positivité, nature des antigènes, modalités d'interprétation, profil de la population testée, évolution de la maladie dans la population et conditions d'utilisation du test). Elle illustre les **problèmes pratiques inhérents à l'utilisation à des fins de recherche de données collectées sur le terrain**, nécessairement hétérogènes et incomplètes.

Enfin, la réflexion menée à partir des deux approches d'estimation des caractéristiques des tests souligne le **problème lié à la nature des populations étudiées**, qui sont sélectionnées de manière très particulière dans le cas d'une estimation directe par rapport à une référence imparfaite, ce qui limite les possibilités d'extrapolation à la population générale. Au contraire, l'estimation des caractéristiques des tests par un modèle à classe latente implémenté par une approche bayésienne permet à la fois d'étudier un échantillon d'animaux représentatifs de la population dans laquelle le test est appliqué et d'intégrer les résultats obtenus au cours d'études antérieures.

CHAPITRE V : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

1 L'estimation des caractéristiques du test de dépistage : un pré-requis à la conception et à l'évaluation des outils d'aide à la prise de décisions sanitaires

1.1 Bilan des travaux accomplis au cours de la thèse

Comme évoqué précédemment, nous avons choisi, au cours de nos travaux, de nous intéresser à l'estimation de la part d'incertitude liée à l'utilisation de tests en tant qu'outils d'aide à la prise de décision. L'estimation de la sensibilité et de la spécificité des tests est un pré-requis à la conception et à la validation de protocoles décisionnels.

Nous avons vu que ce type d'études peut être appliqué à la conception de stratégies décisionnelles dans différents cas de figure:

- en l'absence de référence concernant le statut individuel d'animaux appartenant à une (ou plusieurs) population dans laquelle (lesquelles) le contexte épidémiologique de la maladie est connu, ou non ;
- en présence d'une référence imparfaite.

Les exemples choisis illustrent la diversité des objectifs des études de caractéristiques de tests : étude exploratoire conduite dans le but de choisir un test de dépistage (brucellose porcine) ou de remplacer un test déjà utilisé (épididymite contagieuse du bélier), conception de protocoles associant plusieurs tests et enfin évaluation d'un protocole déjà existant après plusieurs années d'utilisation sur le terrain (tuberculose bovine).

Ces trois maladies ont été étudiées en raison de leur impact sanitaire en santé publique (tuberculose bovine, brucellose porcine en Polynésie française) et de leur impact économique direct ou indirect. Par ailleurs, ces trois études constituent des travaux originaux n'ayant jusqu'alors pas fait l'objet de publications dans la littérature.

1.2 Sensibilité et spécificité : caractéristiques « intrinsèques » au test ?

Les différents exemples traités au cours de nos travaux montrent que pour un même test, les estimations de sensibilité et de spécificité peuvent être variables d'une étude à l'autre.

De telles variations peuvent être dues aux différences de protocoles d'échantillonnage (Knottnerus et Leffers, 1992; Moons *et al.*, 1997). Les sujets doivent être inclus

indépendamment de leur résultat au test de référence¹, les individus infectés ne doivent pas être atteints d'une forme particulièrement sévère ou évoluée de la maladie² (en particulier lorsque le test évalué est destiné à être utilisé pour le dépistage dans une population présentant peu ou pas de signes cliniques, dans un objectif de détection précoce de la maladie) (Paolaggi et Coste, 2001).

Le choix des modalités techniques de réalisation des tests est un autre point crucial : le choix du seuil de positivité, les délais de réalisation, les réactifs et protocoles techniques mis en œuvre et la gestion des résultats douteux ou ininterprétables sont souvent très variables d'une étude à l'autre (Greiner et Gardner, 2000). Par ailleurs, la lecture des résultats doit être faite « à l'aveugle », c'est-à-dire à l'insu du contexte clinique, épidémiologique et des résultats obtenus aux autres tests étudiés³ (Paolaggi et Coste, 2001).

Au-delà des variations induites par d'éventuels biais liés au protocole d'étude, la sensibilité et la spécificité individuelles des tests peuvent également être influencées par le profil des populations testées : le statut immunitaire des animaux (maladies intercurrentes, gestation, traitements immunosuppresseurs...) (Dondo *et al.*, 1996), leur origine génétique (Lagrange *et al.*, 1979), leur mode d'élevage (pression microbienne de l'environnement)... La sensibilité et la spécificité « troupeau » sont, comme nous l'avons vu dans le premier chapitre de ce manuscrit, intimement dépendantes de la prévalence de la maladie dans le troupeau et du nombre d'individus testés.

Se pose alors la question de l'extrapolation des résultats obtenus dans le cadre des études d'estimation de sensibilité et de spécificité des tests. Dans la majeure partie des cas, lorsque le protocole d'étude et le profil de la population étudiée sont décrits de manière suffisamment détaillée, il est possible de statuer sur la possibilité d'extrapolation. Ainsi, dans le cas de l'étude des caractéristiques des tests de dépistage de la brucellose porcine en France métropolitaine, on peut considérer que les animaux étudiés appartiennent à une population très similaire à la population des porcs de l'Union Européenne et que les résultats obtenus sont par conséquent extrapolables à cette population. Ce n'est en revanche pas le cas concernant l'étude des caractéristiques du test de dosage de l'interféron gamma pour le dépistage de la tuberculose bovine, en raison du fait que cette étude a été réalisée dans des contextes très particuliers (fréquence des réactions croisées dues à des mycobactéries atypiques et grande taille des troupeaux en Côte d'Or, animaux de combat en Camargue).

¹ La non vérification de cette condition engendre un biais de vérification ou « work up bias »

² Biais de sélection sur la gravité de la maladie ou « spectrum bias »

³ Biais de lecture ou « context bias »

↪ La sensibilité et la spécificité sont couramment désignées par le terme « caractéristiques intrinsèques » (Toma *et al.*, 2010). Elles peuvent toutefois être influencées par certains facteurs, inhérents à la population testée ou à la méthodologie de l'étude. **Il convient par conséquent d'être prudent et de comparer rigoureusement les circonstances d'évaluation d'un test avant d'en extrapoler les résultats à la population générale.**

1.3 Quand la référence manque: avantages et limites de l'estimation des caractéristiques des tests par un modèle à classe latente implémenté par une approche bayésienne

Comme nous l'avons vu précédemment, la particularité des modèles à classe latente est de permettre la construction d'une référence lorsqu'aucune information n'est disponible concernant le statut infectieux individuel des animaux de l'échantillon. Ce type de situation est fréquemment rencontré en médecine vétérinaire, en raison de l'approche collective de la lutte contre les maladies du bétail. Dans la majorité des cas, les décisions sanitaires concernant les animaux de rente sont prises à l'échelle du troupeau et le statut sanitaire individuel des animaux constituant le troupeau n'est souvent pas connu. Par exemple, lorsque la présence d'une maladie réglementée est confirmée dans un cheptel, il est fréquent d'abattre tous les animaux de ce troupeau mais la mise en évidence de l'agent pathogène sur chaque individu n'est pas toujours possible. Dans ce cas, aucune référence positive n'est disponible. Pour d'autres maladies, le contexte épidémiologique général est connu mais le statut individuel des animaux ne fait pas l'objet d'une recherche systématique : aucun statut « officiellement indemne » n'existe et aucune référence négative n'est disponible.

L'estimation des paramètres d'un modèle à classe latente peut être effectuée de manière fréquentiste, par la méthode du maximum de vraisemblance¹. Contrairement à l'approche bayésienne, elle fournit une estimation ponctuelle des paramètres d'intérêt (Hui et Walter, 1980) et nécessite de disposer d'un grand nombre de données afin que le degré de liberté permis par les données soit supérieur au nombre de paramètres à estimer. Ce point est souvent problématique. Il peut notamment être résolu en utilisant plusieurs populations dans lesquelles la prévalence de la maladie est différente, sans toutefois tendre vers 0 ou 1 (Nielsen et Toft, 2002). Lorsqu'on ne dispose pas de telles populations, ou lorsque les tests sont liés par une relation de dépendance conditionnelle, les modèles sont souvent non identifiables et leur résolution nécessite d'utiliser une approche différente.

¹ en Anglais : Maximum Likelihood, ML

L'approche bayésienne pour l'estimation des caractéristiques de tests de dépistage en l'absence de test de référence est de plus en plus fréquemment utilisée en médecine humaine (Meyer *et al.*, 2009) comme en médecine vétérinaire (*cf.* Annexe 5).

Son principal intérêt réside dans la possibilité d'intégrer dans l'estimation les résultats d'enquêtes préliminaires, les données bibliographiques disponibles sur le sujet et les avis d'experts afin de rendre identifiable un modèle qui ne l'était pas. Ces informations *a priori* doivent être générées indépendamment de l'étude en cours (Enøe *et al.*, 2000). Lorsque le nombre d'unités de l'échantillon étudié est faible, le choix de la loi *a priori* est crucial pour la suite de l'analyse : deux lois *a priori* différentes conduisent logiquement à deux systèmes d'inférence différents, mais l'accumulation d'un grand nombre de données finit par gommer cette différence. Le paradoxe de l'approche bayésienne est qu'il n'existe pratiquement jamais une unique loi *a priori*, mais plutôt un ensemble de lois compatibles avec les informations disponibles et les opinions des experts. Cette imprécision des informations cliniques et épidémiologiques disponibles est souvent assimilée à la subjectivité de l'analyse bayésienne et décrite comme une limite par certains auteurs (Berwick *et al.*, 1981). On peut au contraire considérer que cette imprécision reflète la réalité des choses : lorsque les informations disponibles sur un test sont imparfaites et incomplètes, cette « imperfection » est retrouvée dans l'inférence résultante après intégration des résultats observés.

Par ailleurs, les études préliminaires nécessaires au choix des hypothèses *a priori* présentent l'avantage de rendre explicite les informations manquantes, incertaines ou approximatives et sont autant d'incitations à la mise en œuvre de nouvelles recherches cliniques et/ou épidémiologiques. Il conviendra dans tous les cas d'estimer l'impact de ces « priors » dans l'estimation des paramètres *a posteriori* par une étude de sensibilité.

Cette approche présente toutefois l'inconvénient inhérent à toute modélisation : le compromis entre la simplicité du modèle et son aptitude à refléter des situations parfois complexes est difficile à trouver. Un réalisme poussé implique d'utiliser des modèles compliqués : le nombre de paramètres à renseigner devient vite important et accroît les risques d'erreurs dans l'écriture du modèle. Au contraire, un modèle simple ne doit pas être simpliste. Le risque majeur est alors le manque de finesse pour l'évaluation des scénarios (Seegers *et al.*, 2011).



L'estimation directe présente l'intérêt d'être relativement simple à appliquer, à condition de disposer d'une référence valable concernant le statut des individus vis-à-vis de la maladie. Son inconvénient majeur réside dans le fait d'être fondée sur des populations très particulières, souvent peu représentatives de la population générale. Ce type d'approche convient bien à la réalisation d'études préliminaires en laboratoire ou sur le terrain.

L'estimation des caractéristiques des tests par une modélisation avec construction d'une référence permet de s'affranchir de la connaissance du statut individuel des animaux et de conduire l'étude dans une population d'animaux tout venant, tirés au sort et donc représentatifs de la population d'origine.

En dehors de ces points techniques, l'évolution de la maladie dans la population étudiée peut influencer sur l'approche choisie. Dans le cas de l'évolution épizootique d'une maladie dans une population jusque-là indemne, que les pouvoirs publics souhaitent maîtriser le plus rapidement possible, l'estimation directe des caractéristiques présente l'avantage d'être rapide et de ne pas nécessiter d'avoir de recul par rapport à l'utilisation de ce test. Au contraire, lorsqu'une maladie évolue sur un mode depuis plusieurs années avant le début de la lutte, il semble acceptable de prendre le temps d'utiliser des méthodes plus élaborées reposant sur les données de terrain et sur les informations *a priori* disponibles. Dans ce second cas, il est également fréquent que la circulation de la maladie à bas bruit complique sa détection (contrairement à la survenue de foyers dans une population jusque-là indemne, souvent accompagnée d'une expression clinique facilement repérable), ce qui plaide en faveur de l'utilisation de méthodes indirectes en raison de l'absence de référence facilement utilisable.

2 De la prise de décision « intuitive » à la conception d'un outil d'aide à la prise de décision sanitaire : simplifier et rationaliser une stratégie décisionnelle complexe

2.1 Du test simple à l'arbre décisionnel : diversité des outils d'aide à la prise de décision sanitaire

Comme en témoignent les travaux présentés dans ce manuscrit, la notion d'« outil d'aide à la prise de décision sanitaire » recouvre plusieurs aspects : il peut s'agir d'un simple test ou critère clinique, comme d'un arbre décisionnel complexe permettant de décomposer et de rationaliser la décision.

Le déroulement d'une consultation médicale en constitue un bon exemple. Un point particulier d'un examen clinique, ou un test de dépistage effectué isolément, est en effet déjà un « outil » simple, dont le clinicien interprète le résultat en fonction des connaissances dont il dispose, souvent inconsciemment, afin de déterminer la conduite à tenir. La stratégie décisionnelle la plus simple est donc intuitive. Lorsque ce premier critère ne permet pas d'aboutir à une conclusion, un second critère doit lui être associé selon un arbre décisionnel à deux nœuds (*cf.* Chapitre III : application

portant sur l'épididymite contagieuse du bélier). L'exemple le plus fréquent et le plus simple d'arbre décisionnel est l'association de deux tests en série ou en parallèle. Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'avantage de l'association en série est l'économie potentielle du second test en cas de réponse négative au premier. Ses inconvénients majeurs sont la perte de temps liée à l'attente des résultats du premier test avant de procéder au second, et la chute du taux d'observance du second test. L'association en parallèle permet quant à elle un gain de temps appréciable mais engendre des coûts supérieurs, en termes d'argent, de contraintes pratiques et de risques éventuellement lié à la réalisation des tests.

Certaines précautions doivent être prises avant la mise en œuvre de telles stratégies : selon Grenier (1999), l'exploitation séquentielle de tests impose qu'il n'existe pas de redondance entre les tests. Comme l'illustrent les trois études rapportées dans ce manuscrit, cette condition paraît toutefois très difficile à vérifier sur le terrain. Un grand nombre de protocoles décisionnels utilisent des séquences de tests plus ou moins fortement dépendants. Dans ce cas, l'étude des caractéristiques des tests utilisés pour la construction d'arbre décisionnels doit être effectuée dans les conditions d'application de ces tests (c'est-à-dire conditionnellement au résultat obtenu au premier test dans le cas d'une association en série) et l'existence d'une relation de dépendance conditionnelle entre les tests doit impérativement être prise en compte sous peine d'introduire un biais majeur dans l'évaluation de l'efficacité du protocole (Vacek, 1985).

↳ Dans les situations « banales », lorsque le nombre d'informations à intégrer est faible et que les répercussions de la prise de décision sont mineures (en termes de coût et de risque), les décisions intuitives sont acceptables car elles ont l'avantage d'être rapides et efficaces. Dans ce type de cas, la décision est souvent prise à l'échelle de l'atelier, de la bande d'animaux, voire de l'individu (Seegers *et al.*, 2011). Au contraire, lorsque la décision doit être prise dans un contexte complexe (en raison de la gravité de la maladie ou de la difficulté de trancher), l'analyse du raisonnement selon un arbre décisionnel à nœud multiples est indispensable et la gestion est le plus souvent du ressort des pouvoirs publics.


2.2 Avantages et limites des outils d'aide à la prise de décision sanitaire

L'utilisation d'outils d'aide à la prise de décision sanitaire permet au décideur (ou au clinicien) d'appuyer sa décision sur des critères objectifs ayant fait l'objet d'une analyse rationnelle préalable, prenant en compte les bénéfices, les risques et les coûts qu'engendrent la décision, à l'échelle de l'individu et à l'échelle de la collectivité. Selon certains auteurs (Timmermans, 1994), toute décision,

même apparemment simple, gagne à être prise selon un raisonnement rationnel et explicite. L'exemple du dépistage de la tuberculose bovine montre que sur le terrain, l'application de ce type de stratégie évite le traitement des dossiers au cas par cas par les DD(CS)PP¹, ce qui allège la charge de travail. Elle limite également le sentiment d'iniquité dénoncée par certains éleveurs, voire décourage les pressions dont les acteurs de terrain pourraient être l'objet.

Pourtant, l'utilisation d'outils d'aide à la prise de décisions sanitaires donne parfois l'impression de déshumaniser la décision. La prise de décision sanitaire, qu'elle repose ou non sur la construction d'un arbre décisionnel, relève de la responsabilité du décideur et ne saurait s'affranchir de son opinion.

La résolution d'une question, même complexe, sous la forme d'un arbre décisionnel apparaît simple et très didactique. Il importe néanmoins d'être prudent. La construction de l'arbre exige des réponses catégorielles, alors même que la plupart des données disponibles sont quantitatives : leur transformation en catégories est à l'origine d'une incertitude. Le choix des réponses aux questions posées n'est pas toujours évident et l'arborescence n'est pas toujours adaptée à certains cas particuliers. Aussi, l'apparente simplicité des arbres, souvent demandée par les autorités dans un souci d'homogénéisation des stratégies sur l'ensemble du territoire, est-elle réductrice. La mise en place de stratégies communes à plusieurs contextes différents est cependant réalisable, à condition de laisser une certaine liberté d'interprétation et d'adaptation aux acteurs de terrain, et de fonder la relation entre les pouvoirs publics centraux et locaux sur la confiance.

 Afin de permettre une utilisation quotidienne par les acteurs de terrain, l'outil d'aide à la prise de décision sanitaire doit donc être suffisamment simple pour ne pas décourager les utilisateurs mais ne doit pas être simpliste, au risque d'induire des erreurs de stratégie. Il doit être conçu en étroite collaboration avec ces acteurs de terrain afin de prendre en compte les particularités du contexte dans lequel il est appliqué.

¹ DD(CS)PP : Direction départementale (de la cohésion sociale et) de la protection des populations

3 Perspectives


3.1 Choix des outils d'aide à la prise de décision sanitaire en santé animale : de la diversité des approches possibles

Comme indiqué dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous avons choisi, au cours de nos travaux, de nous intéresser à l'estimation de la part d'incertitude liée à l'utilisation de tests en tant qu'outils d'aide à la prise de décision, dans le but de réaliser une évaluation comparative de stratégies de maîtrise par dépistage, suivi ou non d'un abattage. Cet angle constitue un prérequis à la mise en œuvre de toute stratégie décisionnelle. Il peut être complété par l'usage d'outils permettant d'apporter des informations plus ou moins directes sur les stratégies décisionnelles (Seegers *et al.*, 2011) : analyse du risque, approche dynamique permettant d'étudier persistance intra-troupeau des agents pathogènes incriminés et leur propagation, analyse socio-économique, *etc.*

Dans une première approche, les modèles épidémiologiques n'intégrant pas de dimension socio-économique fournissent des informations tout à fait pertinentes, telles que l'identification des points critiques de contrôle du système ou la hiérarchisation de stratégies en termes d'efficacité épidémiologique, en incluant des éléments d'incertitude ou de variabilité des résultats (Dubé *et al.*, 2008). En règle générale, la nécessité d'une étude socio-économique de la stratégie décisionnelle est à mettre en rapport avec le coût de la lutte envisagée. Lorsque les répercussions économiques ou sanitaires de la maladie sont mineures, ou en contexte « indemne », les principes de la lutte éventuellement organisée et les stratégies décisionnelles appliquées sont relativement simples (exemples de la lutte contre l'épididymite contagieuse du bélier ou contre la brucellose porcine en métropole). En revanche, lorsque les répercussions de la maladie sont sévères et que les mesures de lutte sont coûteuses, comme dans le cas de l'éradication de la tuberculose bovine, les séquences décisionnelles sont complexes, coûteuses et justifient la mise en œuvre d'une étude socio-économique approfondie (Cavalerie, 2012).

Par ailleurs, l'étude d'une stratégie décisionnelle peut être menée *a priori*, avant son utilisation sur le terrain (exemple des stratégies de dépistage de la brucellose porcine et de l'épididymite contagieuse du bélier) ou *a posteriori*, à des fins d'évaluation (exemple des stratégies de dépistage de la tuberculose bovine). Dans le cas de la conception d'un protocole à partir de données expérimentales, il est indispensable de confronter cette évaluation préliminaire aux résultats obtenus après application de ce protocole sur le terrain durant un laps de temps à déterminer. Par la suite, en raison du nombre d'éléments de contexte susceptibles de varier sur le terrain, entre autres du fait de la mise en place de plans de lutte, il convient également de réajuster et de réorienter les mesures de lutte par décisions successives (Thornley et France, 2009).

Enfin, les analyses simples de stratégies décisionnelles considèrent implicitement que les modalités d'intervention prévues sont systématiquement mises en œuvre par les acteurs. C'est malheureusement loin d'être le cas. Dans les faits, il existe de nombreuses limites à l'observance en raison de contraintes pratiques, sociologiques ou économiques. Ce point a été évoqué dans l'étude conduite sur la tuberculose bovine. Dans le domaine de la lutte contre cette maladie, l'utilisation de tests imparfaits dans un contexte épidémiologique complexe (réactions faussement positives, phénomènes de résurgence, contamination des bovins par la faune sauvage) a abouti, il y a quelques années, à un découragement des acteurs de terrain. Cette lassitude a notamment retenti sur la qualité de réalisation et d'interprétation des intradermotuberculinations et surtout sur la transmission des informations aux instances décisionnaires.

 Ainsi, la construction d'une stratégie décisionnelle en médecine vétérinaire nécessite-t-elle de prendre en compte les options disponibles afin d'en limiter, autant que possible, les conséquences économiques et non économiques sur les élevages.

3.2 Vers une amélioration de l'adaptation des données collectées

La collecte d'informations concernant la maladie étudiée et la population cible est indispensable à la conception et à la validation de stratégies décisionnelles. La connaissance des éléments de contexte nécessite la mise en œuvre d'études préliminaires portant sur les caractéristiques épidémiologique de la maladie et des outils disponibles pour la détecter (sensibilité et spécificité des tests seuls ou associés, valeurs prédictives, modalités de réalisation pratique, répétabilité et reproductibilité, possibilité d'automatisation, etc).

Dans les années 1980, le premier écueil rencontré lors de la conception de protocoles de lutte contre les maladies animales était justement celui de la collecte des données, en raison de l'absence de procédures d'assurance qualité et d'une qualité de surveillance souvent moindre qu'en médecine humaine (Morris, 1995).


De nombreux réseaux d'épidémiosurveillance des maladies animales ont depuis vu le jour et permettent d'organiser la collecte d'informations et leur transmission: c'est par exemple le cas du réseau SAGIR, créé en 1986 par l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage (ONCFS), qui surveille la mortalité des animaux sauvages et cherche à en identifier la cause, ou du réseau RESAPATH, créé en 1982 dans le but de surveiller l'antibiorésistance des bactéries pathogènes de l'animal (ANSES, 2010). Depuis 2011, l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail) a également créé une plateforme de surveillance

épidémiologique animale dont les missions sont de participer à l'élaboration et à l'amélioration des dispositifs de surveillance épidémiologique, de faciliter la centralisation, la valorisation et le partage des données sanitaires et de contribuer à l'analyse des données sanitaires et à leur diffusion (SURVEPI, 2011).

Néanmoins, l'expérience prouve que la collecte des données en santé animale reste difficile à organiser et surtout que les données « de terrain » sont peu adaptées à une analyse épidémiologique à des fins de recherche. La disponibilité de données suffisantes et adaptées est donc probablement la limite principale pour la construction et la validation des stratégies décisionnelles (Seegers *et al.*, 2011).

Ce type de données, acquises à l'échelle locale parallèlement à la mise en place de plan de lutte par les organismes à vocation sanitaire ne sont souvent guère centralisées ou difficilement accessibles, présentent des défauts d'homogénéité (reproductibilité imparfaite, contextes variés...). Comme le montre l'exemple de la tuberculose bovine, les bases de données utilisées par les services vétérinaires départementaux sont avant tout conçues pour permettre la gestion pratique et financière des interventions réalisées dans les élevages. Les informations sont saisies par des personnes différentes, selon un codage variable et comportent un risque majeur de biais lié à l'inclusion. Pour certains opérateurs, il peut en effet être plus « tentant » d'enregistrer une information anormale qu'une information normale, tandis que d'autres personnes hésitent à déclarer un résultat non négatif (par crainte des conséquences d'une telle déclaration).

Certains auteurs critiquent également l'utilisation de données provenant de troupeaux dont le profil et l'intensité du suivi sanitaire ne sont pas représentatifs de la population à laquelle la stratégie décisionnelle a pour vocation d'être extrapolée (McIntyre *et al.*, 2008).

 Il reste donc d'importants progrès à faire en matière de collecte, de centralisation et de transmission des données inhérentes à la lutte contre les maladies animales afin d'affiner l'étude des stratégies décisionnelles. Toutefois, l'élaboration de nouveaux outils statistiques permet de remédier à certaines de ces limites.

CONCLUSION

La conception et l'évaluation d'outils d'aide à la prise de décisions sanitaire ont pour particularité de devoir intégrer un grand nombre d'éléments de différentes natures : épidémiologique, économique, sociale, *etc.* Le propre de ces stratégies décisionnelles est d'être appliquées dans un contexte d'incertitude : variabilité des populations étudiées, imperfection des tests, évolution des caractéristiques épidémiologiques de la maladie – spontanée ou consécutive à la mise en œuvre de la stratégie décisionnelle –... dont l'étude et la connaissance nécessitent la combinaison de multiples approches. Parmi ces points, nous avons choisi de centrer nos travaux sur l'estimation de l'incertitude liée à l'utilisation de tests de dépistage ou de diagnostic, seuls ou associés, en tant qu'outils d'aide à la prise de décisions sanitaires. Cette étape est un prérequis indispensable à l'établissement de toute stratégie décisionnelle, mais l'utilisation de l'épidémiologie dans le choix de stratégies décisionnelles ne saurait se résumer à cet unique aspect.

Sur le terrain, l'utilisation d'outils d'aide à la prise de décisions sanitaires revêt une importance particulière dans la lutte contre des maladies dont les conséquences économiques ou sanitaires sont graves. Aussi, ces outils constituent-ils le seul moyen de rationaliser les choix et les dépenses engendrées par la lutte contre les maladies animales. Afin de limiter l'impression de « déshumanisation » de la décision qui résulte de leur utilisation, il convient de garder à l'esprit que le choix final est du ressort et de la responsabilité du décideur, et que ce type d'outils ne saurait refléter l'ensemble des cas particuliers rencontrés sur le terrain.

BIBLIOGRAPHIE

- ACHA P.N., SZYFRES B., 2005. Brucellosis. In : *Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals: Bacterioses and mycoses*. 3rd Ed. Pan American Sanitary Bureau. Pan American Health Org, 40-66.
- AFZAL M., KIMBERLING C., 1986. How to control *Brucella ovis*-induced epididymitis in rams. *Veterinary Medicine*, 81(4):364–371.
- ALINOVI C.A., WARD M.P., LIN T.L., MOORE G.E., WU C.C., 2009. Real-time PCR, compared to liquid and solid culture media and ELISA, for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*, *Veterinary Microbiology*, 136: 177-179.
- ALVAREZ J., VENEROS R., GONZÁLEZ O., 2007. Validación operacional de un ELISA comercial para *Brucella ovis*, Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria* (Chile), 39(3): 275-279.
- ALVAREZ J., PEREZ A., BEZOS J., MARQUES S., GRAU A., SAEZ J.L., MINGUEZ O., DE JUAN L., DOMINGUEZ L., 2012. Evaluation of the sensitivity and specificity of bovine tuberculosis diagnostic tests in naturally infected cattle herds using a Bayesian approach. *Veterinary Microbiology*, 155: 38-43.
- ANDERSEN S., 1997. Re: Bayesian estimation of disease prevalence and the parameters of diagnostic tests in the absence of gold standard. *American Journal of Epidemiology*, 145: 290-291.
- ANSES (AGENCE NATIONALE DE SECURITE SANITAIRE DE L'ALIMENTATION, DE L'ENVIRONNEMENT ET DU TRAVAIL), 2010. Epidémiologie. Brochure d'information, Nancy : Bialec, 4 p.
- ARKIN M.R., GLICKSMAN M.A., FU H., HAVEL J.J., DU Y., 2012. Inhibition of Protein-Protein Interactions: Non-Cellular Assay Formats. In: SITTAMPALAM G.S., WEIDNER J., AULD D., et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. [en-ligne], consulté le 17 juin 2012. Disponible sur : [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92000/>]
- BAYES T., 1763. An essay towards solving a problem in the doctrine of chances. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 53: 370-418.
- BENET J.J., BOSCHIROLI M.L., DUFOR B., GARIN-BASTUJI B., 2006. Lutte contre la tuberculose bovine en France de 1954 à 2004 : analyse de la pertinence épidémiologique de l'évolution de la réglementation. *Epidémiologie et Santé Animale*, 50: 127-143.
- BENET J.J. et al., 2011. *La tuberculose*. Polycopié des Ecoles Nationales Vétérinaires françaises, Paris : Mérial, 79 p.
- BERKVENS D., SPEYBROECK N., PRAET N., ADEL A., LESAFFRE E., 2006. Estimating disease prevalence in a Bayesian framework using probabilistic constraints. *Epidemiology*. 17(2): 145-153.

- BERNIER J., PARENT E., BOREUX J.J., 2000. *Statistique pour l'environnement. Traitement bayésien de l'incertitude*. Paris : Tech & Doc, 363 p.
- BERWICK D.M., FINEBERG H.V., WEINSTEIN M.C., 1981. When doctors meet numbers. *American Journal of Medicine*, 71: 991-998.
- BLAJAN L., 2005. L'aide de l'épidémiologie aux décisions de santé. *Epidémiologie et Santé Animale*, 47: V-VI.
- BLASCO J.M., 1990. *Brucella ovis*. In: Animal brucellosis. K. Nielsen & J.R. Duncan, Boca Raton: CRC Press; 351-378.
- BOULAHBAL F., ROBERT J., TRYSTRAM D., DE BENOIST A.C., VINCENT V., JARLIER V., GROSSET J., 1998. La tuberculose humaine à *Mycobacterium bovis* en France durant l'année 1995. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 48: 207-208.
- BRANSCUM A.J., GARDNER I.A., JOHNSON W.O., 2005. Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modelling. *Preventive Veterinary Medicine*, 68: 145-163.
- BRONNER A., MARCÉ C., FRADIN N., DARROUY-PAU C., GARIN-BASTUJI B., 2011. Bilan de la surveillance de la brucellose porcine en 2010 : détection de foyers chez des porcs de race locale. *Bulletin Epidémiologique Santé Animale et Alimentation*, 46 : 39-40.
- BROONSVORT B.M.D.C., TOFT N., BERGMANN I.E., SØRENSEN K.J., ANDERSON J., MALIRAT V., TANYA V.N., MORGAN K.L., 2006. Evaluation of three 3ABC ELISAs for foot-and-mouth disease non-structural antibodies using latent class analysis. *BMC Veterinary Research*, 2:30.
- BROONSVORT B.M.D.C., PARIDA S., HANDEL I., MCFARLAND S., FLEMING L., HAMBLIN P., KOCK R., 2008. Serological survey for foot-and-mouth disease virus in wildlife in Eastern Africa and estimation of tests parameters of a non-structural protein enzyme-linked immunosorbent assay for Buffalo. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(6): 1003-1011.
- BUDDLE B.M., RYAN T.J., POLLOCK J.M., ANDERSEN P., DE LISLE G.W., 2001. Use of ESAT-6 in the interferon-gamma test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. *Veterinary Microbiology*, 80: 37-46.
- CAFFREY J.P., 1994. Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. *Veterinary Microbiology*, 40: 1-4.
- CAVALERIE L., 2012. Evaluation socio-économique de mesures réglementaires en santé animale : abattage total et abattage partiel des foyers de tuberculose bovine en Côte d'Or. Thèse de Médecine Vétérinaire, Alfort, 150 p.
- CERRI D., EBANI V., PEDRINI A., BASSI S., BEY R., ANDREANI E., FARINA R., 2000. Evaluation of tests employed in serological diagnosis of brucellosis caused by *Brucella ovis*. *New Microbiologica*, 23(3):281-288.

- CHO H., NILO L., 1987. Diagnostic sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 51(1): 99.
- CHRISTENSEN J., GARDNER I.A., 2000. Herd-level interpretation of tests results for epidemiologic studies of animal diseases. *Preventive Veterinary Medicine*, 45: 83-106
- CLARK J.S., 2007. *Statistical computation for environmental sciences in R, lab manual for ecological data*. Princeton: Princeton University Press, 142 p.
- CLEGG T., DUIGNAN A., WHELAN C., GORMLEY E., GOOD M., CLARKE J., TOFT N., MORE S.J., 2011. Using latent class analysis to estimate the test characteristics of the gamma-interferon test, the single intradermal comparative tuberculin test and a multiplex immunoassay under Irish conditions. *Veterinary Microbiology*, 151: 68-76.
- CLIFTON-HADLEY R.S., WILESMITH J.W., 1995. An epidemiological outlook on the bovine tuberculosis in the developed world. In : GRIFFIN F., DE LISLE G. (Eds) Proceeding of the second international conference on *Mycobacterium bovis*. University of Otago Press, Otago, Dunedi, New Zealand.
- COCKCROFT P.D., 2007. Clinical reasoning and decision analysis. *Veterinary Clinics Small Animal Practice*, 37: 499-520.
- COUSINS D.V., CORNER L.A., TOLSON J.W., JONES S.L., WOOD P.R., 1998. Eradication of bovine tuberculosis from Australia: key management and technical aspects. C.S.L. Limited, Parkville, Australia, 45 p.
- COUSINS D.V., 2001. *Mycobacterium* infection and control in domestic livestock. *Revue Scientifique et Technique*, 20(1) : 71-85, OIE.
- DALLEY D.J., HOGARTH P.J., HUGHES S., HEWINSON R.G., CHAMBERS M.A., 2004. Cloning and sequencing of badger (*Meles meles*) interferon gamma and its detection in badger lymphocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 101: 19-30.
- DEAN G.S., RHODES S.G., COAD M., WHELAN A.O., COCKLE P.J., CLIFFORD D.J., HEWINSON R.G., VORDERMEIER H.M., 2005. Minimum infective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infection and Immunity*, 73(1): 6467-6471.
- DE BENEDICTIS P., ANDERSON T.C., PEREZ A., VIALE E., VEGGIATO C., TIOZZO CAENAZZO S., CRAWFORD P.C., CAPUA I., 2010. A diagnostic algorithm for detection of antibodies to influenza A viruses in dogs in Italy (2006-2008). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22(6): 914-920.
- DELACOUR H., SERVONNET A., PERROT A., VIGEZI J.F., RAMIREZ J.M., 2005. La courbe ROC (Receiver Operating Characteristic) : principes et principales applications en biologie clinique. *Annales de biologie clinique*, 63(2): 145-155.
- DE LA RUA-DOMENECH R., GOODCHILD A.T, VORDERMEIER H.M., HEWINSON R.G., CHRISTIANSEN K.H., CLIFTON-HADLEY R.S., 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin

- tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science*, 83: 190-210.
- DENDUKURI N., JOSEPH L., 2001. Bayesian approaches to modelling the conditional dependence between multiple diagnostic tests. *Biometrics*. 57: 158-167.
- DESENCLOS J.C., DE VALK H., 2005. Les maladies infectieuses émergentes : importance en santé publique, aspects épidémiologiques, déterminants et prévention. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 35(2) : 49-61.
- DOHERTY M.L., MONAGHAN M.L., BASSETT H.F., QUINN P.J., 1995. Effect of a recent injection of purified protein derivative on diagnostic tests for tuberculosis in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Research in Veterinary Science*, 58: 217–221.
- DONALD A.W., GARDNER I.A., WIGGINS A.D., 1994. Cut-off points for aggregate herd testing in the presence of disease clustering and correlation of test errors. *Preventive Veterinary Medicine*, 19: 167-187.
- DONDO A., GORIA M., ABETE M.C., GIAMMARINO M., ALLASIA G., NICOLANDI L.. 1996. Effect of dexamethasone on gamma interferon test in cattle infected with *M. bovis*. In: Proceedings Società Italiana delle Scienze Veterinarie, vol. L. Perugia, 25-28.
- DREW J.A., DEAN G.S., MICHEL A.L., PEARCE G.P., 2009. Accuracy of three diagnostic tests for determining *Mycobacterium bovis* infection status in live-sampled wild meerkats (*Suricata Suricata*), *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21(1): 31-39.
- DUBE C., GARNER G., STEVENSON M., SANSON R., ESTRADA C., WILLEBERG P., 2008. L'utilisation des modèles épidémiologiques pour la gestion des maladies animales. Recueil des thèmes techniques présentés au Comité international ou aux Commissions régionales, Paris : OIE, 25-35.
- EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY), 2009. Porcine brucellosis (*Brucella suis*): scientific opinion of the panel on animal health and welfare, *The EFSA Journal*, 1144: 1-112.
- ELVINGER F., AKEY B.L., SENNE D.A., PIERSON F.W., PORTER-SPALDING B.A., SPACKMAN E., SUAREZ D.L., 2007. Characteristics of diagnostic tests used in the 2002 low-pathogenicity avian influenza H7N2 outbreak in Virginia, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(4): 341-348.
- ENGEL B., BUIST W., ORSEL K., DEKKER A., DE CLERCQ K., GRAZIOLI S., VAN ROERMUND H., 2008. A Bayesian evaluation of six diagnostic tests for foot-and-mouth disease for vaccinated and non-vaccinated cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, 86: 124-138.
- ENØE C., GEORGIADIS M.P., JOHNSON WO., 2000. Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease is unknown. *Preventive Veterinary Medicine*, 45: 61-81.

- ENØE C., ANDERSEN S., SØRENSEN V., WILLEBERG P., 2001. Estimation of sensitivity, specificity and predictive values of two serologic tests for the detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in the absence of a reference test (gold standard). *Preventive Veterinary Medicine*, 51: 227-243.
- ESTEIN S., 1999. Immunological aspects in the diagnosis and control of contagious epididymitis of rams caused by *Brucella ovis*; Aspectos inmunológicos en el diagnóstico y control de la epididimitis contagiosa del carnero por *Brucella ovis*. *Archivos de Medicina Veterinaria* (Chile), 31: 5-17.
- FABLET C., MAROIS C., KOBISCH M., MADEC F., ROSE N., 2010. Estimation of the sensitivity of four sampling methods for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in live pigs using a Bayesian approach. *Veterinary Microbiology*, 143: 238-245.
- FAYE S., BOSCHIROLI M.L., MOYEN J.L., BENET J.J., GARIN-BASTUJI B., GARES H., 2008. Study of the specificity and the sensitivity of the dosage of the interferon gamma technique to the cattle for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Rencontres Recherches Ruminants*, 15: 81–84.
- FAYE S., MOYEN J.L., GARES H., BENET J.J., GARIN-BASTUJI B., BOSCHIROLI M.L., 2011. Determination of decisional cut-off values for the optimal diagnosis of bovine tuberculosis with a modified IFN gamma assay (Bovigam®) in a low prevalence area in France. *Veterinary Microbiology*, 151: 60-67.
- FEDIAEVSKY A., BÉNET J.J., BOSCHIROLI M.L., HARS J., 2011. La tuberculose bovine en France en 2010 : surveillance et détection accrues. *Bulletin Épidémiologique Santé Animale et Alimentation*, 46: 3-9.
- FICAPAL A., JORDANA J., BLASCO J., MORIYON I., 1998. Diagnosis and epidemiology of *Brucella ovis* infection in rams. *Small Ruminant Research*, 29(1):13–19.
- FOSGATE G.T., ADESIYUN A.A., HIRD D.W., JOHNSON W.O., HIETALA S.K., SCHURIG G.G., RYAN J., 2002. Comparison of serologic tests for detection of *Brucella* infections in cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*). *American Journal of Veterinary Research*, 63(11): 1598-1605.
- FOSGATE G.T., ADESIYUN A.A., HIRD D.W., HIETALA S.K., 2006. Likelihood ratio estimation without a gold standard: A case study evaluating a brucellosis c-ELISA in cattle and water buffalo of Trinidad. *Preventive Veterinary Medicine*, 75: 189-205.
- FRANCIS J., 1947. Bovine tuberculosis, including a contrast with human tuberculosis. London: Staple Press Limited, 220 p.
- FRANCIS J., 1958. *Tuberculosis in Animals and Man*. London: Cassell, 357 p.

- GALL D., COLLING A., MARINO O., MORENO E., NIELSEN K., PEREZ B., SAMARTINO L., 1998. Enzyme immunoassay for serological diagnosis of bovine brucellosis: a trial in Latin America. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5: 654-661.
- GALL D., NIELSEN K., VIGLIOCCO A., SMITH P., PEREZ B., ROJAS X., ROBLES C., 2003. Evaluation of an indirect enzyme-linked immunoassay for presumptive serodiagnosis of *Brucella ovis* in sheep. *Small Ruminant Research*, 48(3):173-179.
- GALL D., NIELSEN K., 2004. Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 23: 989-1002.
- GANIERE J.P. et al., 2011. *La brucellose animale*. Polycopié des Ecoles Nationales Vétérinaires françaises, Paris : Mérial, 51 p.
- GARDNER I.A., STRYHN H., LIND P., COLLINS M.T., 2000. Conditional dependence between tests affects the diagnosis and surveillance of animal disease. *Preventive Veterinary Medicine*, 45: 107-122.
- GARIN-BASTUJI B., CAU C., BOUÉ F., TERRIER M.E., HARS J., 2004. Utilisation comparée du sérum, du poumon et du muscle pour le dépistage de la brucellose chez les sangliers. *Epidémiologie et Santé Animale*, 45 : 13-23.
- GARIN-BASTUJI B., VAILLANT V., ALBERT D., TOURRAND B., DANJEAN M.P., LAGIER A., RISPAL P., BENQUET B., MAURIN M., DE VALK H., MAILLES A., 2006. Is brucellosis due the biovar 2 of *Brucella suis* an emerging zoonosis in France? Two case reports in wild boar and hare hunters. In: Proceedings of the International Society of Chemotherapy Disease Management Meeting, 1st International Meeting on Treatment of Human Brucellosis, 7–10 November 2006, Ioannina, Greece.
- GELMAN A., CARLIN J.B., STERNS H.S., RUBIN D.B., 1995. *Bayesian data analysis*. Londres: Chapman & Hall, 528 p.
- GEORGIADIS M.P., JOHNSON W.O., SINGH R., GARDNER I.A., 2003. Correlation-adjusted estimation of sensitivity and specificity of two diagnostic tests. *Applied Statistics*, 52: 63-78.
- GORIS N., PRAET N., SAMMINC D., YADIN H., PATON D., BROCCHI E., BERKVEN D., DE CLERCQ K., 2007. Foot-and-mouth disease non-structural protein serology in cattle: Use of a Bayesian framework to estimate diagnostic sensitivity and specificity of six ELISA tests and true prevalence in the field. *Vaccine*, 25: 7177-7196.
- GORMLEY E., DOYLE M.B., MCGILL K., COSTELLO E., GOOD M., COLLINS J.D., 2004. The effect of the tuberculin test and the consequences of a delay in blood culture on the sensitivity of a gamma-interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 102: 413–420.

- GORMLEY E., DOYLE M.B., FITZSIMONS T., MCGILL K., COLLINS J.D., 2006. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam®) assay, *Veterinary Microbiology*, 112: 171-179.
- GREINER M., GARDNER I.A., 2000. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Preventive Veterinary Medicine*, 45: 3-22.
- GRENIER B., 1999. *Evaluation de la décision médicale, introduction à l'analyse médico-économique*, 3ème éd., Paris : Masson, 414 p.
- GRILLÓ M., MARÍN M., BARBERAN M., BLASCO J., 1999. Experimental *Brucella ovis* infection in pregnant ewes. *Veterinary Record*, 144(20):555.
- HALEY C., WAGNER B., PUVANENDIRAN S., ABRAHANTE J., MURTAUGH M.P., 2011. Diagnostic performance measures of ELISA and quantitative PCR tests for porcine circovirus type 2 exposure using Bayesian latent class analysis. *Preventive Veterinary Medicine*, 101: 79-88.
- HANSON T., JOHNSON W.O., GARDNER I.A., 2003. Hierarchical models for estimating herd prevalence and test accuracy in the absence of a gold standard. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 8(2): 223-239.
- HERRMANN J.L., SIMONNEY N., LAGRANGE P.H., 2006. Avantages et limites des tests sanguine *in vitro* lymphocytes T/interféron gamma comparativement au test intradermique à la tuberculine pour le diagnostic de tuberculose. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 46 : 543-547.
- HUBSCHER R., 2002. La loi sanitaire de 1881 et son application dans les campagnes. *Bulletin de la Société Française d'Histoire de la Médecine et des Sciences Vétérinaires*, 1, [http://sfhmsv.free.fr/SFHMSV_files/Textes/Activites/Bulletin/Txts_Bull/B1/Hubscher_B1.pdf].
- HUDDLESTON I.F., 1929. The differentiation of the species of the Genus *Brucella*. *Bulletin of Michigan Agricultural Experiment Station*, 100.
- HUI S.L., WALTER S.D., 1980. Estimating the error rates of diagnostic tests. *Biometrics*, 36 :167-171.
- JOHNSON W.O., GASTWIRTH J.L., 1991. Bayesian inference for medical screening tests: approximations useful for the analysis of acquired immune deficiency syndrome. *Journal of Royal Statistic Society B*. 53: 427-439.
- JONNALAGADDA S.R., BROWN E., LOHMAN-PAYNE B., WAMALWA D., FARQUHAR C., TAPIA K., CRANMER L.M., JOHN-STEWART G.C., 2012. Consistency of *Mycobacterium tuberculosis*-Specific Interferon-Gamma Responses in HIV-1-Infected Women during Pregnancy and Postpartum, *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, Vol. 2012, 7 p.

- JOSEPH L., GYORKOS TW., COUPAL L., 1995. Bayesian estimation of disease prevalence and the parameters of diagnostic tests in the absence of a gold standard. *American Journal of Epidemiology*, 141: 263-272.
- JUNGERSEN G., SORENSEN V., GIESE S.B., STACK J.A., RIBER U., 2006. Differentiation between serological responses to *Brucella suis* and *Yersinia enterocolitica* serotype O9 after natural or experimental infection in pigs, *Epidemiology and Infection*, 134: 347-357.
- KIMBERLING C.V., PARSONS G.A., PARSONS J., CUNNINGHAM W., 2010. Lamb Epididymitis, Optimalag Website. [en-ligne], consulté le 28 mars 2011. Disponible sur : [http://www.optimalag.com/cleonscorner/Article002.aspx]
- KING L., KHABBAZ R., 2003. Converging issues in veterinary and public health. *Emerging Infectious Diseases*, 9(4): 510-511.
- KITTELBERGER R., HANSEN M., ROSS G.P., HILBINK F., 1994. A sensitive immunoblotting technique for the serodiagnosis of *Brucella ovis* infections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 6(2):188.
- KNOTTNERUS J.A., LEFFERS P., 1992. The influence of referral patterns on the characteristics of diagnostic tests. *Journal of Clinical Epidemiology*. 45: 1143-1154.
- KOSTOULAS P., LEONTIDES L., BILLINIS C., FLOROU M., 2006a. Application of a semi-dependent latent model in the Bayesian estimation of the sensitivity and specificity of two faecal culture methods for diagnosis of paratuberculosis in sub-clinically infected Greek dairy sheep and goats. *Preventive Veterinary Medicine*, 76:121-134.
- KOSTOULAS P., LEONTIDES L., ENØE C., BILLINIS C., FLOROU M., SOFIA M., 2006b. Bayesian estimation of sensitivity and specificity of serum ELISA and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis in Greek dairy sheep and goats. *Preventive Veterinary Medicine*, 76: 56-73.
- KREBS J.R., ANDERSON R., CLUTTON-BROCK T., MORRISON I., YOUNG D., DONNELLY C., 1997. Bovine tuberculosis in cattle and badgers. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF) Publications, London.
- LAGIER A., BROWN S., SOUALAH A., JULIER I., TOURRAND B., ALBERT D., REYES J., GARIN-BASTUJI, B., 2005. Brucellose aiguë à *Brucella suis* biovar 2 chez un chasseur de sanglier. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 35 : 185.
- LAGRANGE P.H., HURTREL B., THICKSTUN P.M., 1979. Immunological behavior after mycobacterial infection in selected lines of mice with high or low antibody responses. *Infection and Immunity*, 25(1): 39-47.
- LANDAIS P., BESSON C., JAIS J.P., 1994. Evaluation of the diagnostic contribution of a test. Main information indices. *Journal of Radiology*, 75: 141-50.

- LEPPER A.W.D., PEARSON C.W., CORNER L.A., 1977. Anergy to tuberculin in beef cattle. *Australian Veterinary Journal*, 53: 214-216
- L'HADJ M., FISSAH A., NAFTI S., 2006. Les nouveaux tests de diagnostic de la tuberculose. *Revue des Maladies Respiratoires*, 23: 10S85-10S87.
- LIJMER J.G., MOL B.W., HEISTERKAMP S., 1999. Empirical evidence of design-related bias in studies of diagnostic tests. *Journal of the American Medical Association*, 282: 1061-6.
- LUNN D.J., THOMAS A., BEST N., SPIEGELHALTER D., 2000. WinBUGS - A Bayesian modelling framework: concepts, structure, and extensibility. *Statistics and Computing*, 10(4): 325-337.
- LUSTED L.B., 1960. Logical analysis in Roentgen diagnosis. *Radiology*, 74: 178-193.
- MAHÉ A., BOUGEARD S., HUNEAU-SALAÜN A., LE BOUQUIN S., PETETIN I., ROUXEL S., LALANDE F., BELOEIL P.A., ROSE N., 2008. Bayesian estimation of a flock-level sensitivity of detection of *Salmonella* spp., Enteritidis and Typhimurium according to the sampling procedure in French laying-hen houses. *Preventive Veterinary Medicine*, 84: 11-26.
- MARCO J., GONZALEZ L., CUERVO L., DE HEREDIA F.B., BARBERAN M., MARIN C., BLASCO J., 1994. *Brucella ovis* infection in two flocks of sheep. *Veterinary Record*, 135(11):254-256
- MARÍN C., JIMENEZ DE BAGUES M., BLASCO J., GAMAZO C., MORIYON I., DIAZ R., 1989. Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. *Veterinary Record*, 125(20):504.
- MARTÍN S.W., SHOUKRI M., THORNBURN M.A., 1992. Evaluating the health status of herds based on tests applied to individuals. *Preventive Veterinary Medicine*, 14: 33-43.
- MATOPE G., MUMA J.B., TOFT N., GORI E., LUND A., NIELSEN K., SKJERVE E., 2011. Evaluation of sensitivity and specificity of RBT, c-ELISA and fluorescence polarization assay for diagnosis for brucellosis in cattle using latent class analysis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 141: 58-63.
- MCINTYRE K.M., GUBBINS S., GOLDMANN W., HUNTER N., BAYLIS M., 2008. Epidemiological Characteristics of Classical Scrapie Outbreaks in 30 Sheep Flocks in the United Kingdom. *PLoS ONE*, 3(12): e3994.
- MENZIES D., PAI M., COMSTOCK G., 2007. Metaanalysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. *Annals of Internal Medicine*, 146: 340-54.
- MERCIER P., BAUDRY C., MARTIN J., BERTIN C., LAROUCAU K., BEAUDEAU F., SEEGER H., MALHER X., 2007. Utilisation des techniques bayésiennes pour estimer les caractéristiques de deux tests de diagnostic de la paratuberculose caprine. *Epidémiologie et Santé Animale*, 51 : 57-64.
- METCALF H.E., LUCHSINGER D.W., RAY W.C., 1994. *Brucellosis. Handbook of Zoonoses: Section A. Bacterial, rickettsial, chlamydial, and mycotic.* Beran GW, Steele JH, 2nd Ed. CRC Press, 9-38.

- MEYER N., VINZIO S., GOICHOT B., 2009. La statistique bayésienne: une approche des statistiques adaptée la clinique. *La Revue de médecine interne*, 30(3) : 242-249.
- MOONS K.G.M., ES G.A.V., DECKERS J.W., HABBEMA J.D.F., GROBBEE D.E., 1997. Limitations of sensitivity, specificity, likelihood ratio, and Bayes' theorem in assessing diagnostic probabilities: a clinical example. *Epidemiology*, 8: 12-17.
- MORE S.J., 2009. What is needed to eradicate bovine tuberculosis successfully: an Irish perspective. *The Veterinary Journal*, 180: 275-278.
- MORRIS R.S., 1995. The epidemiological approach to animal health – building on strong foundations. *Preventive Veterinary Medicine*, 25: 77-92.
- MUHAMMED S., LAUERMAN JR L., MESFIN G., OTIM C., 1975. Duration of *Brucella ovis* infection in ewes. *The Cornell veterinarian*, 65(2):221.
- MUMA J.B., TOFT N., OLOYA J., LUND A., NIELSEN K., SAMUI K., SKJERVE E., 2007. Evaluation of three serological tests for brucellosis in naturally infected cattle using latent class analysis. *Veterinary Microbiology*, 125: 187-192.
- MUMA J.B., LUND A., NIELSEN K., MATOPE G., MUNYENNE M., MWACALIMBA K., SKJERVE E., 2009. Effectiveness of Rose Bengal test and fluorescence polarization assay in the diagnosis of *Brucella* spp. infections in free range cattle reared in endemic areas in Zambia. *Tropical Animal Health and Production*, 41: 723-729.
- MUÑOZ P.M., MARIN C.M., MONREAL D., GONZALEZ D., GARIN-BASTUJI B., DIAZ R., MAINAR-JAIME R.C., MORIYON I., BLASCO J.M., 2005. Efficacy of several serological tests and antigens for diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false-positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O:9. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12: 141-151.
- NEILL S.D., CASSIDY J., HANNA J., MACKIE D.P., POLLOCK M., CLEMENTS A., WALTON E., BRYSON D.B., 1994. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *Veterinary Record*, 135: 134-135.
- NEILL S.D., BRYSON D.B., POLLOCK J.M., 2001. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis*, 81: 9-86.
- NÉRETTE P., STRYHN H., DOHOO I., HAMMELL L., 2008. Using pseudogold standards and latent-class analysis in combination to evaluate the accuracy of three diagnostic tests. *Preventive Veterinary Medicine*, 85: 207-225.
- NIELSEN K., 2002. Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary Microbiology*, 90: 447-459.
- NIELSEN SS. AND TOFT N., 2002. Optimisation of the validity of ELISA and faecal culture tests for paratuberculosis: Selection of population or correction by population characteristics? Proc. 7th International Colloquium on Paratuberculosis, Bilbao, Spain, June 11-14, 2002, 400-405.

- NIELSEN K., SMITH P., YU W.L., ELMGREN C., HALBERT G., NICOLETTI P., PEREZ B., CONDE S., SAMARTINO L., NICOLA A., BERMUDEZ R., RENTERIA T., 2008. Validation of a second generation competitive enzyme immunoassay (CELISA) for the diagnosis of brucellosis in various species of domestic animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 125: 246-250.
- NORTON S., JOHNSON W.O., JONES G., HEUER C., 2010. Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease (*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*) in New Zealand dairy cows. , 22(3): 341-51.
- NUNEZ-TORRES E., DIAZ-APARICIO E., HERNANDEZ-ANDRADE L., TRIGO-TAVERA F., SUÁREZ-GÜEMES F., 1997. Sensitivity and specificity of an ELISA as a screening test for the diagnosis of *Brucella ovis* in sheep. *Revista latinoamericana de microbiología*, 39(3-4): 123.
- OAV (OFFICE ALIMENTAIRE ET VÉTÉRINAIRE), 2012. Final report of an audit carried out in France from 20 to 29 septembre 2011 in order to evaluate the implementation of animal health rules in respect of intra-union trade in cattle, 15 p.
- OIE (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH), 2011a. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Paris: OIE.
- OIE (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH), 2011b. *Terrestrial Animal Health Code*. Paris: OIE.
- OMS (ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE), 2006. La menace de pandémie de grippe et de maladies émergentes. [en-ligne], consulté le 20 mars 2012. Disponible sur [<http://www.who.int/mediacentre/events/2006/g8summit/influenza/fr/index.html>]
- ORR K.A., O'REILLY K.L., SCHOLL D.T., 2003. Estimation of sensitivity and specificity of two diagnostics tests for bovine immunodeficiency virus using Bayesian techniques. *Preventive Veterinary Medicine*, 61: 79-89.
- PAOLAGGI J.B., COSTE J., 2001. *Le raisonnement médical : de la science à la pratique clinique*. Paris : Estem, 269 p.
- PAOLICCHI F.A., BARTOLOMÉ J., PATITUCCI A., SOLANET C., CAMPERO C.M., 1992. Seguimiento clínico, serológico y bacteriológico en carneros naturalmente infectados con *Brucella ovis*. *Revista de Medicina Veterinaria*, 73: 46-52.
- PAYNE A., ROSSI S., LACOUR S.A., VALLÉE I., GARIN-BASTUJI B., SIMON G., HERVÉ S., PAVIO N., RICHOMME C., DUNOYER C., BRONNER A., HARS J., 2011. Bilan sanitaire vis-à-vis de la trichinellose, de la maladie d'Aujeszky, de la brucellose, de l'hépatite E et des virus influenza porcins en France. *Bulletin Epidémiologique Santé Animale et Alimentation*, 44: 2-8.
- PINCHES M.D., DIESEL G., HELPS C.R., TASKER S., EGAN K., GRUFFYDD-JONES T.J., 2007. An update on FIV and FeLV test performance using a Bayesian statistical approach. *Veterinary Clinical Pathology*, 36(2): 141-147.

- POLLOCK J.M., NEILL S.D., 2002. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *The Veterinary Journal*, 163(2): 115-127.
- POLLOCK J.M., MCNAIR J., BASSETT H., CASSIDY J.P., COSTELLO E., AGGERBECK H., ROSENKRANDS I., ANDERSEN P., 2003. Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identify tuberculosis-infected cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 1856-1860.
- PRAET N., DORNY P., SAEGERMAN C., MARCOTTY T., BERKVENNS D., 2006. Estimation de la prévalence d'une maladie et des caractéristiques des tests diagnostiques par une approche bayésienne. *Epidémiologie et Santé Animale*, 49: 113-130.
- PRAUD A., 2009. Risques zoonotiques liés à l'importation de Nouveaux Animaux de Compagnie, *Thèse de Médecine Vétérinaire*, Alfort, n°35, 233 p.
- PRAUD A., MOUTOU F., 2010. *Health risks from new companion animals*. Brussels: Eurogroup For Animals, 17 p.
- PRAUD A., GIMENEZ O., ZANELLA G., DUFOUR B., POZZI N., ANTRAS V., MEYER L., GARIN-BASTUJI B., 2012a. Estimation of sensitivity and specificity of five serological tests for the diagnosis of porcine brucellosis. *Preventive Veterinary Medicine*, 104: 94-100.
- PRAUD A., CHAMPION J.L., CORDE Y., DRAPEAU A., MEYER L., GARIN-BASTUJI B., 2012b. Assessment of diagnostic sensitivity and specificity of an indirect ELISA kit for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *BMC Veterinary Research*, 8: 68.
- PRAUD A., GIMENEZ O., ZANELLA G., DUFOUR B., POZZI N., ANTRAS V., MEYER L., GARIN-BASTUJI B. Evaluation of five serological tests for the diagnosis of porcine brucellosis in French Polynesia. *Tropical Animal Health and Production* (Accepté sous réserve de modifications).
- PRAUD A., BOSCHIROLI M.L., BÉNET J.J., MEYER L., GARIN-BASTUJI B., DUFOUR B. Evaluation of the efficiency of the gamma interferon test used in series after SICCT for the diagnosis of bovine tuberculosis in Côte d'Or (France). *Transboundary and Emerging Diseases* (En revision).
- PRITCHARD D.G., 1988. A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. *Journal of comparative pathology*, 9: 357-399.
- RAKOTOSAMIMANANA N., RAHARIMANGA V., ANDRIAMANDIMBY S.F., SOARES J.L., DOHERTY T.M., RATSITORAHINA M., RAMAROKOTO H., ZUMLA A., HUGGETT J., ROOK G., RICHARD V., GICQUEL B., RASOLOFO-RAZANAMPARANY V., 2010. Variation in Gamma Interferon Responses to Different Infecting Strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Acid-Fast Bacillus Smear-Positive Patients and Household Contacts in Antananarivo, Madagascar. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(7): 1094-1103.
- RIDGE, S.E., GALVIN, J.W., 2005. A comparison of two ELISAs for the detection of antibodies to bovine leucosis virus in bulk-milk. *Australian Veterinary Journal*, 83(7): 431-434.

- RITACCO V., LOPEZ B., DE KANTOR I.N., BARRERA L., ERRICO F., NADER A., 1991. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*, 50: 365-367.
- ROBBE-AUSTERMAN S., GARDNER I.A., THOMSEN B.V., MORRICAL D.G., MARTIN B.M., PALMER M.V., THOEN C.O., EWING C., 2006. Sensitivity and specificity of the agar-gel-immunodiffusion test, ELISA and the skin test for detection of paratuberculosis in United States Midwest sheep populations. *Veterinary Research*, 37: 553-564.
- ROSE N., BOUTROUILLE A., FABLET C., MADEC F., ELOIT M., PAVIO N., 2010. The use of Bayesian methods for evaluating the performance of a virus-like particles-based ELISA for serology of hepatitis E virus infection in swine. *Journal of Virological Methods*, 163:329-335.
- ROTHEL J.S., JONES S.L., CORNER L.A., COX J.C., WOOD P.R., 1990. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon – and its use for the detection of bovine tuberculosis in cattle. *Australian Veterinary Journal*, 67: 134-137.
- ROTHEL J.S., JONES S.L., CORNER L.A., COX J.C., WOOD P.R., 1992. The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole-blood culture. *Australian Veterinary Journal*, 69: 1-4.
- RUTJES A.W., REITSMA J.B., DI N.M., SMIDT N., VAN RIN J.C., BOSSUYT P.M., 2006. Evidence of bias and variation in diagnostic accuracy studies. *Canadian Medical Association Journal*, 174:469-76.
- RUTJES A.W.S., REITSMA J.B., COOMARASAMY A., KHAN K.S., BOSSUYT P.M.M., 2007. Evaluation of diagnostic tests when there is no gold standard. A review of methods. *Health Technology Assessment*, 11 (50): 72 p.
- RYAN T.J., BUDDLE B.M., DE LISLE G.W., 2000. An evaluation of the gamma-interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin testing. *Research in Veterinary Science*, 69: 57-61.
- SALMAN M.D., 2009. The role of veterinary epidemiology in combating infectious animal diseases on a global scale: The impact of training and outreach programs. *Preventive Veterinary Medicine*, 92: 284-287.
- SANCRISTOBAL M., CHEVALET C., HALEY C.S., JOOSTEN R., RATTINK P., HARLIZIUS B., GROENEN M.A.M, AMIGUES Y., BOSCHER M.Y., RUSSELL G., LAW A., DAVOLI R., RUSSO V., DÉSAUTÉS C., ALDERSON L., FIMLAND E., BAGGA M., DELGADO J.V., VEGAS-PLA J.L., MARTINEZ A.M., RAMOS M., GLODEK P., MEYER N., GANDINI G.C., MATASSINO D., PLASTOW G.S., SIGGENS K.W., LAVAL G., ARCHIBALD A.L., MILAN D., HAMMOND K., CARDELLINO R., 2006. Genetic diversity within and between European pig breeds using microsatellite markers. *Animal Genetics*, 37 (3): 189-198.
- SCHILLER I., OESCH B., VORDERMEIER M., PALMER M.V., HARRIS B.N., ORLOSKI K.A., BUDDLE B.M., THACKER T.C., LYASHCHENKO K.P., WATERS W.R., 2010. Bovine tuberculosis: A review of current and emerging

- diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication, 57(4): 205-220.
- SCHUMAKER B.A., CORSO B.A., RHYAN J.C., PHILO L.M., SALMAN M.D., GARDNER I.A., 2010. Evaluation of the fluorescence polarization assay for the detection of *Brucella abortus* antibodies in bison in a natural setting. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 33: e119-e125.
- SCOTT M.C., BANNANTINE J.P., KANEKO Y., BRANSCUM A.J., WHITLOCK R.H., MORI Y., SPEER C.A., EDA S., 2010. Absorbed EVELISA: a diagnostic test with improved specificity for Johne's disease in cattle. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(11):1291-1296.
- SEARSON J., 1982. Sensitivity and specificity of two microtitre complement fixation tests for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Australian Veterinary Journal*, 58(1): 5-7.
- SEEGERS H., EZANNO P., KREBS S., RAT-ASPERT O., VIET A.F., BELLOC C., CHARRON M., MALHER X., FOURICHON C., 2011. Modélisation et aide aux décisions en gestion de la santé animale. *Rencontres Recherche Ruminants*, 18 : 4-10.
- SERGEANT E.S.G., WHITTINGTON R.J., MORE S.J., 2002. Sensitivity and specificity of pooled faecal culture and serology as flock-screening tests for the detection of ovine paratuberculosis in Australia. *Preventive Veterinary Medicine*, 52: 199-211.
- SILVA PAULO P., VIGLIOCCO A.M., RAMONDINO R.F., MARTICORENA D., BISSI E., BRIONES G., GORCHS C., GALL D., NIELSEN K., 2000. Evaluation of primary binding assays for presumptive serodiagnosis of swine brucellosis in Argentina. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7: 828-831.
- SMITH R.D., 1992. Evaluation of diagnostic tests. In: *Veterinary clinical epidemiology. A problem oriented approach*. Boca Raton: CRC Press, 31-43.
- SNIDER D.E., 1982. The tuberculin skin test. *American review of respiratory diseases*, 125 (3[2]): 108-118.
- SPANGLER E., BECH-NIELSEN S., HEIDER L.E., 1992. Diagnostic performance of two tests and faecal culture for subclinical paratuberculosis and associations with production. *Preventive Veterinary Medicine*, 13: 185-195.
- SPENCER T., BURGESS G., 1984. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Brucella ovis* specific antibody in ram sera. *Research in veterinary science*, 36(2):194.
- SPIEGELHALTER D.J., BEST N.G., CARLIN B.P., VAN DER LINDE A., 2002. Bayesian measures of model complexity and fit. *Journal of Royal Statistic Society B.*, 64: 583-639.
- SURVEPI, 2011. Plateforme Nationale de surveillance épidémiologique en santé animale. [en-ligne], consulté le 20 mars 2012, mis à jour le 29 novembre 2011. Disponible sur : [http://www.survepi.org/cerepi/index.php?option=com_content&view=article&id=51&Itemid=97].

- SWETS J.A., 1988. Measuring the accuracy of diagnosis system. *Science*, 240: 1285-93.
- THORNLEY J.H.M., FRANCE J., 2009. Modeling foot and mouth disease. *Preventive Veterinary Medicine*, 89 (3-4): 139-154.
- TIMMERMANS D., 1994. The roles of experience and domain of expertise in using numerical and verbal probability terms in medical decisions. *Medical Decision Making*, 14: 146-156.
- TOFT N., ÅKERSTEDT J., THARALDSEN J., HOPP P., 2007. Evaluation of three serological tests for diagnosis of Maedi-Visna virus infection using latent class analysis. *Veterinary Microbiology*, 120: 77-86.
- TOMA B., DUFOUR B., BÉNET J.J., SANAA M., SHAW A., MOUTOU F., 2010. *Epidémiologie appliquée à la lutte contre les maladies animales transmissibles majeures*, 3^{ème} éd. Maisons-Alfort : AEEMA, 600 p.
- VACEK P.M., 1985. The effect of conditional dependence on the evaluation of diagnostic tests. *Biometrics*, 41: 959-968.
- VALLE P.S., MARTIN S.W., SKJERVE E., 2001. A Bayesian approach to estimating the performance of a bovine virus diarrhoea virus (BVDV) antibody ELISA bulk-tank milk test. *Preventive Veterinary Medicine*, 50: 71-87.
- VANDEBUSSCHE F., VANBINST T., VERHEYDEN B., VAN DESSEL W., DEMEESTERE L., HOUDART P., BERTELS G., PRAET N., BERKVEN D., MINTIENS K., GORIS N., DE CLERCQ K., 2008. Evaluation of antibody-ELISA and real-time RT-PCR for the diagnosis and profiling of bluetongue virus serotype 8 during the epidemic in Belgium in 2006. *Veterinary Microbiology*, 129(1,2): 15-27.
- VAN DER GOOT J.A., ENGEL B., VAN DE WATER S.G.P., BUIST W., DE JONG M.C.M., KOCH G., VAN BOVEN M., STEGEMAN A., 2010. Validation of diagnostic tests for detection of avian influenza in vaccinated chickens using Bayesian analysis. *Vaccine*, 28: 1771-1777.
- VAN SHAIKE G., HARO F., MELLA A., KRUIZE J., 2007. Bayesian analysis to validate a commercial ELISA to detect paratuberculosis in dairy herds of southern Chile. *Preventive Veterinary Medicine*, 79: 59-69.
- VIGLIOCCO A.M., SILVA PAULO P.S., MESTRE J., BRIONES G.C., DRAGHI G., TOSSI M., NIELSEN K., 1997. Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of ovine antibody to *Brucella ovis*. *Veterinary microbiology*, 54(3-4):357-368.
- VOSE D., 2008. *Risk analysis : a quantitative guide*, 3rd ed. Chichester : John Wiley & sons, 735 p.
- WAGNER B., FREER H., ROLLINS A., ERB H.N., LU Z., GRÖHN Y., 2011. Development of a multiplex assay for the detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in horses and its validation using Bayesian and conventional statistical methods. *Veterinary immunology and Immunopathology*, 144: 374-381.
- WATERS W.R., NONNECKE B.J., OLSEN S.C., PALMER M.V., 2007. Effects of pre-culture holding time and temperature on interferon-gamma responses in whole blood cultures from *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Veterinary Microbiology*, 119(2-4):277-282.

- WEBER M.F, VERHOEFF J., VAN SCHAİK G., VAN MAANEN C., 2009. Evaluation of Ziehl-Neelsen stained faecal smear and ELISA as tools for surveillance of clinical paratuberculosis in cattle in the Netherlands. *Preventive Veterinary Medicine*, 92(3):256-66.
- WEINSTEIN S., OBUCHOWSKI N.A., LIEBER M.L., 2005. Clinical evaluation of diagnostic tests. *American Journal of Roentgenology* 2005, 184(1):14.
- WELLS S.J., COLLINS M.T., FAABERG K.S., WEES C., TAVORNPANICH S., PETRINI K., COLLINS J.E., CERNICCHIARO N., WHITLOCK R.H., 2006. Evaluation of a rapid fecal PCR test for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(10): 1125-1130.
- WHATMORE A.M., MURPHY T.J., SHANKSTER S., YOUNG E., CUTLER S.J., MACMILLAN A.P., 2005. Use of amplified fragment length polymorphism to identify and type *Brucella* isolates of medical and veterinary interest. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 761-769.
- WILKINS W., WALDNER C., RAJIĆ A., MCFALL M., MUCKLE A., MAINAR-JAIME R.C., 2010. Comparison of bacterial culture and real-time PCR for the detection of Salmonella in grow-finish pigs in Western Canada using a Bayesian approach. *Zoonoses and Public Health*. 57 Suppl. 1:115-120.
- WOLDEMARIAM E., BOUMA A., VERNOOIJ J.C.M., STEGEMAN A., 2008. The sensitivity and specificity of fecal and cecal culture for the detection of *Campylobacter* in Dutch broiler flocks quantified by Bayesian analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 121: 308-312.
- WOOD P.R., CORNER L.A., ROTHEL J.S., BALDOCK C., JONES S.L., COUSINS D.B., MCCORNICK B.S., FRANCIS B.R., CREEPER J., TWEEDLE N.F., 1991. Field comparison of the interferon-gamma assay and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Australian Veterinary Journal*, 68: 286-290.
- WOOD P.R., ROTHEL J.S., 1994. In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, 40: 125-135.
- WOOD P.R., JONES S.L., 2001. Bovigam: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, 81: 147-155.
- WORTHINGTON R., STEVENSON B., DE LISLE G., 1985. Serology and semen culture for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in chronically infected rams. *New Zealand Veterinary Journal*, 33(6): 84-86.
- ZINSSTAG J., SCHELLING E., WALTNER-TOEWS D., TANNER M., 2011. From "one medicine" to "one health" and systemic approaches to health and well-being. *Preventive Veterinary Medicine*. 101: 148-156.

ANNEXES

Annexe 1 : PRAUD A., GIMENEZ O., ZANELLA G., DUFOUR B., POZZI N., ANTRAS V., MEYER L., GARIN-BASTUJI B. (2012) Estimation of sensitivity and specificity of five serological tests for the diagnosis of porcine brucellosis. *Preventive Veterinary Medicine*, 104: 94-100

Preventive Veterinary Medicine 104 (2012) 94–100



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Preventive Veterinary Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/prevetmed



Estimation of sensitivity and specificity of five serological tests for the diagnosis of porcine brucellosis

Anne Praud^a, Olivier Gimenez^b, Gina Zanella^c, Barbara Dufour^a, Nathalie Pozzi^d, Valérie Antras^e, Laurence Meyer^{f,g}, Bruno Garin-Bastuji^{h,*}

^a National Veterinary School of Alfort (ENVA)/French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety (ANSES), USC Epidemiology of Animal Infectious Diseases Unit (Epi-MAI), 94700 Maisons-Alfort, France

^b Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, UMR 5175, 34293 Montpellier Cedex 5, France

^c ANSES, Animal Health Laboratory, Epidemiology Unit, 94706 Maisons-Alfort Cedex, France

^d National Laboratory for the Control of Breeding Animals, 94704 Maisons-Alfort, France

^e Service of Rural Development, Papeete, French Polynesia

^f INSERM, Centre for Research in Epidemiology and Population Health (CESP), U1018, Université Paris-Sud, Faculté de Médecine Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France

^g AP-HP, Hôpital Bicêtre, Epidemiology and Public Health Service, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France

^h ANSES, Animal Health Laboratory, EU/OIE/FAO Brucellosis Reference Laboratory, Bacterial Zoonoses Unit, 23 Avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 June 2010

Received in revised form

27 September 2011

Accepted 29 October 2011

Keywords:

Bayesian model

Brucella suis

Diagnostic tests

Sensitivity

Specificity

ABSTRACT

While serological tests are essential in surveillance and control programs of animal diseases, to date none of the common serological tests approved in the EU (complement fixation test or Rose-Bengal test) has been shown to be reliable in routine individual diagnosis of porcine brucellosis, and some more recent tests like ELISA have not been fully evaluated yet. In the absence of a gold standard, this study allowed the estimation of sensitivities and specificities of these tests with a Bayesian approach using Markov Chain Monte Carlo algorithms.

The pig population that was tested included 6422 animals from Metropolitan France. Serum samples were collected from a large population of pigs, representative of European swine population and tested with five brucellosis serological tests: Rose-Bengal test (RBT), fluorescence polarization assay (FPA), indirect ELISA (I-ELISA) and two competitive ELISAs (C-ELISA). The sensitivity and the specificity of each test were estimated. When doubtful results were excluded, the most sensitive and specific test was C-ELISA₂ (Se C-ELISA₂ = 0.964, [0.907; 0.994], 95% credibility interval (CrI); Sp C-ELISA₂ = 0.996, [0.982; 1.0], 95% CrI).

When doubtful results were considered as negative, C-ELISA₂ was still the most sensitive and specific test (Se C-ELISA₂ = 0.960, [0.896; 0.994], 95% CrI and Sp C-ELISA₂ = 0.994, [0.977; 0.999], 95% CrI). The same conclusions were reached when doubtful results were considered as positive (Se C-ELISA₂ = 0.963, [0.904, 0.994], 95% CrI and Sp C-ELISA₂ = 0.996, [0.986; 1.0], 95% CrI).

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author. Tel.: +33 149 771 323; fax: +33 149 771 344.
E-mail address: Bruno.Garin-Bastuji@anses.fr (B. Garin-Bastuji).

1. Introduction

In France, until the 1970s, porcine brucellosis was limited to small domestic farms. Nowadays, while the pig industry is free of the disease, outbreaks occur sporadically. From 1993 to 2009, 60 outbreaks, of which 54 were

confirmed as due to *Brucella suis* biovar 2, were reported in 30 French districts. All of them concerned outdoor rearing farms and available data suggest that currently wild boars or hares are the main source of infection of domestic pigs (EFSA, 2009).

Diagnosis of porcine brucellosis is based on the observation of clinical signs (*i.e.* abortion, infertility, orchitis or more rarely arthritis), associated with positive serology and/or *Brucella* isolation. Currently, in France and the EU, serological surveillance of porcine brucellosis is required only for breeding hogs and intra-community trade. However, in France, as soon as a brucellosis outbreak is confirmed, the corresponding farm is depopulated.

No reference test (or “gold standard”) is currently available and, to date, none of the available serological tests has been shown to be reliable in routine individual diagnosis to be used as an only test. Isolation of *B. suis* is a good positive standard, but no good negative standard has been identified. Commonly used serological tests, *e.g.* Rose-Bengal test (RBT) and complement fixation test (CFT) (OIE, 2009), have an acceptable sensitivity that allows the use of the test to classify herds (EFSA, 2009). However, tests available and prescribed by the OIE (World Organisation for Animal Health) suffer from a lack of specificity (OIE, 2008, 2009). ELISA tests could replace the RBT and CFT because of their high sensitivity and specificity but have not yet been fully evaluated and standardized for use in pigs. Some studies have been carried out to estimate the sensitivity and the specificity of these tests, but in specific contexts and different species (Gall et al., 1998, 2003; Silva Paulo et al., 2000; Nielsen, 2002; Gall and Nielsen, 2004; Muñoz et al., 2005; EFSA, 2009; Muma et al., 2009; Nielsen et al., 2008) and only a few studies dealt with screening in pigs (Silva Paulo et al., 2000; Muma et al., 2009; Nielsen et al., 2008).

This makes difficult the interpretation of positive results obtained from animals controlled for trade or artificial insemination purpose and hampers the implementation of surveillance programs with brucellosis-free status definition.

Our study aimed at estimating the sensitivity and the specificity of five serological tests for the diagnosis of porcine brucellosis. We studied a population of French pigs, with genetic characteristics and breeding conditions similar to those of most pigs from European countries, allowing an extrapolation to this general population.

To do so, we used a Bayesian approach implemented via Markov Chain Monte Carlo algorithms. This approach is frequently used in human and veterinary medicine (Meyer et al., 2009) to estimate sensitivities and specificities of tests in the absence of a gold standard (Branscum et al., 2005; Rutjes et al., 2007).

2. Materials and methods

2.1. Data collection

The study included sera from 6422 pigs in Metropolitan France. Pigs were randomly selected from various farms, considered as free or infected. 1799 pigs from 32 outdoor farms were included in the analysis. In these 32 farms, an

outbreak of porcine brucellosis, confirmed by the isolation of *B. suis* biovar 2 on at least one animal, had occurred 6–12 months earlier. In these farms, all pigs were tested. The number of animals tested ranged from 1 to 181 animals (mean = 56 animals; median = 35 animals).

The remaining 4623 pigs (hogs) were selected primarily in officially brucellosis free artificial insemination (AI) units (96.6%; 4466 pigs) and the rest from industrial pig breeding farms (3.4%; 157 pigs). These 4623 pigs were randomly selected among the breeding animals tested by the National Laboratory for the Control of Breeding Animals. They did not present any clinical evidence of brucellosis and were reared without any contact with wild reservoirs of brucellosis. Most of them were Large White, French Landrace and Piétrain.

Each serum sample was subjected to five serological tests. Blood samples were collected from 1997 and 2005, specifically for this research project.

2.2. Diagnostic tests

We studied five serological tests: (i) Rose-Bengal test (RBT), Institut Pourquier (France); (ii) fluorescence polarization assay (FPA), *B. abortus* antibody test kit, Diachemix/Prionics (Switzerland); (iii) indirect enzyme immunoassay (I-ELISA), Chekit *B. suis*, Idexx-Bommeli (Switzerland); (iv) competitive enzyme immunoassay (C-ELISA₁ and C-ELISA₂), respectively SVANOVIR® *Brucella*-Ab C-ELISA, Svanova (Sweden) and Compelisa, VLA (United Kingdom). The general principles of these tests are described in OIE (2009). C-ELISA₁ and C-ELISA₂ are based on different immunological principles: (i) the anti-S-LPS (smooth lipopolysaccharide major outer-membrane antigen) monoclonal antibody, competing with the pig antibody for binding to the S-LPS coated on the plate during the first incubation step is different and (ii), while in C-ELISA₁ the amount of monoclonal antibody bounded to the antigen is measured thanks to an anti-mouse conjugate, in C-ELISA₂, the monoclonal antibody is itself conjugated to the enzyme. To our knowledge, the properties of these two C-ELISA had not been compared but were expected to be different.

The RBT antigen was standardized according to OIE and EU requirements (OIE, 2008; EU, 2008). Cut-offs were as recommended by the tests manufacturers for the other tests (FPA = 20; I-ELISA > 70%; C-ELISA₁ ≥ 30%; C-ELISA₂ ≤ 60%). With FPA and I-ELISA, results could be “negative”, “positive” or “doubtful”.

Serological analyses were performed by a unique laboratory, the EU/OIE/FAO Brucellosis Reference Laboratory (ANSES, Maisons-Alfort; France) in order to limit bias linked to the tests performance. Samples were identified by a code number and tests were performed without knowing the results to the other tests. Results to the five tests were compared after having been merged in a database.

Animals with doubtful results were first excluded in the main analysis. They were further included in the model, considering them as either (i) negative results or (ii) positive results, in order to study their influence on the estimation of the parameters of interest.

Table 1
Parameters of the beta (a, b) prior distributions.

Parameter of interest		Lower limit 95%	Mean	Beta (a, b)	
				a	b
RBT	Se	0.75	0.86	33.37	5.432
	Sp	0.76	0.88	24.93	3.400
FPA	Se	0.87	0.92	107.4	9.341
	Sp	0.91	0.97	30.39	0.940
I-ELISA	Se	0.94	0.98	47.04	0.960
	Sp	0.94	0.98	47.04	0.960
C-ELISA	Se	0.91	0.96	58.02	2.418
	Sp	0.76	0.92	9.660	0.840

2.3. Statistical methods

A Bayesian approach was used to estimate the sensitivity and the specificity of the five tests without gold standard.

The Bayesian approach is based on the introduction of prior information, from literature and experts' advice. Since all parameters (sensitivity of the five tests, specificity of the five tests and prevalence in the population) were probabilities, their prior distributions were modelled as beta distributions (Johnson and Gastwirth, 1991; Praet et al., 2006).

To construct a beta prior distribution, the most probable value of the parameter (or "best guess"; θ_0) and a "lower limit" (θ_L ; *i.e.* a value for which the experimenter is 95% sure that the parameter will be larger) were determined (Enøe et al., 2000).

As sensitivities and specificities of screening tests in swine were not well known, diffuse prior distributions were introduced in the model. Means and lower limits were determined using literature data on brucellosis tests in various species (cattle, swine and small ruminants). Mean sensitivities ranged from 0.597 to 1 for RBT, 0.72 to 0.993 for FPA, 0.96 to 1 for I-ELISA and 0.905 to 0.988 for C-ELISA. Mean specificities ranged from 0.81 to 1 for RBT, 0.93 to 0.984 for FPA, 0.938 to 1 for I-ELISA and 0.60 to 1 for C-ELISA (Gall et al., 1998, 2003; Silva Paulo et al., 2000; Nielsen, 2002; Gall and Nielsen, 2004; Muñoz et al., 2005; EFSA, 2009; Muma et al., 2009; Nielsen et al., 2008).

Then, parameters a and b were calculated for each parameter (Enøe et al., 2000). In the case of beta (a, b) priors, the mode of the distribution is given by the formula $\theta_0 = (a - 1)/(a + b - 2)$ when $a > 1$ and zero otherwise. Solving this equation, $a = 1 + \theta_0 (b - 2)/(1 - \theta_0)$. So for a given guess (θ_0) and a given value of b , a is determined. Once a pair (a, b) has been obtained, software like R can be used to determine whether the appropriate percentile of the specified beta (a, b) distribution is θ_0 . If this constraint is not satisfied, another b is selected and the appropriate a is calculated. The process is repeated until a beta (a, b) distribution that satisfies the constraints posed by the prior specification is identified. The distribution is then presented graphically to the subject matter experts for verification; if not satisfactory, the process is repeated with another type of distribution. If $a < 1$ is appropriate, then

since the formula for the mode cannot be used, one can equate $\theta_0 = a/(a + b)$ (which is the mean of the beta distribution) and proceed as described above. Best guesses, upper limits and distribution parameters are provided in Table 1.

Prevalence in the population was unknown: beta (1, 1) uninformative distribution (which correspond to uniform distribution between 0 and 1) was used as prior for prevalence.

Posterior distributions of the parameters were obtained using Markov chain Monte Carlo (MCMC) techniques (Gelman et al., 1995), and summarized using the mean and 95% credible interval (0.25th and 0.95th percentiles) (Enøe et al., 2000; Branscum et al., 2005). The analysis was performed with program WinBUGS (Lunn et al., 2000).

The convergence of the MCMC algorithm was assessed by checking the stabilisation of the plots of iterate values of parameters, after a given number of samples and by running multiple chains from dispersed starting values. Early samples were discarded as a "burn-in" period (1000 samples among 51,000).

The model presumed that the tests were conditionally dependent and allowed to estimate the Se and Sp covariances of the tests (Gardner et al., 2000). It was an adaptation of the multiple tests model developed by Berkvens et al. (2006). The sensitivity and the specificity of the five tests were estimated (five test-one population model). The number of parameters of the model was 63 (prevalence, sensitivity and specificity of the first test, two conditional sensitivities and two conditional specificities for the second test, four conditional sensitivities and four conditional specificities for the third test, eight conditional sensitivities and eight conditional specificities for the fourth test, and 16 conditional sensitivities and 16 conditional specificities for the fifth test). This model was inestimable because the data (32 'classes' of test results) provide only 31 degrees of freedom. This issue was handled introducing informative priors in the model (Dendukuri and Joseph, 2001; Rutjes et al., 2007). The components of the vector, defined as conditional probabilities, are given in Table 2.

The multinomial probability of test-outcome combinations is given in Appendix 1. Parameters of interest, *i.e.* sensitivities (Se) of the five tests, specificities (Sp) of the five tests (Appendix 2) and sensitivity and specificity covariances (CovSe and CovSp, respectively) were defined as

Table 2
Conditional probabilities for a five test-model.

Prevalence = $P(D^+)$	p1	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^+ \cap T_4^-)$	p33
$Se_1 = P(T_1^+ D^+)$	p2	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^- \cap T_4^+)$	p34
$Sp_1 = P(T_1^- D^-)$	p3	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^- \cap T_4^-)$	p35
$P(T_2^+ D^+ \cap T_1^+)$	p4	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^- \cap T_3^- \cap T_4^+)$	p36
$P(T_2^+ D^+ \cap T_1^-)$	p5	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^- \cap T_3^+ \cap T_4^-)$	p37
$P(T_2^- D^- \cap T_1^-)$	p6	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^- \cap T_3^- \cap T_4^+)$	p38
$P(T_2^- D^- \cap T_1^+)$	p7	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^- \cap T_3^- \cap T_4^-)$	p39
$P(T_3^- D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^+)$	p8	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^- \cap T_2^+ \cap T_3^+ \cap T_4^+)$	p40
$P(T_3^- D^+ \cap T_1^- \cap T_2^-)$	p9	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^- \cap T_2^+ \cap T_3^+ \cap T_4^-)$	p41
$P(T_3^- D^+ \cap T_1^- \cap T_2^+)$	p10	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^- \cap T_2^+ \cap T_3^- \cap T_4^+)$	p42
$P(T_3^- D^+ \cap T_1^- \cap T_2^-)$	p11	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^- \cap T_2^+ \cap T_3^- \cap T_4^-)$	p43
$P(T_3^- D^+ \cap T_1^- \cap T_2^+)$	p12	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^+ \cap T_4^+)$	p44
$P(T_3^- D^+ \cap T_1^- \cap T_2^-)$	p13	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^+ \cap T_4^-)$	p45
$P(T_3^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^-)$	p14	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^- \cap T_4^+)$	p46
$P(T_3^- D^- \cap T_1^+ \cap T_2^+)$	p15	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^- \cap T_4^-)$	p47
$P(T_4^+ D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^+)$	p16	$P(T_5^+ D^+ \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^- \cap T_4^-)$	p48
$P(T_4^+ D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^-)$	p17	$P(T_5^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^- \cap T_4^+)$	p49
$P(T_4^+ D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^- \cap T_3^+)$	p18	$P(T_5^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^+ \cap T_4^-)$	p50
$P(T_4^+ D^+ \cap T_1^+ \cap T_2^- \cap T_3^-)$	p19	$P(T_5^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^+ \cap T_4^+)$	p51
$P(T_4^+ D^+ \cap T_1^- \cap T_2^+ \cap T_3^+)$	p20	$P(T_5^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^+ \cap T_3^- \cap T_4^-)$	p52
$P(T_4^+ D^+ \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^-)$	p21	$P(T_5^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^+ \cap T_3^- \cap T_4^+)$	p53
$P(T_4^+ D^+ \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^+)$	p22	$P(T_5^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^+ \cap T_3^+ \cap T_4^-)$	p54
$P(T_4^+ D^+ \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^-)$	p23	$P(T_5^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^+ \cap T_3^+ \cap T_4^+)$	p55
$P(T_4^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^-)$	p24	$P(T_5^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^- \cap T_4^-)$	p56
$P(T_4^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^+)$	p25	$P(T_5^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^- \cap T_4^+)$	p57
$P(T_4^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^+ \cap T_3^-)$	p26	$P(T_5^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^+ \cap T_4^-)$	p58
$P(T_4^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^+ \cap T_3^+)$	p27	$P(T_5^- D^- \cap T_1^- \cap T_2^- \cap T_3^+ \cap T_4^+)$	p59
$P(T_4^- D^- \cap T_1^+ \cap T_2^- \cap T_3^-)$	p28	$P(T_5^- D^- \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^- \cap T_4^-)$	p60
$P(T_4^- D^- \cap T_1^+ \cap T_2^- \cap T_3^+)$	p29	$P(T_5^- D^- \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^- \cap T_4^+)$	p61
$P(T_4^- D^- \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^-)$	p30	$P(T_5^- D^- \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^+ \cap T_4^-)$	p62
$P(T_4^- D^- \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^+)$	p31	$P(T_5^- D^- \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^+ \cap T_4^+)$	p63
$P(T_5^+ D^- \cap T_1^+ \cap T_2^+ \cap T_3^+ \cap T_4^+)$	p32		

functions of the model parameters. For detailed information on conditional dependence in this model, we refer readers to Berkvens et al. (2006) and Praet et al. (2006). The WinBUGS code is available in Appendix 3.

To compare the models, we used the deviance information criterion (DIC; Spiegelhalter et al., 2002). Essentially, the DIC is a diagnostic tool that balances the requirements of model fit and low complexity. Typically, as models get more complex by the addition of extra parameters, their fit improves. The DIC diagnosis therefore penalizes additional parameters so that a parsimonious model is chosen, and the smaller the DIC value, the better the compromise is. One advantage is that the DIC can be calculated directly in WinBUGS from the chains produced by an MCMC run and can be applied in a variety of contexts (Spiegelhalter et al., 2002).

The results were compared by examining their 95% credibility intervals (CrI). According to Enøe et al. (2000), a credibility interval can be interpreted to mean that one is 95% sure that the corresponding parameter is in this interval. If two credibility intervals do not overlap, the parameters can be considered as different.

3. Results

3.1. Description of tests results

In the “free” population, most of the pigs (84.1%) showed negative results with all the five tests. In the “infected” population, 56.9% of the pigs had a positive outcome in at least one test.

697 pigs (10.9%) of 6422 got doubtful results. Most of them belonged to presumed free population. The results of the 5725 pigs without doubtful results are summarized in Table 3.

3.2. Estimations of sensitivities and specificities when doubtful results were excluded

The results are displayed in Table 4. Estimated prevalence was 0.121 ([0.105; 0.134], 95% CrI). C-ELISA₂ was the most sensitive and specific test (Se C-ELISA₂ = 0.964, [0.907; 0.994], 95% CrI; Sp C-ELISA₂ = 0.996, [0.982; 1.0], 95% CrI). C-ELISA₁ was a little less sensitive and specific than C-ELISA₂ (Se C-ELISA₁ = 0.953, [0.906; 0.989], 95% CrI and Sp C-ELISA₁ = 0.956, [0.942; 0.966], 95% CrI).

I-ELISA had the worst sensitivity (Se I-ELISA = 0.663, [0.607; 0.710], 95% CrI) and FPA the worst specificity (Sp FPA = 0.930, [0.917; 0.941], 95% CrI).

Our analysis indicated low to moderate average sensitivity and specificity covariances, with only one negative covariance (CovSe_{I-ELISA-RBT}). The average estimates of CovSe and CovSp ranged from -0.0015 to 0.0362. C-ELISA₁ and RBT had the higher sensitivity covariance (CovSe_{C-ELISA1-RBT} = 0.0210; [0.00319; 0.0470], 95% CrI) and I-ELISA and FPA had the higher specificity covariance (CovSp_{I-ELISA-FPA} = 0.0362 [0.0198; 0.0329], 95% CrI). The 95% CrI of CovSe included 0 for five pairs of tests and the 95% CrI of CovSp included 0 for one pair of tests. The fourteen other intervals included strictly positive values. Results are detailed in Appendix 4.

Table 3

Cross-classified test results in 5725 pigs in two subpopulations (697 pigs with doubtful results in FPA and/or I-ELISA excluded).

Tests results					Subpopulation	
RBT	FPA	I-ELISA	C-ELISA ₁	C-ELISA ₂	"Infected"	"Free"
0	0	0	0	0	700	3889
1	0	0	0	0	29	26
0	1	0	0	0	47	43
1	1	0	0	0	17	12
0	0	1	0	0	3	1
1	0	1	0	0	0	0
0	1	1	0	0	9	33
1	1	1	0	0	1	6
0	0	0	1	0	7	20
1	0	0	1	0	8	0
0	1	0	1	0	7	9
1	1	0	1	0	64	8
0	0	1	1	0	1	0
1	0	1	1	0	4	0
0	1	1	1	0	20	4
1	1	1	1	0	70	0
0	0	0	0	1	0	10
1	0	0	0	1	0	0
0	1	0	0	1	1	0
1	1	0	0	1	3	3
0	0	1	0	1	0	0
1	0	1	0	1	0	0
0	1	1	0	1	2	4
1	1	1	0	1	3	2
0	0	0	1	1	0	0
1	0	0	1	1	3	1
0	1	0	1	1	7	5
1	1	0	1	1	167	24
0	0	1	1	1	3	0
1	0	1	1	1	12	0
0	1	1	1	1	46	2
1	1	1	1	1	373	16
Total					1607	4118

0: negative result; 1: positive result.

Table 4

Estimates of the sensitivity and the specificity of the five tests, doubtful results excluded (95% credibility intervals (95% CrI) are also provided).

Parameter		Average estimate [95% CrI]
RBT	Se	0.876 [0.835; 0.913]
	Sp	0.951 [0.939; 0.959]
FPA	Se	0.937 [0.890; 0.970]
	Sp	0.930 [0.917; 0.941]
I-ELISA	Se	0.663 [0.607; 0.710]
	Sp	0.969 [0.958; 0.976]
C-ELISA ₁	Se	0.953 [0.906; 0.989]
	Sp	0.956 [0.942; 0.966]
C-ELISA ₂	Se	0.964 [0.907; 0.994]
	Sp	0.996 [0.982; 1.0]
Prevalence		0.121 [0.105; 0.134]

3.3. Estimations of sensitivities and specificities when doubtful results were taken into account

Introducing the doubtful results in the study did not change the results.

When doubtful results were considered as negative results, C-ELISA₂ remained the most sensitive and specific (Se C-ELISA₂ = 0.960, [0.896; 0.994], 95% CrI and Sp

C-ELISA₂ = 0.994, [0.977; 0.999], 95% CrI). I-ELISA was still the less sensitive test (Se I-ELISA = 0.664 [0.612; 0.717], 95% CrI) and FPA the less specific one (Sp FPA = 0.929 [0.913; 0.940], 95% CrI).

When doubtful results were considered as positive results, the same conclusions were reached (Se C-ELISA₂ = 0.963, [0.904; 0.994], 95% CrI and Sp C-ELISA₂ = 0.996, [0.986; 1.0], 95% CrI; Se I-ELISA = 0.687 [0.639; 0.730], 95% CrI and Sp FPA = 0.830 [0.817; 0.841], 95% CrI).

Values of DIC were respectively 168, 173 and 174 for the three hypotheses (doubtful excluded, considered as negative or considered as positive).

3.4. Sensitivity analysis results

To analyse the sensitivity of the model, we repeated the analyses by making the prior distributions for the sensitivity and specificity parameters progressively more diffuse (Enøe et al., 2000). Average estimates of parameters were minimally affected and the most/least sensitive and specific tests were the same ones as in the main analysis. For instance, when sensitivities and specificities of the tests were modelled as beta (1, 1) distributions, C-ELISA₂ sensitivity was 0.867 (95% CrI: [0.447; 0.997]), and C-ELISA₂ specificity was 0.977 (95% CrI: [0.908; 1.0]).

We performed an analysis estimating the parameters for only three or four tests among five (respectively three test-one population and four test-one population models). Parameters estimates were not different from the results of the five test-one population model. For instance, average values of Se C-ELISA₂ varied from 0.963 to 0.964 and average values of Sp C-ELISA₂ varied from 0.995 to 0.997.

4. Discussion

The characteristics of the five studied tests were estimated through a Bayesian approach. This approach is frequently used in evaluation of diagnostic tests, in veterinary or human medicine (Meyer et al., 2009). It offers some advantages over frequentist methods.

Its main interest is the possibility to take into account prior information about tests accuracy or prevalence in the form of experts' opinion or literature data. Priors should be generated independently of the study. According to Enøe et al. (2000), the best solution would be to use information collected in similar studies. As explained below, only a few studies have dealt with porcine brucellosis diagnostic tests and they were performed in different contexts and areas. For each parameter, means and lower limits were determined on brucellosis tests in various species (cattle, swine and small ruminants) (Gall et al., 1998, 2003; Silva Paulo et al., 2000; Nielsen, 2002; Gall and Nielsen, 2004; Muñoz et al., 2005; EFSA, 2009; Muma et al., 2009; Nielsen et al., 2008), in order to take into account the large range of the values.

Another advantage of the Bayesian method is that it provides true probability intervals (credibility interval contains the true parameter with 95% certainty), whereas a 95% frequentist confidence interval is considered to contain the true parameter value in 95% of the times (Enøe et al.,

2000). The width of the credibility intervals also depends on the adaptation of the prior distributions to the data. The prior distributions used in this study might not be ideal, but reflect the central tendency and variation of the sensitivity and specificity of the respective tests in previous studies about detection of *B. suis* in pigs.

Bayesian analyses of diagnostic test accuracy require a sensitivity analysis and the assumption of accuracy among the population. If this hypothesis is not perfectly verified, estimates of sensitivity and specificity might be biased. Johnson et al. (2009) recommend separate analyses of tests to evaluate the variation of the parameters of interest. Additional analyses performed as sensitivity analysis tend to prove that the assumption of accuracy among population is verified in our study.

Tests were considered as conditionally dependent. Two tests are said to be independent if, given that an animal is diseased (or not), the probability of positive (or negative) outcome for the first test is the same whatever the outcome for the other test (Enøe et al., 2000). The five tests studied are based on the same biological process (Nielsen, 2002): they detect anti-*Brucella*-S-LPS antibodies and can therefore be expected to be conditionally dependent (Gardner et al., 2000). Taking into account this dependence was essential; otherwise the estimates of sensitivity and specificity might have been biased due to an underestimation of the classification errors (Vacek, 1985). Posterior estimates of covariances confirmed the hypothesis of conditional dependence between tests, with low to moderate values of covariances.

Tests results were evaluated in a blind fashion and only one sample was collected from each animal (without re-testing), which avoids introducing an additional observer dependence. The study of tests on samples from several animals in a herd can create another type of dependence, because factors affecting sensitivity and specificity can cluster among herds (Donald et al., 1994). These clusters were not taken into account in our study. We chose to merge infected and non-infected subpopulations in order to avoid limitations due to very low prevalence situations (presumed free population) (Nielsen and Toft, 2002).

Few studies investigated the characteristics of porcine brucellosis serological tests in the absence of a gold standard (Silva Paulo et al., 2000; Muma et al., 2009; Nielsen et al., 2008). Most of them compared only two or three tests at a time. Furthermore, studies were carried out in very different contexts, populations, numbers of animals, geographical areas and studied tests (principle, provider, cut-offs and dealing with doubtful results). Our results were coherent with the results obtained in these studies. More specifically, we found that C-ELISA tests were the most sensitive and specific tests. According to EFSA (2009), the average sensitivity of C-ELISA test was $Se_{C-ELISA,EFSA} = 1.000$ ([0.988; 1.000], 95% CI) and its average specificity was $Sp_{C-ELISA,EFSA} = 0.979$ ([0.976; 0.982], 95% CI). Our estimation of the sensitivity of RBT was consistent with the estimation of the EFSA ($Se_{RBT,EFSA} = 0.870$; [0.802; 0.922], 95% CI) but our estimation of its specificity was lower ($Sp_{RBT,EFSA} = 0.998$; [0.997; 0.998], 95% CI). The specificity of FPA seemed slightly higher than in our study ($Sp_{FPA,EFSA} = 0.952$; [0.945; 0.958], 95% CI). More

information on the validation of veterinary diagnostic test is available in Greiner and Gardner (2000).

According to Branscum et al. (2005), the estimation of the parameters is more correct when the studied disease is persistent and when antibodies are detectable throughout the main part of the life course. Nevertheless, this persistence of antibodies is not strictly correlated to the persistence of the positive outcome to the test, particularly when the antibody titre decreases. Another issue is raised by infected animals in early stages of the infection, during seroconversion time. These animals are infected but cannot be detected by serological tests.

Many factors like biological ones can influence the apparent sensitivity (proportion of non-responders to a test, prevalence in the population, etc.) and specificity (cross-reacting pathogens, removal of test-positive animals during eradication programs, etc.). Test parameters also vary with breed and management conditions of animals.

The studied population of pigs was genetically homogeneous (most of them were Large White, Landrace and Piétrain pigs) and representative of the European pig population (local breeds excepted) (SanCristobal et al., 2006). Their breeding conditions (in industrial farms or in outdoor farms) were quite similar to those of other pigs in European countries. Serological analyses were performed by the EU/OIE/FAO Brucellosis Reference Laboratory (ANSES, Maisons-Alfort; France). The results of our study could thus probably be extrapolated to these pig populations.

The possibility of doubtful outcomes to FPA and I-ELISA test lead us to perform three studies: (i) doubtful results excluded, (ii) doubtful results considered as negative ones and (iii) doubtful results considered as positive ones. The comparison of average values of the parameters of interest and their 95% credibility intervals showed that these three hypotheses gave similar results. This could be explained by the low number of doubtful results compared to the large number of serum samples. It would be possible to perform an analysis considering doubtful results as negative or positive ones according to the results of the 3 other tests for each animal, but this study could not be practically used in screening programs, in which pigs are subjected to one test (or two tests when the first one gives a positive outcome). Another possibility would be to collect epidemiological information on animals and farms and use it to interpret the doubtful results. It would also be possible to change the cut-offs of the tests in order to reduce the number of doubtful results and to simplify the interpretation of the results.

To conclude, this study is an original survey. We evaluated new tests for the detection of *B. suis* (FPA, I-ELISA and two C-ELISA tests), and compared their characteristics with CFT. The serum samples were collected from a large population of pigs, representative of European swine population.

We showed that C-ELISA tests (more specifically C-ELISA₂) were the most sensitive and specific swine brucellosis diagnostic tests. Among the five serological tests, none was sensitive or specific enough to be used alone. In order to screen porcine brucellosis (particularly on a herd scale), pigs should be tested by more than one

test. This diagnostic sequence should be adapted according to the epidemiological context. For instance, in European countries like France, where brucellosis occurs sporadically, causes clinical signs and is thus easily detected, a test with a high specificity would be useful to avoid false positive outcomes in free pig farms.

Acknowledgements

The authors thank B. Guérin (National Laboratory for the Control of Breeding Animals), for providing serum samples from presumed free subpopulation.

C. Cau, A. Drapeau and C. Sarton are duly acknowledged for expert technical assistance and P. Bouchon and L. Desquilbet for the rereading of this paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.prevetmed.2011.10.014](https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.10.014).

References

- Berkvens, D., Speybroeck, N., Praet, N., Adel, A., Lesaffre, E., 2006. Estimating disease prevalence in a Bayesian framework using probabilistic constraints. *Epidemiology* 17, 145–153.
- Branscum, A.J., Gardner, I.A., Johnson, W.O., 2005. Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modeling. *Prev. Vet. Med.* 68, 145–163.
- Dendukuri, N., Joseph, L., 2001. Bayesian approaches to modeling the conditional dependence between multiple diagnostic tests. *Biometric* 57, 158–167.
- Donald, A.W., Gardner, I.A., Wiggins, A.D., 1994. Cut-off points for aggregate testing in the presence of disease clustering and correlation of tests errors. *Prev. Vet. Med.* 19, 167–187.
- EFSA, 2009. Porcine brucellosis (*Brucella suis*): scientific opinion of the panel on animal health and welfare. *EFSA J.* 1144, 1–112.
- Enøe, C., Georgiadis, M.P., Johnson, W.O., 2000. Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease is unknown. *Prev. Vet. Med.* 45, 61–81.
- EU, 2008. Commission Decision of 10 December 2008 amending Annex C to Council Directive 64/432/EEC and Decision 2004/226/EC as regards diagnostic tests for bovine brucellosis (2008/984/EC). *OJEU*, 31/12/2008, L 352/38–45.
- Gall, D., Colling, A., Marino, O., Moreno, E., Nielsen, K., Perez, B., Samartino, L., 1998. Enzyme immunoassay for serological diagnosis of bovine brucellosis: a trial in Latin America. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 5, 654–661.
- Gall, D., Nielsen, K., Vigliocco, A., Smith, P., Perez, B., Rojas, X., Robles, C., 2003. Evaluation of an indirect enzyme-linked immunoassay for presumptive serodiagnosis of *Brucella ovis* in sheep. *Small Ruminant Res.* 48, 173–179.
- Gall, D., Nielsen, K., 2004. Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 23, 989–1002.
- Gardner, I.A., Stryhn, H., Lind, P., Collins, M.T., 2000. Conditional dependence between tests affects the diagnosis and surveillance of animal disease. *Prev. Vet. Med.* 45, 107–122.
- Gelman, A., Carlin, J.B., Sterns, H.S., Rubin, D.B., 1995. *Bayesian Data Analysis*. Chapman & Hall, London, 528 pp.
- Greiner, M., Gardner, I.A., 2000. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Prev. Vet. Med.* 45, 3–22.
- Johnson, W.O., Gastwirth, J.L., 1991. Bayesian inference for medical screening tests: approximations useful for the analysis of acquired immune deficiency syndrome. *J. R. Stat. Soc. B* 53, 427–439.
- Johnson, W.O., Gardner, I.A., Metoyer, C.N., Branscum, A.J., 2009. On the interpretation of test sensitivity in the two-test two-population problem: assumptions matter. *Prev. Vet. Med.* 91, 116–121.
- Lunn, D.J., Thomas, A., Best, N., Spiegelhalter, D., 2000. WinBUGS: a Bayesian modelling framework: concepts, structure, and extensibility. *Stat. Comput.* 10, 325–337.
- Meyer, N., Vinzio, S., Goichot, B., 2009. La statistique bayésienne: une approche des statistiques adaptée à la clinique. *Rev. Méd. Int.* 30, 242–249.
- Muma, J.B., Lund, A., Nielsen, K., Matope, G., Munyenne, M., Mwacalimba, K., Skjerve, E., 2009. Effectiveness of Rose Bengal test and fluorescence polarization assay in the diagnosis of *Brucella* spp. infections in free range cattle reared in endemic areas in Zambia. *Trop. Anim. Health Prod.* 41, 723–729.
- Muñoz, P.M., Marin, C.M., Monreal, D., Gonzalez, D., Garin-Bastuji, B., Diaz, R., Mainar-Jaime, R.C., Moriyon, I., Blasco, J.M., 2005. Efficacy of several serological tests and antigens for diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false-positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O:9. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 12, 141–151.
- Nielsen, K., 2002. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet. Microbiol.* 90, 447–459.
- Nielsen, K., Smith, P., Yu, W.L., Elmgren, C., Halbert, G., Nicoletti, P., Perez, B., Conde, S., Samartino, L., Nicola, A., Bermudez, R., Renteria, T., 2008. Validation of a second generation competitive enzyme immunoassay (CELISA) for the diagnosis of brucellosis in various species of domestic animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 125, 246–250.
- Nielsen, S.S., Toft, N., 2002. Optimisation of the validity of ELISA and faecal culture tests for paratuberculosis: selection of population or correction by population characteristics? In: *Proc. 7th International Colloquium on Paratuberculosis*, Bilbao, Spain, June 11–14, 2002, pp. 400–405.
- OIE (World Organisation for Animal Health), 2008. Chapter 2.4.3. Bovine brucellosis. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 6th ed. OIE, Paris, France, pp. 624–659.
- OIE (World Organisation for Animal Health), 2009. Chapter 1.3. Prescribed and alternative diagnostic tests for OIE listed diseases. In: *Terrestrial Animal Health Code*, 18th ed. OIE, Paris, France, pp. 9–13.
- Praet, N., Domy, P., Saegerman, C., Marcotty, T., Berkvens, D., 2006. Estimation de la prévalence d'une maladie et des caractéristiques des tests diagnostiques par une approche bayésienne. *Epidémiol. Santé Anim.* 49, 113–130.
- Rutjes, A.W.S., Reitsma, J.B., Coomarasamy, A., Khan, K.S., Bossuyt, P.M.M., 2007. Evaluation of diagnostic tests when there is no gold standard. A review of methods. *Health Technol. Assess.* 11 (50), 72.
- SanCristobal, M., Chevalet, C., Haley, C.S., Joosten, R., Rattink, P., Harlizius, B., Groenen, M.A.M., Amigues, Y., Boscher, M.Y., Russell, G., Law, A., Davoli, R., Russo, V., Désautels, C., Alderson, L., Fimland, E., Bagga, M., Delgado, J.V., Vegas-Pla, J.L., Martinez, A.M., Ramos, M., Glodek, P., Meyer, N., Gandini, G.C., Matassino, D., Plastow, G.S., Siggins, K.W., Laval, G., Archibald, A.L., Milan, D., Hammond, K., Cardellino, R., 2006. Genetic diversity within and between European pig breeds using microsatellite markers. *Anim. Genet.* 37 (3), 189–198.
- Silva Paulo, P., Vigliocco, A.M., Ramondino, R.F., Marticorena, D., Bissi, E., Briones, G., Gorchs, C., Gall, D., Nielsen, K., 2000. Evaluation of primary binding assays for presumptive serodiagnosis of swine brucellosis in Argentina. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 7, 828–831.
- Spiegelhalter, D.J., Best, N.G., Carlin, B.R., van der Linde, A., 2002. Bayesian measures of model complexity and fit. *J. R. Stat. Soc. Ser. B: Stat. Methodol.* 64, 583–616.
- Vacek, P.M., 1985. The effect of conditional dependence on the evaluation of diagnostic tests. *Biometrics* 41, 959–968.

Annexe 2 : PRAUD A., CHAMPION J.L., CORDE Y., DRAPEAU A., MEYER L., GARIN-BASTUJI B. (2012). Assessment of diagnostic sensitivity and specificity of an indirect ELISA kit for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *BMC Veterinary Research*, 8: 68

Praud et al. *BMC Veterinary Research* 2012, **8**:68
<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/8/68>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Assessment of the diagnostic sensitivity and specificity of an indirect ELISA kit for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams

Anne Praud¹, Jean-Luc Champion², Yannick Corde³, Antoine Drapeau³, Laurence Meyer⁴ and Bruno Garin-Bastuji^{3*}

Abstract

Background: *Brucella ovis* causes an infectious disease responsible for infertility and subsequent economic losses in sheep production. The standard serological test to detect *B. ovis* infection in rams is the complement fixation test (CFT), which has imperfect sensitivity and specificity in addition to technical drawbacks. Other available tests include the indirect enzyme-linked immunosorbent assays (I-ELISA) but no I-ELISA kit has been fully evaluated.

The study aimed to compare an I-ELISA kit and the standard CFT. Our study was carried out on serum samples from 4599 rams from the South of France where the disease is enzootic. A Bayesian approach was used to estimate tests characteristics (diagnostic sensitivity, Se and diagnostic specificity, Sp). The tests were then studied together in order to optimise testing strategies to detect *B. ovis*.

Results: After optimising the cut-off values in order to avoid doubtful results without deteriorating the concordance between the results of the two tests, the I-ELISA appeared to be slightly more sensitive than CFT (Se_{I-ELISA} = 0.917 [0.822; 0.992], 95% Credibility Interval (CrI) compared to Se_{CFT} = 0.860 [0.740; 0.967], 95% CrI). However, CFT was slightly more specific than I-ELISA (Sp_{CFT} = 0.988 [0.947; 1.0], 95% CrI) compared to Sp_{I-ELISA} = 0.952 [0.901; 1.0], 95% CrI).

The tests were then associated with two different interpretation schemes. The series association increased the specificity of screening and could be used for pre-movement testing in rams from uninfected flocks. The parallel association increased sequence sensitivity, thus appearing more suitable for eradicating the disease in infected flocks.

Conclusions: The high sensitivity and acceptable specificity of this I-ELISA kit support its potential interest to avoid the limitations of CFT. The two tests could also be used together or combined with other diagnostic methods such as semen culture to improve the testing strategy. The choice of test sequence and interpretation criteria depends on the epidemiological context, screening objectives and the financial and practical constraints.

Keywords: *Brucella ovis*, Diagnostic tests, CFT, I-ELISA, Sensitivity, Specificity, Bayesian approach

Background

Brucella ovis is a Gram-negative coccobacillus. In sheep, *B. ovis* infection is responsible for a reproductive disease, often causing genital lesions such as unilateral or bilateral epididymitis in rams and, more rarely, abortion in ewes. This disease mainly spreads via venereal transmission, even though other routes of infection have been observed. Infected ewes generally clear the micro-

organism from the vagina within two oestrus cycles [1], but the clearance period can extend up to three months [2]. It has also been suggested that ewes could play a role in the maintenance of the infection in flocks [3,4].

B. ovis infection in sheep was first reported in 1953 in Australia and New Zealand [5]. It is currently present in South and North American countries, Australia, New Zealand, South Africa and Southern European countries [6]. In France, the number of infected flocks has increased since Rev.1 vaccination against *B. melitensis* infection was stopped in 2008.

* Correspondence: bruno.garin-bastuji@anses.fr

³ANSES, Animal Health Laboratory, EU/OIE/FAO Brucellosis Reference Laboratory, 94706, Maisons-Alfort, France

Full list of author information is available at the end of the article



The infection generates economic losses in infected flocks (decrease in fertility, ban on trade). These losses must be taken into account when evaluating the most suitable screening strategy. Financial losses are principally due to a drop in fertility, with recycling ewes commonly observed in an infected flock. Reproductive failure rates depend on the extent of lesions: if only one testicle is involved, conception rates may be 70%, whereas in healthy rams conception rates of 90% can be expected [7]. Estimates of the abortion rate in ewes and perinatal mortality vary from 0% to 8% in experimental studies. Furthermore, lambs born in the second and third cycle are 10–20 lbs lighter at weaning which can equate to a loss of \$10 to \$20 for each cycle missed [7]. *B. ovis* infection also induces indirect losses such as a shorter reproductive career, a decrease in the economic value of rams or an increase in the number of rams needed per ewe [8]. These observations emphasise the importance of developing suitable testing strategies in various control and eradication situations.

The diagnosis of *B. ovis* infection mainly depends on serological tests. The clinical detection of the disease is difficult because other bacteria, such as *Actinobacillus seminis*, *Histophilus ovis*, *Haemophilus* spp., *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*, *Chlamydophila abortus* or *B. melitensis*, may cause similar symptoms and more than 50% of *B. ovis* infected animals do not show any palpable epididymitis lesion [9]. Infected rams excrete *B. ovis* in semen intermittently, so the bacteriological examination of semen is not very sensitive [10].

As in many other parts of the world, there is currently no compulsory surveillance of the disease in EU flocks. Moreover, neither compulsory eradication programme nor compensation scheme for culling animals in infected flocks is foreseen in the EU Member States. Nevertheless, in order to avoid the contamination of non-infected areas or flocks through international or intra-community trade, rams have to undergo serological pre-movement tests [11]. Rams are also tested before their admission to artificial insemination units. On farms, diagnosis mainly relies on a clinical detection and a serological test when the palpation of testicles reveals lesions or when there is significant infertility in the flock.

Various tests are available to detect *B. ovis* antibodies in serum, such as the complement fixation test (CFT), agar gel immunodiffusion (AGID) or indirect enzyme-linked immunosorbent assay (I-ELISA) but only CFT is prescribed for international or intra-community trade ([6,12]). CFT has good sensitivity and specificity but also has some technical drawbacks such as anti-complementary activity [13], prozone phenomenon [14], incompatibility with haemolysed sera ([10,14]), serum inactivation [14] and workload [15].

Other tests such as the indirect ELISAs (I-ELISA) are available but no I-ELISA kit has been fully evaluated in previous studies. According to literature data, some I-ELISAs appear more sensitive than CFT ([12,16]), but there are differences in the contexts (various geographical areas, breeds and breeding conditions of the animals, sample sizes, tests manufacturers and cut-off values) and the statistical methods used for comparison (CFT being considered as the gold standard and estimation of relative sensitivity and specificity of I-ELISA) ([15-19]). Advantages of I-ELISA include its ease of use; it is less labour intensive than CFT and can be used to test haemolysed or anti-complementary serum samples [15].

Our study compared a commercial I-ELISA kit and standard CFT in order to evaluate its potential use as a complementary test for international trade or for diagnosis on farms, and to assess its possible use instead of CFT or in association with it to improve the detection and eradication of the disease and the protection of disease-free flocks.

Methods

Serum samples

The study included sera from 4,599 rams collected in the South of France, in areas where *B. ovis* infection is enzootic: 3,063 were from Pyrénées Atlantiques (subpopulation 1; individual prevalence estimated at 22% in 2006 [20]), 1,340 were from Provence-Alpes-Côte d'Azur (subpopulation 2; enzootic infection but prevalence unknown) and 196 young rams, between 12 and 14 months of age, were from a cooperative that was found to be infected, *B. ovis* being isolated in some animals (subpopulation 3). A free population used as a source of prior information on the specificity of I-ELISA included 3,792 rams selected from free artificial insemination (AI) units.

Blood samples were collected as part of the usual official screening scheme on farms (and not specifically for research) The EU recommendations about screening procedures and EU ethical guidelines and animal welfare regulations were strictly respected.

Serological tests

CFT and I-ELISA (Chekit *B. ovis*, Idexx, France) were performed in parallel on all sera from the infected populations described above. The antigens used for both CFT and I-ELISA consisted in a hot-saline water soluble extract of the REO 198 strain prepared according to OIE recommendations [4]. The CFT antigen (ANSES, France) was standardized against the International Standard anti-*Brucella ovis* Serum (ISaBoS; AHVLA, UK) and the test performed according to OIE and EU requirements with a positivity threshold of 50 ICFTU/mL ([6,11]). I-ELISA included an anti-ruminant IgG monoclonal

antibody labelled with horseradish peroxidase as conjugate, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) as substrate and a slightly acidic detergent solution as stopping reagent. Serum samples and conjugate incubation steps were performed at 37 °C for 60 min. (\pm 10 min.). Substrate was incubated at room temperature for 15 min. Optical densities (450 nm) were then transformed in % values by comparing the test-sample optical density (OD) to the positive control OD, both ODs being corrected by subtracting the negative control OD. The manufacturer's recommended cut-offs were negative if under 10%, doubtful between 10% and 50% and positive above 50%. The reproducibility of each batch used in the study was checked against the ISaBoS on two plates per batch. All tests were performed by the same two technicians at the EU/OIE/FAO Brucellosis Reference Laboratory (ANSES, Maisons-Alfort, France). The blood samples were collected in the frame of a national official surveillance program. All samples were provided to the authors' laboratory either by the local breeders' organizations (GDS) or by the National Laboratory for the Control of Breeding Animals without any Material Transfer Agreement. Therefore these blood samples could be freely used for the production of any additional data.

Data analyses

A new cut-off was established (see additional details in the Results section) to eliminate doubtful results without deteriorating the concordance between the results of CFT (the officially prescribed test) and I-ELISA.

Then, each test's sensitivity (Se) and specificity (Sp) were estimated using a Bayesian approach implemented through Markov Chain Monte Carlo algorithms. The Bayesian approach has often been used to estimate sensitivities and specificities of tests in the absence of a gold standard, whether in veterinary or human medicine ([21-23]). The main advantage of this method is to combine prior information from the literature and experts' advice with field data.

The model used was a generalization of the Bayesian independence model to allow for dependent test outcomes. It has been applied in previous studies ([21,24-26]) and used to estimate the respective covariance of the sensitivities (γ Se) and of the specificities of the two tests (γ Sp). Two tests are said to be independent of, given that an animal is diseased (or not), the probability of positive (or negative) outcome for the first test is the same whatever the outcome for the other test [27]. Both tests are based on the same biological process: they use the same HS antigen preparation and therefore detect mainly anti-*Brucella*-R-LPS antibodies. They are consequently expected to be conditionally dependent [24].

Prior distributions of parameters were modelled as beta distributions ([27,28]). To construct a beta prior distribution, the most probable value of the parameter (or "best guess"; θ_0) and a "lower limit" (θ_L ; *i.e.* a value for which the experimenter is 95% sure that the parameter will be larger) were determined [27]. Table 1 provides the parameters of the beta (a,b) distribution for each parameter estimated by the model.

Prior information on CFT combined literature and experts' advice with field data. Only prior information from similar studies in literature was input into the model. According to previous studies, mean CFT sensitivity ranged from 88.9% to 98.7% and mean CFT specificity from 89.3% to 100%. The lowest sensitivity reported was 77% and the lowest specificity 78% ([10,14,29-33]).

Prior information on I-ELISA specificity (Sp I-ELISA) was input from a study performed on the sera from the 3,792 rams selected in officially brucellosis free AI units. As these rams were being raised in specific conditions, with little contact with environmental pathogens potentially responsible for cross-reactions, they were not representative of the population bred on farms in the South of France. They were not therefore studied with the population of 4,599 rams from the South of France but used to provide prior information on the specificity of I-ELISA (Sp I-ELISA = 99.74%).

Since little information was available in the literature on this I-ELISA sensitivity and since the corresponding studies were carried out with very different methods, in different contexts, as indicated above, beta (1,1) uninformative distributions (uniform distributions between 0 and 1) were chosen.

Prevalence in the population and covariance of the sensitivity and the specificity were unknown: beta (1,1) uninformative distributions were also used as priors for these parameters.

The statistical analysis was performed with the WinBUGS program [34]. The MCMC algorithm convergence was assessed by checking the stabilisation of the plots of

Table 1 Parameters of the Beta(a,b) distributions used as priors

Parameter	Mean	Lower limit (95%)	Parameters of beta distribution		
			a	b	
CFT	Se*	0.9	0.8	31.5	3.5
	Sp*	0.95	0.8	7.07	0.37
I-ELISA	Se*	Unknown	Unknown	1	1
	Sp*	0.98	0.9	11.03	0.23
Prevalence	γ Se*	Unknown	Unknown	1	1
	γ Sp*	Unknown	Unknown	1	1
		Unknown	Unknown	1	1

*Se = Sensitivity; Sp = Specificity; γ = covariance.

iterate parameter value, after a given number of samples and by running multiple chains from dispersed starting values. Early samples (1,000 out of 50,000) were discarded as a "burn-in" period. A sensitivity analysis was also performed by making the prior distributions more diffuse in order to check that the parameter estimates were little affected by these variations [27].

After having estimated the sensitivity and the specificity of the two tests, their characteristics were evaluated when used in association [35]. With the serial association, the overall result was positive when the results were positive with both tests. With the parallel association, the overall result was positive when at least one test gave a positive result. The sensitivity and specificity of the combined tests were estimated taking into account the conditional dependence between results [24]. The sensitivity of the serial association was: $Se_{SERIES} = Se_{IELISA} * Se_{CFT} + \gamma Se$ and its specificity was: $Sp_{SERIES} = (1 - Sp_{IELISA}) * (1 - Sp_{CFT}) - \gamma Sp$. The sensitivity of the association in parallel was: $Se_{PARALLEL} = 1 - ((1 - Se_{IELISA}) * (1 - Se_{CFT})) - \gamma Se$ and its specificity was: $Sp_{PARALLEL} = Sp_{IELISA} * Sp_{CFT} + \gamma Sp$; (with Se : sensitivity, Sp : specificity, γ : covariance).

Results

A new cut-off was established for I-ELISA in order to eliminate doubtful results without affecting the concordance between the results of CFT (the officially prescribed test) and I-ELISA. A cut-off at 45% OD (see above) was the best compromise to optimise both the concordance of positive results and the concordance of negative results. With this new cut-off, the two tests gave concordant results (positive / positive or negative / negative) for 4,161 rams (92.6%).

The apparent prevalence assessed in the whole studied population by the I-ELISA kit was 25.6%. In the subpopulations 1, 2 and 3, the apparent prevalences were respectively 17.0%, 44.8% and 27.6%. Table 2 gives the results of the 4,599 tested rams.

The I-ELISA kit was slightly more sensitive than the CFT (Se I-ELISA = 0.917 [0.822; 0.992], 95% Credibility Interval (CrI) whereas Se CFT = 0.860 [0.740; 0.967],

95% CrI). In contrast, the CFT was somewhat more specific than the I-ELISA (Sp CFT = 0.988 [0.947; 1.0], 95% CrI whereas Sp I-ELISA = 0.952 [0.901; 1.0], 95% CrI).

Prevalence in the studied population of 4,599 from the South of France was evaluated at 0.238 ([0.187; 0.284], 95% CrI). The sensitivity covariance was 0.0241 ([-0.00773; 0.0949], 95% CrI) and the specificity covariance was 0.00521 ([-4.61 10⁻⁷; 0.0361], 95% CrI).

These two tests could also be associated to improve diagnosis reliability. Two interpretation schemes were studied: a serial association and a parallel association. The estimations of sensitivity and specificity of each sequence were based on the individual sensitivities and specificities described above.

The diagnostic sensitivity of the association in series was $Se_{SERIES} = 0.812$ [0.699; 0.980] (95% CrI) and its specificity was $Sp_{SERIES} = 0.995$ [0.994; 0.996] (95% CrI). The diagnostic sensitivity of the parallel association was $Se_{PARALLEL} = 0.964$ ([0.902; 0.983], 95% CrI) and its specificity was $Sp_{PARALLEL} = 0.946$ ([0.854; 1.0], 95% CrI).

Discussion

The estimation of the mean prevalence in the sample (24%) confirmed the value assessed previously in French areas in which *B. ovis* infection is enzootic [20].

The estimation of the diagnostic sensitivity and specificity of a test should ideally be derived from testing a statistically relevant panel of animals. The history of these animals and their infection status should be known. The panel should be representative of the region where the test is to be used [36]. As mentioned above, there is currently no regulatory program in the EU for eradicating the disease or surveying the absence of *B. ovis* infection (*i.e.* with an appropriate definition of a *B. ovis*-free status), except in AI units. In these units, animals are kept in specific conditions that could lead to an overestimation of tests specificity. Designing an adequate sampling of a sufficient number of free animals (from free flocks) is therefore very difficult. Moreover, the selection of an appropriate gold-standard-infected population (*i.e.* culture-positive animals) is extremely cumbersome and requires a very important budget. Furthermore, *Brucella*-culture should be performed in conditions providing optimised sensitivity, with a corresponding increase in costs, in order to prevent any consecutive overestimation of the diagnostic sensitivity of the serological tests under study. The technical and financial constraints highlighted above justify the use of the Bayesian approach to estimate the characteristics of serological tests for the diagnosis of *B. ovis* infection when the infection status of each animal of the studied population is unknown.

The outcome of our study is consistent with previous results available in the literature. The CFT has a good

Table 2 Cross-classified results in 4,599 rams from the South of France

CFT	I-ELISA*	Number of rams (proportion)
Negative	Negative	3,335 (72.8%)
Negative	Positive	270 (5.9%)
Positive	Negative	72 (1.6%)
Positive	Positive	902 (19.7%)
TOTAL		4,599 (100%)

* cut-off: 45% OD.

diagnostic sensitivity and an acceptable specificity but has some technical disadvantages. The EU/OIE/FAO Reference laboratory estimated that this I-ELISA commercial kit was cheaper than the CFT (in-house produced antigen) when the cost was calculated for a daily analysis of 90 serum samples, mainly due to lower manpower costs (data not shown). Moreover, the evaluated I-ELISA is standardised and easier and quicker to perform. Altogether, these advantages allow the analysis of more samples by a single technician in a working day than the CFT. Moreover, the I-ELISA can be automated to speed up the process. Furthermore, haemolysed and anti-complementary sera do not affect I-ELISA performance ([15,32]). These advantages may further reduce the cost of this I-ELISA compared to the CFT.

In a screening situation, one important issue is the interpretation of doubtful results obtained with the I-ELISA. We established a cut-off different from that recommended by the manufacturer to avoid doubtful results without decreasing the concordance between the results of the two tests. Nevertheless, it is possible to adjust this cut-off according to the epidemiological context. When the test is used for international or intra-community trade, false positive results due to a lack of specificity could hinder trade and raise economic issues in brucellosis free contexts. Exported rams should come exclusively from uninfected farms (*i.e.* showing only negative results to regular tests), so the positive predictive value of the test results is low. For this reason, a high cut-off value could be used (for instance 60% OD). In contrast, when the test is used to diagnose *B. ovis* infection in infected areas or to confirm the infection in rams with clinical lesions with the aim of eradicating the disease, false negative results might slow down eradication and, in particular conditions, it could be acceptable to cull seropositive but uninfected rams. Accordingly, in a context of high prevalence, a low cut-off value could therefore be used (for example 30% OD).

The imperfect diagnostic performance of both tests could justify their use in association [35]. With the serial association, the overall result is positive when the results are positive with both tests. This interpretation scheme increases the diagnostic specificity of screening and could therefore be recommended for pre-movement testing in a brucellosis free context, in order to avoid false positive results due to the relative lack of diagnostic specificity of this I-ELISA. With the parallel association, the overall result is positive when at least one test gives a positive result.

The parallel association increases the sensitivity of the screening. Accordingly, it could be recommended in a context of suspected infection with the aim of accelerating the eradication of the disease. In this context, many sera may have to be tested in a flock and the

rapidity of the process influences the success eradication operations.

The following situations would be suitable for application of screening strategies using the I-ELISA kit:

- Rams for export must come from brucellosis free flocks. In this case, the animals could be tested with I-ELISA alone. If all results were negative, rams could be qualified for export. Rams from flocks showing positive results to I-ELISA should not be exported and should be subjected to further investigations (clinical examination, CFT, semen culture or PCR for instance) to confirm or rule out the infection.
- In infected flocks in which *B. ovis* has already been identified, the testing regime should be focused on a quickly eradication of the disease. In this case, all animals (including females) should be submitted to I-ELISA and CFT in parallel. Animals with positive results to at least one of the two tests should be culled and replaced by virgin animals from flocks free of *B. ovis* infection. The remaining animals resulting negative to both tests could be kept in the flock but should neither be sold nor exported. Further tests should be carried out at 45- to 60-days intervals until all infected animals have been eliminated (*i.e.* after the entire animal population has been tested negative twice). This strategy raises financial issues in infected flocks with a high prevalence of the disease, because many animals would be culled.
- In all flocks, animals should be submitted to a clinical examination two months before the breeding season. Rams with clinical signs of epididymitis should be banned from reproduction and subjected to an I-ELISA test. Rams with positive results to I-ELISA should undergo further investigations (semen culture) to confirm the presence of *Brucella ovis*.

Conclusions

Our study used a Bayesian approach to evaluate the diagnostic performance of a commercially available I-ELISA kit to detect *B. ovis* infection in sheep. We showed that this I-ELISA kit was slightly more sensitive than the CFT, but somewhat less specific. The high sensitivity and acceptable specificity of the I-ELISA kit support its potential interest for diagnosing *B. ovis* infection in sheep. This I-ELISA kit has certain advantages over CFT and could be used alone or as a first test in associated testing regimes. The interpretation of the results and the testing sequences should be chosen depending on screening objectives, the disease's prevalence in the target population and economic and practical constraints.

Abbreviations

CFT: Complement fixation test; I-ELISA: Indirect enzyme-linked immunosorbent assay; AI: Artificial insemination; ISaBoS: International standard anti-*Brucella ovis* serum; Se: Sensitivity; Sp: Specificity; γ : Covariance; CrI: Credibility interval.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Veterinary Laboratories and the Groupements de Défense Sanitaire of Alpes de Haute-Provence, Hautes-Alpes, Bouches du Rhône, Pyrénées Atlantiques, Var and Vaucluse as well as the Fédération des Groupements de Défense Sanitaire of Provence-Alpes-Côte d'Azur in addition to N. Pozzi (National Laboratory for the Control of Breeding Animals, Maisons-Alfort, France) for the collection of serum samples.

María-Laura Boschirollo and Delphine Libby-Claybrough (ANSES) are also duly acknowledged respectively for the critical review and for the English revision of this manuscript.

All serological analyses could be performed due to the European Commission's support of the EU reference laboratory for Brucellosis. All the authors are financially supported by their respective organizations.

Author details

¹National Veterinary School of Alfort (ENVA) / French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety (ANSES), USC Epidemiology of Animal Infectious Diseases Unit (Epi-MAI), 94700, Maisons-Alfort, France.

²Groupement de Défense Sanitaire des Alpes de Haute Provence, 04000, Digne les Bains, France. ³ANSES, Animal Health Laboratory, EU/OIE/FAO Brucellosis Reference Laboratory, 94706, Maisons-Alfort, France. ⁴INSERM, Centre for research in Epidemiology and Population Health (CESP), U1018, Faculté de Médecine Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre; AP-HP, Hôpital Bicêtre, Epidemiology and Public Health Service, Université Paris-Sud, 94276, Le Kremlin-Bicêtre, France.

Authors' contributions

JLC and BGB organized the sample collection. BGB conceived and designed the testing study and directed the test performance. YC and AD performed all the immunological analyses and helped design the testing study. AP conceived the model, performed data analyses and drafted the manuscript. AP, JLC, LM, YC, AD and BGB contributed to the conception and design of the whole study, revised the manuscript and approved the final manuscript.

Authors' information

AP: DVM, Teacher and researcher in National Veterinary School of Maisons-Alfort. JLC: DVM, Veterinary practitioner, Veterinary Advisor of the Groupement de Défense Sanitaire des Alpes de Haute Provence. LM: MD, PhD, Professor of Public Health at Paris Medical University. YC and AD: BSc. (Biol). BGB: DVM, PhD, Senior Research Director, Head of the EU/OIE/FAO Brucellosis Reference Laboratory (ANSES).

Received: 28 September 2011 Accepted: 28 May 2012

Published: 28 May 2012

References

- Grilló M, Marín M, Barberan M, Blasco J: Experimental *Brucella ovis* infection in pregnant ewes. *Vet Rec* 1999, **144**(20):555.
- Muhammed S, Lauerman L Jr, Mesfin G, Otim C: Duration of *Brucella ovis* infection in ewes. *Cornell Vet* 1975, **65**(2):221.
- Marco J, Gonzalez L, Cuervo L, de Heredia FB, Barberan M, Marín C, Blasco J: *Brucella ovis* infection in two flocks of sheep. *Vet Rec* 1994, **135**(11):254-256.
- Atzal M, Kimberling C: How to control *Brucella ovis*-induced epididymitis in rams. *Vet Med* 1986, **81**(4):364-371.
- Robles C: Evaluación de una técnica de doble difusión en gel de agar para el diagnóstico de la infección por *Brucella ovis* en carneros. *Vet Arg* 1998, **15**(142):119-124.
- OIE (World Organisation for Animal Health): *Ovine epididymitis (Brucella ovis)*. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Edited by OIE. Paris: OIE; 2011.
- Lamb Epididymitis. [<http://www.optimalag.com/cleanscorner/Article002.aspx>].
- Paolicchi FA, Bartolomé J, Patitucci A, Solanet C, Campero CM: Seguimiento clínico, serológico y bacteriológico en carneros naturalmente infectados con *Brucella ovis*. *Rev Med Vet* 1992, **73**:46-52.
- Blasco JM: *Brucella ovis*. In *Animal brucellosis*. Boca Raton: CRC Press; 1990:351-378.
- Worthington R, Stevenson B, De Lisle G: Serology and semen culture for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in chronically infected rams. *N Z Vet J* 1985, **33**(6):84-86.
- European Union: *Council Directive of 28 January 1991 on animal health conditions governing intra-Community trade in ovine and caprine animals (91/68/EEC)*. In *1991L0068-EN-03092008-012001:2008:1-34*.
- OIE (World Organisation for Animal Health): *Ovine epididymitis (Brucella ovis)*. In *Terrestrial Animal Health Code*. Edited by OIE. Paris: OIE; 2011.
- Searson J: Sensitivity and specificity of two microtitre complement fixation tests for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Aust Vet J* 1982, **58**(1):5-7.
- Marín C, de Jiménez Bagues M, Blasco J, Gamazo C, Moriyon I, Diaz R: Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. *Vet Rec* 1989, **125**(20):504.
- Gall D, Nielsen K, Vigliocco A, Smith P, Perez B, Rojas X, Robles C: Evaluation of an indirect enzyme-linked immunoassay for presumptive serodiagnosis of *Brucella ovis* in sheep. *Small Ruminant Research* 2003, **48**(3):173-179.
- Estein S: Immunological aspects in the diagnosis and control of contagious epididymitis of rams caused by *Brucella ovis*; Aspectos inmunológicos en el diagnóstico y control de la epididimitis contagiosa del carnero por *Brucella ovis*. *Archivos de Medicina Veterinaria (Chile)* 1999, **31**:5-17.
- Spencer T, Burgess G: Enzyme-linked immunosorbent assay for *Brucella ovis* specific antibody in ram sera. *Res Vet Sci* 1984, **36**(2):194.
- Núñez-Torres E, Díaz-Aparicio E, Hernández-Andrade L, Trigo-Tavera F, Suárez-Güemes F: Sensitivity and specificity of an ELISA as a screening test for the diagnosis of *Brucella ovis* in sheep. *Rev Latinoam Microbiol* 1997, **39**(3-4):123.
- Alvarez J, Veneros R, González O: Validación operacional de un ELISA comercial para *Brucella ovis*, Chile. *Arch med vet* 2007, **39**(3):275-279.
- AFSSA: *Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur un protocole de lutte contre l'épididymite contagieuse ovine (Brucella ovis) dans les Pyrénées Atlantiques*. 2007-SA-0405; 16 avril 2008 [<http://www.anses.fr/Documents/SANT2007sa0405.pdf>].
- Branscum A, Gardner I, Johnson W: Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modeling. *Prev Vet Med* 2005, **68**(2-4):145-163.
- Meyer N, Vinzio S, Goichot B: La statistique bayésienne: une approche des statistiques adaptée la clinique. *La Revue de médecine interne* 2009, **30**(3):242-249.
- Rutjes A, Reitsma J, Coomarasamy A, Khan K, Bossuyt P: Evaluation of diagnostic tests when there is no gold standard. A review of methods. *Health Technol Assess* 2007, **11**(50):1-51.
- Gardner IA, Stryhn H, Lind P, Collins MT: Conditional dependence between tests affects the diagnosis and surveillance of animal diseases. *Prev Vet Med* 2000, **45**(1-2):107-122.
- Dendukuri N, Joseph L: Bayesian approaches to modeling the conditional dependence between multiple diagnostic tests. *Biometrics* 2001, **57**(1):158-167.
- Georgiadis MP, Johnson WO, Gardner IA, Singh R: Correlation adjusted estimation of sensitivity and specificity of two diagnostic tests. *Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)* 2003, **52**(1):63-76.
- Enøe C, Georgiadis MP, Johnson WO: Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown. *Prev Vet Med* 2000, **45**(1-2):61-81.
- Johnson WO, Gastwirth JL: Bayesian inference for medical screening tests: approximations useful for the analysis of acquired immune deficiency syndrome. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* 1991, **53**(2):427-439.
- Cho H, Niilo L: Diagnostic sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Can J Vet Res* 1987, **51**(1):99.
- Kittelberger R, Hansen M, Ross GP, Hillbink F: A sensitive immunoblotting technique for the serodiagnosis of *Brucella ovis* infections. *J Vet Diagn Invest* 1994, **6**(2):188.

31. Ficapal A, Jordana J, Blasco J, Moriyón I: **Diagnosis and epidemiology of *Brucella ovis* infection in rams.** *Small Ruminant Research* 1998, **29**(1):13–19.
32. Vigliocco AM, Silva Paulo PS, Mestre J, Briones GC, Draghi G, Tossi M, Nielsen K: **Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of ovine antibody to *Brucella ovis*.** *Vet Microbiol* 1997, **54**(3–4):357–368.
33. Cerrí D, Ebaní V, Pedrini A, Bassi S, Bey R, Andreani E, Farina R: **Evaluation of tests employed in serological diagnosis of brucellosis caused by *Brucella ovis*.** *New Microbiol* 2000, **23**(3):281–288.
34. Lunn DJ, Thomas A, Best N, Spiegelhalter D: **WinBUGS-a Bayesian modelling framework: concepts, structure, and extensibility.** *Statistics and Computing* 2000, **10**(4):325–337.
35. Weinstein S, Obuchowski NA, Lieber ML: **Clinical evaluation of diagnostic tests.** *Am J Roentgenol* 2005, **184**(1):14.
36. OIE (World Organisation for Animal Health): **Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases.** In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Edited by OIE. Paris: OIE; 2011.

doi:10.1186/1746-6148-8-68

Cite this article as: Praud et al.: Assessment of the diagnostic sensitivity and specificity of an indirect ELISA kit for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *BMC Veterinary Research* 2012 **8**:68.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Annexe 3 : PRAUD A., GIMENEZ O., ZANELLA G., DUFOUR B., POZZI N., ANTRAS V., MEYER L., GARIN-BASTUJI B. Evaluation of five serological tests for the diagnosis of porcine brucellosis in French Polynesia. *Tropical Animal Health and Production* (Accepté sous réserve de modifications)

Manuscript

[Click here to download Manuscript: Bsuis_polynesie_TAHP.doc](#)

[Click here to view linked References](#)

1 **Evaluation of five serological tests for the diagnosis of porcine brucellosis**
 2 **in French Polynesia**
 3 PRAUD Anne ¹, GIMENEZ Olivier ², ZANELLA Gina³, DUFOUR Barbara¹, POZZI Nathalie ⁴, ANTRAS
 4 Valérie ⁵, MEYER Laurence⁶, GARIN-BASTUJI Bruno⁷

6 ¹ Université Paris-Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, EpiMAI ENVA USC ANSES (Laboratoire de Santé
 7 Animale), Maisons-Alfort, F-94704, France.

8 ² Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, UMR
 9 5175, 34293 Montpellier Cedex 5 (France)

10 ³ ANSES, Animal Health Laboratory, Epidemiology Unit, 94706 Maisons-Alfort Cedex (France)

11 ⁴ National Laboratory for the Control of Breeding Animals, 94704 Maisons-Alfort (France)

12 ⁵ Service of Rural Development, Papeete (French Polynesia)

13 ⁶ INSERM, Centre for research in Epidemiology and Population Health (CESP), U1018, Université Paris-Sud,
 14 Faculté de Médecine Paris-Sud; AP-HP, Hôpital Bicêtre, Epidemiology and Public Health Service, 94276 Le
 15 Kremlin-Bicêtre, France.

16 ⁷ ANSES, Animal Health Laboratory, EU/OIE/FAO Brucellosis Reference Laboratory, 94706 Maisons-Alfort
 17 Cedex (France)

19 **Corresponding author**

20 Anne PRAUD

21 Unité Maladies contagieuses- Laboratoire EpiMAI

22 Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

23 7 avenue du Général de Gaulle

24 94704 MAISONS-ALFORT CEDEX

25 FRANCE

26 E-mail: apraud@vet-alfort.fr

27 Phone: +33 143 967 268

28 Fax: +33 143 967 131

29

30 Abstract (182 words)

1
2 31 Porcine brucellosis due to *Brucella suis* biovar 1 raises important issues for pig breeders in French Polynesia. In
3
4 32 this region, the disease is enzootic, spreads silently and engenders economic losses in infected farms as well as
5
6 33 sporadic human cases.

7
8 34 While serological tests are essential in surveillance and control programmes of animal diseases, to date none of
9
10 35 the available tests has been shown to be reliable enough to be used in routine individual diagnosis of porcine
11
12 36 brucellosis. Few studies about the estimation of the sensitivity and the specificity of porcine brucellosis
13
14 37 screening tests have been published but no evaluation of the behaviour of these tests is available in the
15
16 38 epidemiological context of French Polynesia.

17
18 39 The studied population included 1,595 pigs from French Polynesia. Five tests were evaluated: Rose-Bengal Test
19
20 40 , Fluorescence Polarization Assay, Indirect ELISA and two Competitive ELISAs (C-ELISA). The sensitivity and
21
22 41 the specificity of each test were estimated. C-ELISA₂ was the most sensitive test (Se C-ELISA₂ = 0.954 [0.889;
23
24 42 0.992]) while both C-ELISA were the most specific ones (Sp C-ELISA₁ = 0.856 [0.806; 0.915] - Sp C-ELISA₂ =
25
26 43 0.849 [0.817; 0.879]).

27
28 44

29 45 Keywords

30 46 Bayesian theory; *Brucella suis*; diagnostic tests; sensitivity; specificity; French Polynesia

31
32
33
34 47

35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

48 Text (1057 words)

1
2 49 Porcine brucellosis is a bacterial disease, usually due to *Brucella suis*, that induces economic losses due to
3
4 50 infertility and other reproductive issues. In French Polynesia (FP), brucellosis is enzootic and is due to the
5
6 51 zoonotic biovar 1 of *B. suis* (Antras and Garin-Bastuji, 2011).

7
8 52 Diagnosis of porcine brucellosis is mainly based on the observation of clinical signs. It can be associated with
9
10 53 positive serology but to date no reference test is available (OIE, 2009). Few studies about the estimation of
11
12 54 sensitivity and specificity of porcine brucellosis screening tests have been published and no evaluation of the
13
14 55 behaviour of these tests is available in the epidemiological context of FP (Praud *et al.*, 2012).

15
16 56 Our study aimed at estimating the sensitivity and the specificity of five serological tests for the diagnosis of
17
18 57 porcine brucellosis in FP through a Bayesian approach (Enøe *et al.*, 2000).

19
20 58**21 59 Materials and methods**

22
23
24 60 The study included 1,595 sera collected from pigs bred in FP. Two groups were randomly selected: (i) 694 pigs
25
26 61 bred in six farms, where *B. suis* biovar 1 had been recently isolated and (ii) 901 pigs from 11 farms without any
27
28 62 sign or risk factor of brucellosis identified by the Veterinary Office.

29
30 63 Each sample was subjected to five serological tests, standardised, performed and with results interpreted as
31
32 64 described in Praud *et al.* (2012): (i) Rose-Bengal test (RBT), Institut Pourquier, France; (ii) fluorescence
33
34 65 polarization assay (FPA), *B. abortus* antibody test kit, Diachemix / Prionics, USA/Switzerland; (iii) indirect
35
36 66 ELISA (I-ELISA), Chekit *B. suis*, Idexx-Bommeli, Switzerland; (iv) competitive ELISA, C-ELISA₁,
37
38 67 SVANOVIR® *Brucella*-Ab C-ELISA, Svanova, Sweden and C-ELISA₂, Compelisa, VLA, UK (2- and 1-step
39
40 68 format respectively).

41
42 69 A Bayesian approach was used to estimate the sensitivity and the specificity of the five tests without gold
43
44 70 standard (Enøe *et al.*, 2000; Berkvens *et al.*, 2006). The detailed statistical method is described in Praud *et al.*
45
46 71 (2012).

47
48 72**49 73 Results**

50
51
52 74 In the presumed free population, 86.5% of animals showed negative results in all tests. In the infected herds,
53
54 75 67.3% of pigs had a positive outcome in at least one test.

55
56 76 The parameters estimates are displayed in table 1. Estimated prevalence in the sample was 0.210 ([0.136; 0.293],
57
58 77 95% Credibility Interval (CrI)). C-ELISA₂ was the most sensitive test (Se C-ELISA₂ = 0.954 [0.889; 0.992])

59
60
61
62
63
64
65

78 while both C-ELISA were the most specific ones (Sp C-ELISA₁ = 0.856 [0.806; 0.915] - Sp C-ELISA₂ = 0.849
79 [0.817; 0.879]).

80

81

Table 1: Estimates of the sensitivity and the specificity of the five tests

Parameter of interest	Mean estimate [95% CrI*]	
	RBT	Sensitivity
Specificity		0.853 [0.812 ; 0.898]
FPA	Sensitivity	0.751 [0.554 ; 0.939]
	Specificity	0.819 [0.779 ; 0.858]
I-ELISA	Sensitivity	0.850 [0.708 ; 0.978]
	Specificity	0.824 [0.787 ; 0.862]
C-ELISA ₁	Sensitivity	0.644 [0.356 ; 0.973]
	Specificity	0.856 [0.806 ; 0.915]
C-ELISA ₂	Se	0.954 [0.889 ; 0.992]
	Sp	0.849 [0.817 ; 0.879]

*95 % credibility intervals

82

83

84 **Discussion**

85 Only few studies have been carried out to estimate the sensitivity and the specificity of diagnostic tests for
86 porcine brucellosis. Our previous study (Praud *et al.*, 2012) evaluated the characteristics of the five same tests
87 (RBT, FPA, I-ELISA, C-ELISA₁ and C-ELISA₂) in Metropolitan France (MF), with the same statistical
88 approach. No significant difference was observed between the sensitivities of the tests in the two areas, except in
89 the case of the I-ELISA for which sensitivity resulted higher in FP. The most sensitive test was C-ELISA₂ in
90 both populations. The specificities of the tests varied greatly, with significant differences between the studied
91 populations. Nevertheless, the five tests were more specific in MF and the C-ELISAs were the most specific in
92 both populations.

93 Since in these two studies the testing as well as the statistical methods were identical, these peculiarities could be
94 explained by differences of epidemiological contexts and tested populations. Greiner and Gardner (2000) have
95 shown that test sensitivity and specificity could vary according to many biological factors. Porcine brucellosis is
96 enzootic in FP, while MF is free of the disease, with sporadic occurrences due to a wildlife reservoir. In
97 Metropolitan farms, brucellosis often discloses an acute form with obvious symptoms, whereas in Polynesian

98 farms, the disease spreads silently and is often detected later than in MF. In all reported outbreaks, *B. suis* biovar
1
2 99 2 has been isolated in MF, whereas biovar 1 is the one historically isolated in pigs and humans in FP as in the
3
4 100 rest of the Pacific. To our knowledge, no study suggested that tests might react differently according to the
5
6 101 biovar of *B. suis* in cause, but this cannot be excluded.

7
8 102 The differences between the specificities of the five tests could probably be explained by the differences of
9
10 103 management of the animals from one area to the other. The Metropolitan “free subpopulation” was reared in
11
12 104 officially brucellosis free artificial insemination units, without any contact with other animals and with less
13
14 105 cross-reacting pathogens in the environment while in FP, farms are less bio-secured and the presumed free status
15
16 106 is based only on the absence of clinical signs and known risk factors.

17
18 107 To conclude, this study confirmed that competitive ELISA tests are the most specific available tests for the
19
20 108 diagnosis of swine brucellosis. The sensitivity and the specificity could however vary greatly according to the C-
21
22 109 ELISA format used as well as the studied population. This should be taken into account for designing
23
24 110 surveillance and eradication schemes.

25
26 111

27 28 112 **Acknowledgements**

29
30 113 C. Cau, A. Drapeau and C. Sarton are duly acknowledged for expert technical assistance.

31
32 114

33 34 115 **References**

35
36 116 Antras, V. and Garin-Bastuji, B., 2011. La brucellose porcine en Polynésie française (*Swine brucellosis in*
37
38 117 *French Polynesia*). Bulletin Epidémiologique Santé Animale - Alimentation, 43, 35-38.

39
40 118 <http://www.afssa.fr/bulletin-epidemiologique/Documents/BEP-mg-BE43.pdf>

41
42 119 Berkvens, D., Speybroeck, N., Praet, N., Adel, A., Lesaffre, E., 2006. Estimating disease prevalence in a
43
44 120 Bayesian framework using probabilistic constraints. *Epidemiology*, 17, 145-153.

45
46 121 Enøe, C., Georgiadis, M.P., Johnson, W.O., 2000. Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and
47
48 122 disease prevalence when the true disease is unknown. *Preventive Veterinary Medicine*, 45, 61-81.

49
50 123 Greiner, M. and Gardner, I.A., 2000. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests.

51
52 124 *Preventive Veterinary Medicine*, 45, 3-22.

53
54 125 OIE (World Organisation for Animal Health), 2009. Chapter 2.8.5, Porcine brucellosis, *In Manual of Diagnostic*

55
56 126 *Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 6th Ed., OIE, Paris, France,

57
58 127 http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.08.05_PORCINE_BRUC.pdf.

59
60
61
62
63
64
--

128 Praud, A., Gimenez, O., Zanella, G., Dufour, B., Pozzi, N., Antras, V., Meyer, L., Garin-Bastuji B., 2012.
1
2 129 Estimation of sensitivity and specificity of five serological tests for the diagnosis of porcine brucellosis.
3
4 130 Preventive Veterinary Medicine, 104, 94-100.
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

**Annexe 4 : PRAUD A., BOSCHIROLI M.L., BÉNET J.J., MEYER L., GARIN-BASTUJI B., DUFOUR B.
Evaluation of the efficiency of the gamma interferon test used in series after SICCT for the
diagnosis of bovine tuberculosis in Côte d'Or (France). *Transboundary and Emerging Diseases* (En
revision)**

Page 1 of 16

Transboundary and Emerging Diseases - submission proof

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 Evaluation of the efficiency of the gamma interferon test used in series after SICCT for the
2 diagnosis of bovine tuberculosis in Côte d'Or (France)
3 Praud A.^{1*}, Boschirolì M.L.², Bénet, J.J.¹, Meyer L.³, Garin-Bastuji B.², Dufour B.¹

5 ¹Université Paris-Est, Alfort National Veterinary School, Epidemiology and Infectious Diseases Unit,
6 ENVA USC ANSES, Maisons-Alfort, F-94704, France.

7 ²ANSES, Animal Health Laboratory, National Tuberculosis Reference Laboratory, Bacterial Zoonoses
8 Unit, Maisons-Alfort, F-94706, France

9 ³INSERM, Centre for research in Epidemiology and Population Health (CESP), U1018, Faculté de
10 Médecine Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre; AP-HP, Hopital Bicêtre, Epidemiology and Public Health
11 Service, Université Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, 94276, France

12 *Corresponding author

14 **Corresponding author :**

15 Anne PRAUD

16 Unité Maladies Contagieuses / USC EpiMAI

17 Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

18 7 avenue du Général de Gaulle

19 94704 MAISONS-ALFORT CEDEX

20 France

21 Mail : apraud@vet-alfort.fr

22 Tel : +33(0) 143 967 268

24 **Summary**

25 Bovine tuberculosis is an infectious disease which economic and sanitary repercussions are severe.

26 For this reason, policy rules have been decided by European countries in order to eradicate the
27 disease. Nevertheless, this eradication is incomplete in some areas and in particular in a few French
28 departments like Côte d'Or.

29 Diagnosis of bovine tuberculosis is mainly based on skin tests. These tests are known to be imperfect,
30 especially because of their poor herd specificity due to crossed-reactions with non-pathogenic
31 mycobacteria. In order to improve the screening scheme, a gamma interferon assay (IFN) has been
32 used since a few years in European countries, but has not been fully evaluated yet.

33 In European countries, IFN is usually performed in parallel association with skin tests in order to
34 speed the eradication of bovine tuberculosis. In Côte d'Or (France), an experimental screening

Transboundary and Emerging Diseases - submitted manuscript

1
2
3 35 scheme based on a serial association of skin test and IFN has been initiated in 2009 (“Côte d’Or
4 36 protocol”) to shorten the interval between a suspicion and its invalidation.

5
6 37 Our study aimed at estimating the efficiency of IFN used in serial association after skin tests for the
7 38 diagnostic of bovine tuberculosis. Intradermal and gamma interferon test results of 2,879 animals
8 39 from 657 farms located in Côte d’Or were collected. The sensitivities of the tests were estimated
9 40 using a latent-class model implemented through a Bayesian approach. The average sensitivity of IFN
10 41 seemed higher than skin test sensitivity, but their credibility intervals overlapped widely.
11 42 Subsequently, we assessed the individual default error risk (*i.e.* the risk of concluding that an infected
12 43 animal is free) due to the application of Côte d’Or and EU protocols. The results suggest that the risk
13 44 of importing infected cattle considered as free from areas using IFN in series after skin tests is not
14 45 higher than from areas following European recommendations.
15
16
17
18
19
20
21

22 Key words

23
24 48 Bovine tuberculosis, diagnosis, gamma interferon assay, serial association, sensitivity, Bayesian
25
26
27

28 Introduction

29 51 Bovine tuberculosis is a chronic infectious disease mainly due to *Mycobacterium bovis*. Its clinical
30 52 expression is discrete and unnoticeable until several years of evolution (Francis, 1958). The detection
31 53 of the disease in live animals is mainly based on intradermal injections of tuberculin but these tests
32 54 are known to be imperfect, especially because of their lack of herd specificity in a context of low
33 55 prevalence. On dead animals, a culture of mycobacteria can be performed from lesions or lymph
34 56 node samples but getting the final result can take until 3 months (De la Rua-Domenech *et al.*, 2006).
35 57 In European countries, policy rules have been decided to eradicate bovine tuberculosis, because of
36 58 its economical (production decrease, trade restriction...) and sanitary (zoonotic risk) repercussions.
37 59 Nevertheless, the eradication of this disease has not been successful in some European countries.
38 60 This failure can be explained by difficulties in performing the skin tests or in interpreting their results
39 61 (Alvarez *et al.*, 2009), and by the existence of wild reservoirs as badgers (*Meles meles*) (Krebs *et al.*,
40 62 1997; More, 2009).
41 63 Even though France has been considered as officially free from bovine tuberculosis since December
42 64 2000, the eradication of the disease is still incomplete in a few French departments. In Côte d’Or in
43 65 2010, 45 outbreaks have been registered, despite policy measures (Fediaevsky *et al.*, 2011). This
44 66 department is located in the Bourgogne region, known for its extensive farms breeding grass calves
45 67 for export. In this department, a systematic screening is performed annually on each animal older
46 68 than 24 months. The main screening test used in Côte d’Or is single intradermal comparative cervical
47 69 tuberculin test (SICCT), because many cross-reactions with non-pathogenic mycobacteria and *M.*
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 70 *avium* subsp. *paratuberculosis* are noticed, causing false positive results and hampering trade. These
4
5 71 observations have led to a demotivation of breeders, veterinarians and local veterinary officers
6
7 72 (Direction Départementale de la Protection des Populations de Côte d'Or,; DDPP21).
8
9 73 In European Union (EU), screening rules for bovine tuberculosis recommend the use of SIT
10
11 74 (CE/64/432 directive). According to this directive, when a positive or a doubtful result to SIT (single
12
13 75 intradermal cervical tuberculin test) is noticed on an animal, its whole herd is under suspicion and all
14
15 76 commercial exchanges are blocked until the performance of an SICCT, 6 weeks later to confirm or
16
17 77 invalidate the suspicion. This delay cannot be shortened as far as the first intradermal tuberculin
18
19 78 injection desensitizes the animals during 42 days: an SICCT test performed during this period could
20
21 79 result in a false negative result (CE/64/432 directive; OIE, 2011). This serial association of SIT and
22
23 80 SICCT is named "EU protocol" in the text.
24
25 81 Another test (gamma interferon test; IFN), considered as more sensitive and as specific as
26
27 82 intradermal test, has been used since 1980 in Australia (Wood *et al.*, 1991) and since 2000's in
28
29 83 European countries (De la Rua-Domenech *et al.*, 2006) but is still being validated in France. Gamma
30
31 84 interferon is a cytokine produced by T-Lymphocytes after an antigenic stimulation, in particular due
32
33 85 to *M. bovis* infection (Pollock & Neill, 2002). In Côte d'Or, an experimental screening project using a
34
35 86 serial association of SICCT and gamma interferon test has been initiated in 2008 in order to shorten
36
37 87 the interval between the suspicion and its invalidation. This use of gamma interferon test (*i.e.* in
38
39 88 serial association with SICCT) is not evocated in the European directive CE/64/432, raising issues in
40
41 89 the certification of the status of animals exported by France. This protocol is named "Côte d'Or
42
43 90 protocol" in the text.
44
45 91 The main issue in validation studies of bovine tuberculosis diagnostic tests is the choice of a gold
46
47 92 standard (Clegg *et al.*, 2011). To estimate the diagnostic characteristics of tests when the infectious
48
49 93 status of animals is unknown, studies have used latent class models, implemented through
50
51 94 frequentist or Bayesian modelling strategies (Hui and Walter, 1980; Greiner and Gardner, 2000,
52
53 95 Branscum *et al.*, 2005; Rutjes *et al.*, 2007; Toft *et al.*, 2007).
54
55 96 The aim of our study was to assess the overall sensitivity and the default error risk linked to the
56
57 97 application of the screening scheme used in Côte d'Or (serial association of SICCT and IFN) and to
58
59 98 compare them with the effectiveness of the screening scheme prescribed by European Commission
60
100 99 (serial association of SIT and SICCT).
101
102 **Material and methods**
103 Sample and screening context
104 Intradermal and gamma interferon tests crossed results of 2,871 animals from 657 farms located in
Côte d'Or were collected by veterinarians and veterinary laboratory of Côte d'Or and centralised by

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

105 local veterinary officers (DDPP21). Data was collected between 2009 and 2012. Each animal of each
106 herd was submitted to an SICCT. If the result was negative for the whole herd, its “officially free”
107 status maintained. Animals with positive results to SICTT were slaughtered and their herd was
108 considered as “suspect”. Animals with doubtful results to SICTT were submitted to a gamma
109 interferon test to confirm or invalidate the SICCT result. When IFN gave a negative result, the
110 “officially free” status of the herd was maintained. Otherwise, the herd was submitted to further
111 investigations (research of *M. bovis* at the abattoir and SICCT six weeks later).
112 Moreover, in some herds, where the infection has been confirmed, SICCT and IFN were performed in
113 parallel in order to speed the eradication process.

114

115 Tests

116 The SICCT was performed using standard methods (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006). Avian and
117 bovine purified protein derivative (PPD) tuberculin were injected separately in the neck of the
118 animals, after the measurement of skin fold thicknesses at day 0 (thickness at the point of bovine
119 PPD injection: B0 and thickness at the point of avian PPD injection: A0). Results were read 72 hours
120 later measuring skin fold thicknesses at day 3 (B3 and A3, respectively). These results were
121 interpreted as indicated in Table 1.

122 Detailed quantitative results of skin fold thickening were available for 1,787 animals. For these
123 animals, the SIT results were deduced from DB results. When DB was ≤ 2 mm, SIT result was
124 negative; when DB was between 2 and 4 mm, SIT result was doubtful and when DB > 4 mm, SIT result
125 was positive.

126 Gamma interferon tests were performed 72 hours after the tuberculin injections, on animals showing
127 non negative results with SICCT. The Bovigam® kit (Bovigam®; Prionics AG, Switzerland) was used
128 according to the manufacturer’s recommendations. Recombinant antigens (ESAT-6) were added in
129 order to improve the specificity (Pollock *et al.*, 2003). The results were expressed as a percentage of
130 optic density (% O.D.) using a normalised formula in order to improve the repeatability of the tests
131 (Faye *et al.*, 2008):

132 Bovigam® result : % D.O. = (Bovine PPD – Avian PPD) / (Positive – Negative)

133 ESAT-6 result : % D.O. = (ESAT-6 – PBS) / (Positive – Negative)

134 The results were positive above 0.04 and negative under this cut-off.

135 The results of Bovigam® and ESAT-6 were interpreted jointly using the rules presented in Table 2.

136 The term “IFN result” refers to the overall result.

137

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

138 Analyses were performed by a unique laboratory, the Veterinary Laboratory of Côte d'Or. Samples
139 were identified by a code number and tests were performed without knowing the results to the
140 other tests.

141 According to EU recommendations (and decision tree used in Côte d'Or) and in order to simplify the
142 interpretation of the results, doubtful results with skin tests and divergent results to IFN were
143 considered as positive ones.

144

145 Statistical methods

146 A latent class analysis through a Bayesian approach implemented in WinBUGS (Lunn *et al.*, 2000) was
147 used to estimate the sensitivities (Se) of the three tests (SIT, SICCT and IFN). Latent class models
148 permit to construct a reference when the true infectious status of the animals is unknown. Since the
149 three studied tests were based on the same biological process, the chosen model allowed to a
150 conditional dependence between their sensitivities and specificities (Enøe *et al.*, 2000). For each pair
151 of test, the sensitivity covariance was estimated using a two test-one population model. More
152 information about the model is available in literature (Gardner *et al.*, 2000 ; Dendukuri *et al.*, 2001 ;
153 Georgiadis *et al.*, 2003 ; Branscum *et al.*, 2005; Praud *et al.*, 2012).

154 Informative priors were modelled as beta(*a,b*) distributions constructed as indicated in Enøe *et al.*
155 *al.*(2000). Priors on sensitivities and specificities were determined from a literature (meta-analysis of
156 previous results; De la Rua-Domenech *et al.* (2006)). Since no information was available on
157 covariances of sensitivities and specificities, these parameters were modelled as uninformative
158 distributions with limits indicated by Toft *et al.* (2007). Prior distributions are summarized in Table 3.
159 The convergence of the MCMC algorithm was assessed by checking the stabilisation of the plots of
160 iterated values of parameters and by running multiple chains from dispersed starting values. Early
161 samples were discarded as a burn-in period of 1000 samples among 51,000. Posterior inferences
162 were expressed as means and 95% credibility intervals (Enøe *et al.*, 2000; Branscum *et al.*, 2005). The
163 results were compared by examining the overlapping of these intervals (Enøe *et al.*, 2000).

164

165 The sensitivities (Se) of the two protocols using these tests in series ("E.U. protocol" and "Côte d'Or
166 protocol") were then calculated as described in Praud *et al.* (2012):

$$167 Se_{EU\ PROTOCOL} = Se_{SIT} * Se_{SICCT} + \gamma Se_{SIT/SICCT}$$

$$168 Se_{CÔTE\ D'OR\ PROTOCOL} = Se_{SICCT} * Se_{IFN} + \gamma Se_{SICCT/IFN}$$

169 The default risk error β was defined as the risk to conclude that an animal was free whereas he was
170 infected: $\beta = 1 - Se$.

171

172 Results

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

173 Cross results to the tests studied by pairs are displayed in table 4 and table 5.
174 The sensitivities of the tests and their covariances estimated with a latent class analysis implemented
175 through a Bayesian approach are presented in table 6.
176 The sensitivity and the risk of default error of both protocols were then estimated. The sensitivity of
177 the “Côte d’Or protocol” (*i.e.* serial association of SICCT and IFN) was 73.1% [41.1%; 100.0%] (95%
178 Confidence Interval; 95% CI) and the sensitivity of the “EU protocol” was 70.1% [31.5%; 100.0%]_{95% CI}.
179 The risks of default error of these two decision schemes were $\beta_{\text{CÔTE D'OR PROTOCOL}} = 26.9\% [0.0\%;$
180 $58.9\%]_{95\% \text{ CI}}$ and $\beta_{\text{EU PROTOCOL}} = 29.9\% [0.0\%; 68.5\%]$, respectively.

181

182 Discussion

183 The aim of our study was to assess the overall sensitivity and the default error risk linked to the
184 application of the screening scheme used in Côte d’Or (serial association of SICCT and IFN) and to
185 compare them with the effectiveness of the screening scheme prescribed by European Commission
186 (serial association of SIT and SICCT). Intradermal and gamma interferon test results of 2,879 animals
187 from 657 farms located in Côte d’Or were collected between 2009 and 2012.

188 The sensitivity of each test has been estimated through a latent class analysis using a Bayesian
189 approach. This approach is adapted to the estimation of tests characteristics in absence of a gold
190 standard and permits to take into account prior information like experts’ opinion or literature data
191 (Greiner and Gardner, 2000).

192 The sensitivities of the tests were estimated in a representative sample of the bovine population
193 submitted to gamma interferon test in Côte d’Or, *i.e.* animals from herds in which non negative
194 results to SICCT were noted. The average sensitivity of IFN (88.1%; [72.8%; 97.5%]_{95% CI}) seemed
195 higher than SICCT sensitivity (80.3%; [61.6%; 98.0%]_{95% CI}) and slightly higher than SIT sensitivity
196 (84.2%; [59.0%; 98.2%]_{95% CI}), but their credibility intervals overlapped widely. Two similar studies off
197 IFN using a Bayesian approach have been carried out recently in Ireland (Clegg *et al.*, 2011) and Spain
198 (Alvarez *et al.*, 2012). The estimated sensitivity of IFN was 89.3% [77.5%; 97.2%]_{95% CI} in Spain and
199 64.1% [60.8%; 67.8%]_{95% CI} in Ireland. Our estimate is thus similar to the Spanish result but
200 significantly higher than the Irish one. In these studies, Bovigam® test was used alone, whereas
201 recombinant antigens were added in France. The cut-offs were not comparable since results were
202 expressed as O.D. without using the % O.D.

203 The screening context is different since in these countries IFN is associated in parallel with skin tests
204 in bovine tuberculosis outbreaks, in order to speed the disease eradication, whereas in Côte d’Or it is
205 mainly used in serial association with skin tests to speed the release of herds further to a false
206 positive result with SICCT. Nevertheless, the IFN is also used in parallel association in Côte d’Or in
207 some herds. In the three countries, the animals with most important reactions to skin tests are

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

208 slaughtered before being subjected to IFN. This includes a selection bias that is likely to
209 underestimate the sensitivity of the IFN.

210 In previous studies, IFN test was described as at least as sensitive as skin tests or more sensitive than
211 these tests (Neill *et al.*, 1994; Wood et Jones, 2001 ; Pollock *et al.*, 2003), since IFN permits to detect
212 the infection earlier than skin tests. According to Dean *et al.* (2005), the period between the infection
213 and the possibility of detection does not depend on the infecting dose. The IFN test is easier to
214 perform than skin tests, since animals need to be restrained only once, to take the blood sample.
215 This is particularly important in Bourgogne, because beef cows spend most time grazing and are not
216 used to be handled. The IFN test can be standardised, its result does not depend on the manipulator
217 and its individual results are systematically recorded by the laboratories. Its main drawbacks are its
218 cost (40 to 60 euros per test per animal) and technical aspects: the delay between the blood
219 sampling and the analysis at the laboratory should not exceed eight hours (Gormley *et al.*, 2004). In
220 Côte d'Or, this condition was satisfied thanks to a specific system of sample collection and to the
221 immediate analysis of the samples by the veterinary laboratory of Côte d'Or.

222 Our second aim was to assess the individual default error risk (*i.e.* the risk of concluding that an
223 infected animal is free) due to the application Côte d'Or protocol and E.U. protocol. The default error
224 risk inhering in the Côte d'Or protocol was $\beta_{\text{CÔTE D'OR PROTOCOL}} = 26.9\% [0.0\%; 58.9\%]_{95\% \text{ CI}}$. The default
225 error risk inhering in the E.U. protocol was $\beta_{\text{EU PROTOCOL}} = 29.9\% [0.0\%; 68.5\%]$. The average value of
226 $\beta_{\text{CÔTE D'OR PROTOCOL}}$ was slightly lower than the average value of $\beta_{\text{EU PROTOCOL}}$ but their confidence intervals
227 overlapped widely. Our study could not demonstrate the existence of a default error risk excess
228 linked to the use of the serial association of SICCT and IFN compared to the serial association of SIT
229 and SICCT. This result suggests that the risk of importing infected cattle considered as free from
230 Bourgogne did not seem higher than from areas following CE/64/432 Directive recommendations.

231
232 To conclude, our study was an original survey aiming at estimating the efficiency of gamma
233 interferon test used in serial association with SICCT for the diagnosis of bovine tuberculosis, in an
234 infected area where the disease prevalence is low.

235 The estimation of the sensitivity of gamma interferon showed that this test was slightly more
236 sensitive than SICTT. Our results were consistent with previous studies, even if the epidemiological
237 context of bovine tuberculosis in Côte d'Or is very particular. When studying the IFN test and skin
238 tests in series, we could not demonstrate the existence of a default error risk excess linked to the use
239 of the serial association of SICCT and IFN compared to the serial association of SIT and SICCT.

240

241 **Acknowledgements**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

242 The authors thank the local veterinary officers of DDPP21, especially Fabrice Chevalier, for the data
243 capture and Eric Gueneau (LVD Côte d'Or) for performing the IFN assays.

244

245 **References**

246 Alvarez, J., de Juan, L., Bezos, J., Romero, B., Saez, J.L., Marques, S., Dominguez, C., Minguéz, O.,
247 Fernandez-Mardomingo, B., Mateos, A., Dominguez, L., Aranaz, A., 2009: Effect of paratuberculosis
248 on the diagnosis of bovine tuberculosis in a cattle herd with a mixed infection using interferon-
249 gamma detection assay. *Vet. Microbiol.* 135, 389-393.

250 Alvarez, J., Perez, A., Bezos, J., Marques, S., Grau, A., Saez, J.L., Minguéz, O., de Juan, L., Dominguez,
251 L., 2012: Evaluation of the sensitivity and specificity of bovine tuberculosis diagnostic tests in
252 naturally infected cattle herds using a Bayesian approach. *Vet. Microbiol.* 155, 38-43.

253 Branscum, A.J., Gardner, I.A., Johnson, W.O., 2005: Estimation of diagnostic-test sensitivity and
254 specificity through Bayesian modeling. *Prev. Vet. Med.* 68, 145-163.

255 Clegg, T., Duignan, A., Whelan, C., Gormley, E., Good, M., Clarke, J., Toft, N., More, S.J., 2011: Using
256 latent class analysis to estimate the test characteristics of the gamma-interferon test, the single
257 intradermal comparative tuberculin test and a multiplex immunoassay under Irish conditions. *Vet.*
258 *Microbiol.* 151, 68-76.

259 De la Rúa-Domenech, R., Goodchild, A.T., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Christiansen, K.H.,
260 Clifton-Hadley, R.S., 2006: Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin
261 tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* 83, 190-210.

262 Dean, G.S., Rhodes, S.G., Coad, M., Whelan, A.O., Cockle, P.J., Clifford, D.J., Hewinson, R.G.,
263 Vordermeier, H.M.: 2005. Minimum infective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infect. Immun.*
264 73(1), 6467-6471.

265 Dendukuri, N., Joseph, L., 2001: Bayesian approaches to modelling the conditional dependence
266 between multiple diagnostic tests. *Biometrics* 57, 158-167.

267 Enøe, C., Georgiadis, M.P., Johnson, W.O., 2000: Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic
268 tests and disease prevalence when the true disease is unknown. *Prev. Vet. Med.* 45, 61-81.

269 Faye, S., Boschioli, M.L., Moyen, J.L., Benet, J.J., Garin-Bastuji, B., Gares, H., 2008 : Study of the
270 specificity and the sensitivity of the dosage of the interferon gamma technique to the cattle for the
271 diagnosis of bovine tuberculosis. *Renc. Rech. Rum.* 15, 81-84.

272 Fediaevsky, A., Bénet, J.J., Boschioli, M.L., Hars, J., 2011 : La tuberculose bovine en France en 2010 :
273 surveillance et détection accrues. *Bull. Epidémiol.* 46, 3-9.

274 Francis, J., 1958: *Tuberculosis in Animals and Man*. Cassell, London.

275 Gardner, I.A., Stryhn, H., Lind, P., Collins, M.T., 2000: Conditional dependence between tests affects
276 the diagnosis and surveillance of animal disease. *Prev. Vet. Med.* 45, 107-122.

- 1
2
3 277 Georgiadis, M.P., Johnson, W.O., Singh, R., Gardner, I.A., 2003: Correlation-adjusted estimation of
4 278 sensitivity and specificity of two diagnostic tests. *Appl. Stat.* 52, 63-78.
5
6 279 Greiner, M. and Gardner, I.A., 2000: Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic
7 280 tests. *Prev. Vet. Med.* 45, 3-22.
8
9 281 Gormley, E., Doyle, M.B., McGill, K., Costello, E., Good, M., Collins, J.D., 2004: The effect of the
10 282 tuberculin test and the consequences of a delay in blood culture on the sensitivity of a gamma-
11 283 interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Immunol.*
12 284 *Immunopathol.* 102, 413-420.
13
14 285 Hui, S.L., Walter, S.D., 1980: Estimating the error rates of diagnostic tests. *Biometrics* 36, 167-171.
15
16 286 Krebs, J.R., Anderson, R., Clutton-Brock, T., Morrison, I., Young, D., Donnelly, C., 1997: *Bovine*
17 287 *tuberculosis in cattle and badgers*. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF) Publications,
18 288 London.
19
20 289 Lunn, D.J., Thomas, A., Best, N., Spiegelhalter, D., 2000: WinBUGS - A Bayesian modelling framework:
21 290 concepts, structure, and extensibility. *Stat. Comput.* 10(4), 325-337.
22
23 291 More, S.J., 2009: What is needed to eradicate bovine tuberculosis successfully: an Irish perspective.
24 292 *Vet. J.* 180, 275-278.
25
26 293 Neill, S.D., Bryson, D.B., Pollock, J.M., 2001: Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis* 81, 9-
27 294 86.
28
29 295 OIE (World Organisation for Animal Health), 2011(a): *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for*
30 296 *Terrestrial Animals*. OIE, Paris.
31
32 297 Pollock, J.M., Neill, S.D., 2002: *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet. J.*
33 298 163(2), 115-127.
34
35 299 Pollock, J.M., McNair, J., Bassett, H., Cassidy, J.P., Costello, E., Aggerbeck, H., Rosenkrands, I.,
36 300 Andersen, P., 2003: Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identify tuberculosis-
37 301 infected cattle. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1856-1860.
38
39 302 Praud, A., Champion, J.L., Corde, Y., Drapeau, A., Meyer, L., Garin-Bastuji, B., 2012: Assessment of
40 303 diagnostic sensitivity and specificity of an indirect ELISA kit for the diagnosis of *Brucella ovis* infection
41 304 in rams. *BMC Vet. Res.* 8: 68.
42
43 305 Rutjes, A.W.S., Reitsma, J.B., Coomarasamy, A., Khan, K.S., Bossuyt, P.M.M., 2007: Evaluation of
44 306 diagnostic tests when there is no gold standard. A review of methods. *Health Technol. Assess.* 11
45 307 (50).
46
47 308 Toft, N., Åkerstedt, J., Tharaldsen, J., Hopp, P., 2007: Evaluation of three serological tests for
48 309 diagnosis of Maedi-Visna virus infection using latent class analysis. *Vet. Microbiol.* 120, 77-86.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

310 Wood, P.R., Corner, L.A., Rothel, J.S., Baldock, C., Jones, S.L., Cousins, D.B., McCornick, B.S., Francis,
311 B.R., Creeper, J., Tweedle, N.F., 1991: Field comparison of the interferon-gamma assay and
312 intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. Aust. Vet. J. 68, 286-290.

313

314 **Table captions**

315 Table 1: Interpretation of the results of SICCT

316 Table 2: Interpretation of the results of gamma interferon test

317 Table 3: Prior Beta(a,b) informative distributions introduced in the model

318 Table 4: Cross results to SICCT and IFN (doubtful and divergent results considered as positive ones)

319 Table 5: Cross results to SIT and SICCT (doubtful and divergent results considered as positive ones)

320 Table 6: Bayesian posterior estimates of the sensitivities of the tests and their covariances

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1: Interpretation of the results of SICCT

Skin fold thickening at the point of bovine PPD injection (DB = B3-B0)	Difference of skin fold thickening at the points of bovine PPD injection (DB = B0 – B3) and avian PPD injection (DA = A3-A0)	Result
DB > 2 mm	DB – DA > 4 mm	Positive
	1 mm ≤ DB – DA ≤ 4 mm	Doubtful
	DB – DA < 1 mm	Negative
DB ≤ 2 mm		Negative

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 2: Interpretation of the results of gamma interferon test

Bovigam® result	ESAT-6 result	IFN result
Positive	Positive	Positive
Positive	Negative	Divergent
Negative	Positive	Divergent
Negative	Negative	Negative

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 3: Prior Beta(a,b) informative distributions introduced in the model

Test	Parameter	Median	Lower limit (95%)	Parameters of prior beta (a,b) distributions	
				a	b
SIT	Se ¹	83.9%	63.2%	9.4	1.79
	Sp ²	96.8%	75.5%	0.10	0.001
SICCT	Se	80.0%	52.0%	5.73	1.43
	Sp	98.8%	78.8%	1.59	0.05
IFN	Se	87.6%	73.0%	21.11	2.88
	Sp	96.6%	85.0%	6.87	0.21

¹ Se: Sensitivity; ² Sp: Specificity

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 4: Cross results to SICCT and IFN (doubtful and divergent results considered as positive ones)

SICCT results	IFN results	Number of animals
Positive	Positive	1,046
Positive	Negative	139
Negative	Positive	1,503
Negative	Negative	183
TOTAL		2,871

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 5: Cross results to SIT and SICCT (doubtful and divergent results considered as positive ones)

SIT results	SICCT results	Number of animals
Positive	Positive	1,499
Positive	Negative	187
Negative	Positive	19
Negative	Negative	82
TOTAL		1,787

Table 6: Bayesian posterior estimates of the sensitivities of the tests and their covariances

Test	Parameter	Mean	95% Credibility Interval (95% CrI)
SIT	Se	0.842	[0.590 ; 0.982]
SICCT	Se ¹	0.803	[0.616 ; 0.980]
IFN	Se	0.881	[0.728 ; 0.975]
SIT and SICCT	γ Se ²	0.025	[-0.048 ; 0.122]
SICCT and IFN	γ Se	0.023	[-0.038 ; 0.105]

¹Se : Sensitivity ; ² γ Se : Sensitivity covariance

Annexe 5 : Récapitulatif au 1^{er} janvier 2012 des études d'évaluation de tests de dépistage de maladies animales infectieuses par une approche bayésienne

Auteurs	Année	Maladie infectieuse dépistée	Espèce animale	Modèle utilisé		
				Nombre de tests	Dépendance	Nombre de populations
Enoe <i>et al.</i>	2001	Infection par <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Porc	2	Oui	6
Valle <i>et al.</i>		Infection par le virus du BVD	Bovin	1	-	5
Fosgate <i>et al.</i>	2002	Brucellose	Bovin	4	Non	2
Sergeant <i>et al.</i>		Paratuberculose	Ovin	2	Oui	2
Hanson <i>et al.</i>	2003	Infection à <i>Mycoplasma pneumoniae</i> et Brucellose	Porc / Bovin	2	Non	1
Orr <i>et al.</i>		Leucose bovine	Bovin	2	Oui	2
Branscum <i>et al.</i>	2005	Peste porcine classique	Porc	1, 2 ou 3	Oui / Non	1 à n
Ridge et Galvin		Leucose	Bovin	2	Non	2
Bronsvooort <i>et al.</i>	2006	Fièvre aphteuse	Bovin	3	Non	5
Fosgate <i>et al.</i>		Brucellose	Buffle et bovin	2	Oui	2
Kostoulas <i>et al.</i>		Paratuberculose	Chèvre	2	Oui	3
Robbe-Austerman <i>et al.</i>		Paratuberculose	Ovin	3	Oui	2
Wells <i>et al.</i>		Paratuberculose	Bovin	4	Oui	7
Elvinger <i>et al.</i>		Influenza aviaire H7N2	Volaille	2	Oui	1
Goris <i>et al.</i>	2007	Fièvre aphteuse	Bovin	2	Oui	2
Mercier <i>et al.</i>		Paratuberculose	Chèvre	2	Non	2
Muma <i>et al.</i>		Brucellose	Bovin	3	Oui	3
Pinches <i>et al.</i>		FIV et FeLV	Chat	3	Non	1
Toft <i>et al.</i>		Infection par le virus du Visna Maedi	Ovin	3	Oui	6
Van Shaik <i>et al.</i>		Paratuberculose	Bovin	2	Oui	2
Bronsvooort <i>et al.</i>	2008	Fièvre aphteuse	Buffle	2	Oui	3
Engel <i>et al.</i>		Fièvre aphteuse	Bovin	6	Oui	6
Mahé <i>et al.</i>		Salmonellose	Volaille	2	Oui	1
Nérette <i>et al.</i>		Anémie infectieuse	Saumon	3	Oui	4
Vandenbussche <i>et al.</i>		Fièvre catarrhale ovine	Ovin	2	-	n
Woldemariam <i>et al.</i>		Campylobactériose	Volaille	2	Oui	2
Alinovi <i>et al.</i>	2009	Paratuberculose	Bovin	4	Non	1
Drew <i>et al.</i>		Tuberculose	Suricate	3	Oui	2
Weber <i>et al.</i>		Paratuberculose	Bovin	2	Oui	2
De Benedictis <i>et al.</i>	2010	Influenza A	Chien	1	-	1
Fablet <i>et al.</i>		Infection par <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	Porc	4	Oui	1
Norton <i>et al.</i>		Paratuberculose	Bovin	2	Oui	4
Rose <i>et al.</i>		Hépatite E	Porc	2	Non	1
Schumaker <i>et al.</i>		Brucellose	Bison	2	Oui	2
Scott <i>et al.</i>		Maladie de Johne	Bovin	2	-	n
Van der Goot <i>et al.</i>		Influenza aviaire	Volaille	2	Oui	2
Wilkins <i>et al.</i>		Salmonellose	Porc	2	Oui	2
Clegg <i>et al.</i>	2011	Tuberculose	Bovin	2	Oui	2
Haley <i>et al.</i>		Infection par le circovirus porcin 2	Porc	2	Oui	2
Matope <i>et al.</i>		Brucellose bovine	Bovin	4	Non	2
Wagner <i>et al.</i>		Infection par <i>Borrelia burgdorferii</i>	Cheval	2	Non	2

Annexe 6 : Principes généraux des tests sérologiques de dépistage de la brucellose étudiés

Epreuve à l'antigène tamponné (EAT) ou Rose-Bengale test (RBT)

L'EAT est une technique qualitative d'agglutination active directe sur lame, obtenue en mélangeant une goutte du sérum de l'individu testé à une goutte d'antigène (Ag constitué d'une suspension inactivée de *Brucella*) coloré au Rose Bengale. L'agglutination apparaît dans les minutes qui suivent et est confirmée par les témoins (positif et négatif) (Figure A).

Figure A : Epreuve à l'Antigène Tamponné : aspect des résultats positif et négatif

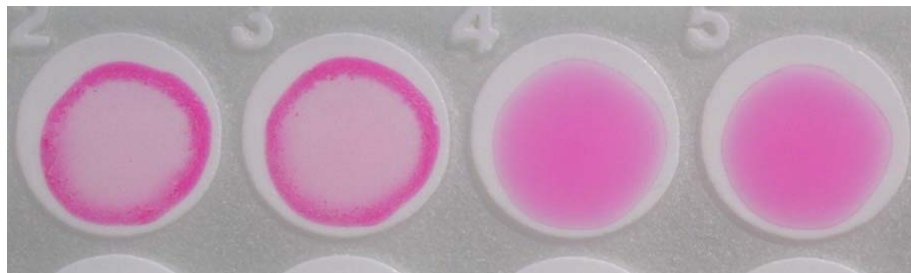


Photo : ANSES

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Le test ELISA peut être utilisé pour la détection et le dosage d'antigènes ou d'anticorps. Dans le cas de la détection d'un anticorps, celui-ci est fixé spécifiquement sur les antigènes tapissant un support, et révélé par un second anticorps (dit « de détection »), couplé à une enzyme qui induit la coloration d'un substrat. La lecture automatisée des densités optiques est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre (Figure B). On distingue plusieurs types d'ELISA. Le principe de l'ELISA indirect (I-ELISA) et de l'ELISA compétitif (C-ELISA) sont détaillés dans la figure C et la figure D, respectivement.

Figure B : Aspect d'une plaque de réaction ELISA en fin de manipulation

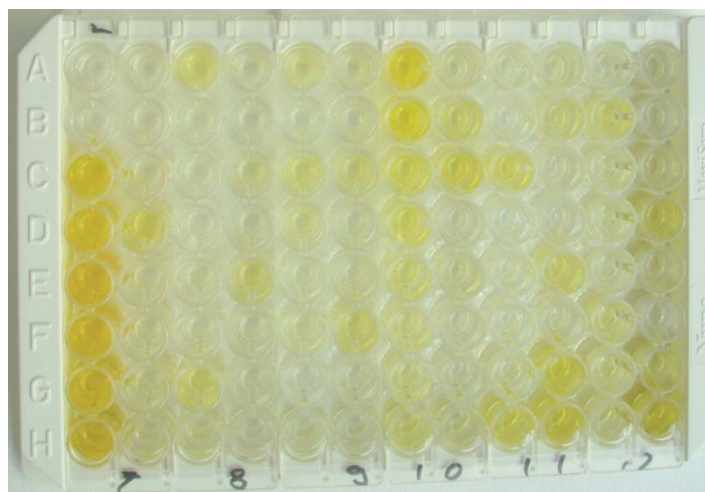


Photo : ANSES

Figure C : Principe de l'ELISA indirect

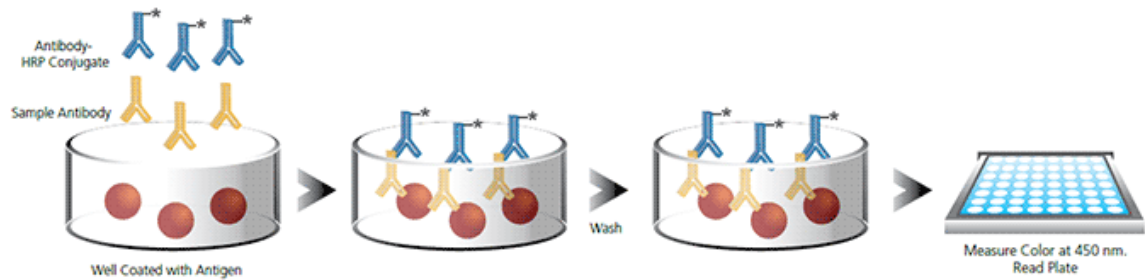


Figure : [<http://www.enzolifesciences.com/support/immunoassay-kits/immunoassay-basics/>]

Figure D : Principe de l'ELISA de compétition

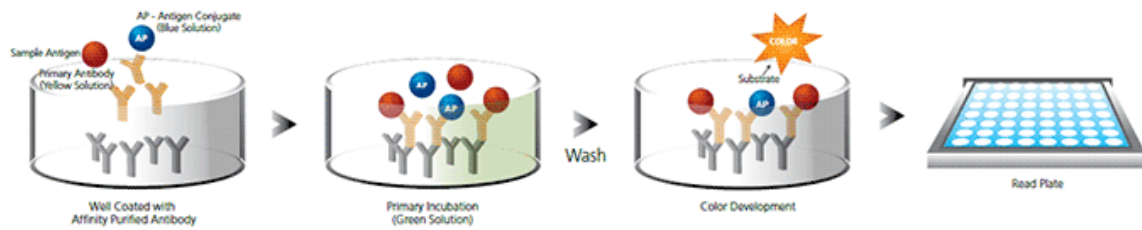


Figure : [<http://www.enzolifesciences.com/support/immunoassay-kits/immunoassay-basics/>]

Test de polarisation de fluorescence ou Polarised Fluorisation Assay (FPA)

Le FPA est basé sur la mesure de la polarisation de la lumière causée par la présence de molécules de grande taille résultant des réactions antigène/anticorps. La vitesse de rotation des molécules en milieu liquide dépend de leur taille, avec une vitesse moins élevée pour grosses molécules. Un marqueur fluorescent est utilisé pour marquer un antigène en solution. Cet antigène est mis en présence du sérum à tester. Si le sérum contient des anticorps spécifiques de l'antigène marqué, un complexe antigène/anticorps de grande taille se forme. Le changement de vitesse de rotation de la molécule du à cette liaison est mis en évidence en lumière polarisée (Figure E).

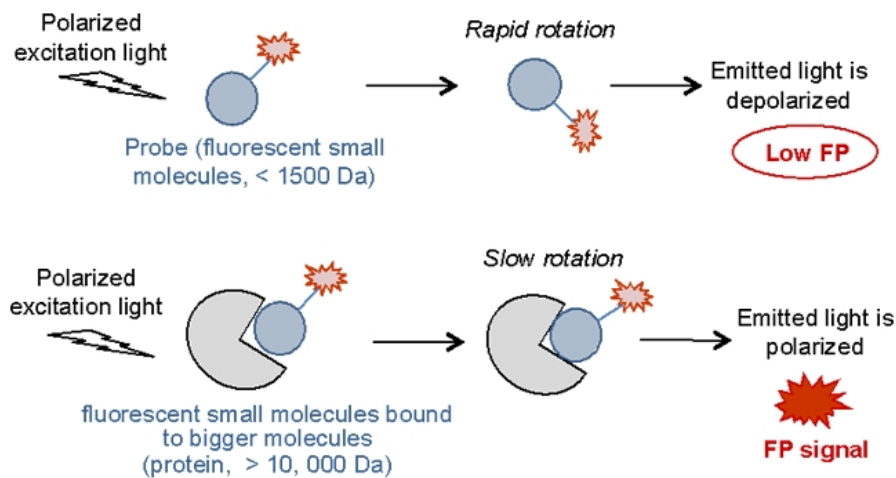
Figure E : Principe du FPA (D'après Arkin *et al.*, 2012)

Figure : [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92000/>]

Test de fixation du complément (FC)

Un antigène spécifique est ajouté au sérum testé. Si des anticorps spécifiques de l'antigène sont présents dans le sérum, des complexes immunitaires se forment. Du complément est ajouté. Il est alors activé par ces complexes immunitaires, et ainsi consommé. Des érythrocytes sensibilisés sont ensuite ajoutés. Une lyse des érythrocytes se produit lorsqu'il reste suffisamment de complément (c'est-à-dire lorsque aucun complexe immunitaire n'a été formé). Si le complément a été consommé, les érythrocytes restent intacts et donnent après centrifugation un précipité (Figure F). L'obtention d'un résultat semi-quantitatif est rendu possible par le titrage du point final du sérum.

Figure F : Aspect d'une plaque de réaction de fixation du complément en fin de manipulation

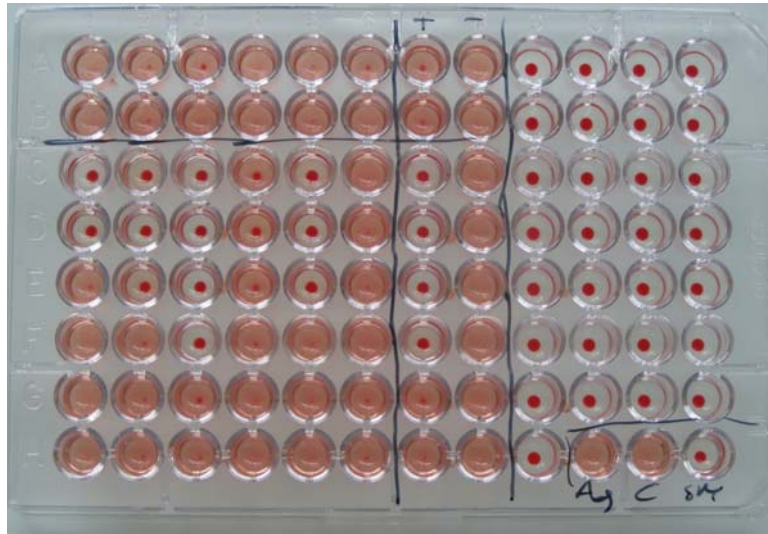


Photo : ANSES

Annexe 7 : Probabilités de survenue des combinaisons de résultats à cinq tests dépendants dans une population

$pr00000 = prev*(1-p2)*(1-p5)*(1-p11)*(1-p23)*(1-p47) + (1-prev)*p3*p6*p12*p24*p48$
 $pr00001 = prev*(1-p2)*(1-p5)*(1-p11)*(1-p23)*p47 + (1-prev)*p3*p6*p12*p24*(1-p48)$
 $pr00010 = prev*(1-p2)*(1-p5)*(1-p11)*p23*(1-p46) + (1-prev)*p3*p6*p12*(1-p24)*p49$
 $pr00011 = prev*(1-p2)*(1-p5)*(1-p11)*p23*p46 + (1-prev)*p3*p6*p12*(1-p24)*(1-p49)$
 $pr00100 = prev*(1-p2)*(1-p5)*p11*(1-p22)*(1-p45) + (1-prev)*p3*p6*(1-p12)*p25*p50$
 $pr00101 = prev*(1-p2)*(1-p5)*p11*(1-p22)*p45 + (1-prev)*p3*p6*(1-p12)*p25*(1-p50)$
 $pr00110 = prev*(1-p2)*(1-p5)*p11*p22*(1-p44) + (1-prev)*p3*p6*(1-p12)*(1-p25)*p51$
 $pr00111 = prev*(1-p2)*(1-p5)*p11*p22*p44 + (1-prev)*p3*p6*(1-p12)*(1-p25)*(1-p51)$
 $pr01000 = prev*(1-p2)*p5*(1-p10)*(1-p21)*(1-p43) + (1-prev)*p3*(1-p6)*p13*p26*p52$
 $pr01001 = prev*(1-p2)*p5*(1-p10)*(1-p21)*p43 + (1-prev)*p3*(1-p6)*p13*p26*(1-p52)$
 $pr01010 = prev*(1-p2)*p5*(1-p10)*p21*(1-p42) + (1-prev)*p3*(1-p6)*p13*(1-p26)*p53$
 $pr01011 = prev*(1-p2)*p5*(1-p10)*p21*p42 + (1-prev)*p3*(1-p6)*p13*(1-p26)*(1-p53)$
 $pr01100 = prev*(1-p2)*p5*p10*(1-p20)*(1-p41) + (1-prev)*p3*(1-p6)*(1-p13)*p27*p54$
 $pr01101 = prev*(1-p2)*p5*p10*(1-p20)*p41 + (1-prev)*p3*(1-p6)*(1-p13)*p27*(1-p54)$
 $pr01110 = prev*(1-p2)*p5*p10*p20*(1-p40) + (1-prev)*p3*(1-p6)*(1-p13)*(1-p27)*p55$
 $pr01111 = prev*(1-p2)*p5*p10*p20*p40 + (1-prev)*p3*(1-p6)*(1-p13)*(1-p27)*(1-p55)$
 $pr10000 = prev*p2*(1-p4)*(1-p9)*(1-p19)*(1-p39) + (1-prev)*(1-p3)*p7*p14*p28*p56$
 $pr10001 = prev*p2*(1-p4)*(1-p9)*(1-p19)*p39 + (1-prev)*(1-p3)*p7*p14*p28*(1-p56)$
 $pr10010 = prev*p2*(1-p4)*(1-p9)*p19*(1-p38) + (1-prev)*(1-p3)*p7*p14*(1-p28)*p57$
 $pr10011 = prev*p2*(1-p4)*(1-p9)*p19*p38 + (1-prev)*(1-p3)*p7*p14*(1-p28)*(1-p57)$
 $pr10100 = prev*p2*(1-p4)*p9*(1-p18)*(1-p37) + (1-prev)*(1-p3)*p7*(1-p14)*p29*p58$
 $pr10101 = prev*p2*(1-p4)*p9*(1-p18)*p37 + (1-prev)*(1-p3)*p7*(1-p14)*p29*(1-p58)$
 $pr10110 = prev*p2*(1-p4)*p9*p18*(1-p36) + (1-prev)*(1-p3)*p7*(1-p14)*(1-p29)*p59$
 $pr10111 = prev*p2*(1-p4)*p9*p18*p36 + (1-prev)*(1-p3)*p7*(1-p14)*(1-p29)*(1-p59)$
 $pr11000 = prev*p2*p4*(1-p8)*(1-p17)*(1-p35) + (1-prev)*(1-p3)*(1-p7)*p15*p30*p60$
 $pr11001 = prev*p2*p4*(1-p8)*(1-p17)*p35 + (1-prev)*(1-p3)*(1-p7)*p15*p30*(1-p60)$
 $pr11010 = prev*p2*p4*(1-p8)*p17*(1-p34) + (1-prev)*(1-p3)*(1-p7)*p15*(1-p30)*p61$
 $pr11011 = prev*p2*p4*(1-p8)*p17*p34 + (1-prev)*(1-p3)*(1-p7)*p15*(1-p30)*(1-p61)$
 $pr11100 = prev*p2*p4*p8*(1-p16)*(1-p33) + (1-prev)*(1-p3)*(1-p7)*(1-p15)*p31*p62$
 $pr11101 = prev*p2*p4*p8*(1-p16)*p33 + (1-prev)*(1-p3)*(1-p7)*(1-p15)*p31*(1-p62)$
 $pr11110 = prev*p2*p4*p8*p16*(1-p32) + (1-prev)*(1-p3)*(1-p7)*(1-p15)*(1-p31)*p63$
 $pr11111 = prev*p2*p4*p8*p16*p32 + (1-prev)*(1-p3)*(1-p7)*(1-p15)*(1-p31)*(1-p63)$

Annexe 8 : Expression des paramètres d'un modèle permettant l'estimation des caractéristiques de cinq tests dépendants dans une population en fonction des probabilités conditionnelles des combinaisons de résultats aux cinq tests

$$Se1=p2$$

$$Sp1=p3$$

$$Se2=p2*p4+(1-p2)*p5$$

$$Sp2=p3*p6+(1-p3)*p7$$

$$Se3=p2*(p4*p8+(1-p4)*p9)+(1-p2)*(p5*p10+(1-p5)*p11)$$

$$Sp3=p3*(p6*p12+(1-p6)*p13)+(1-p3)*(p7*p14+(1-p7)*p15)$$

$$Se4=p2*(p4*(p8*p16+(1-p8)*p17)+(1-p4)*(p9*p18+(1-p9)*p19))+(1-p2)*(p5*(p10*p20+(1-p10)*p21)+(1-p5)*(p11*p22+(1-p11)*p23))$$

$$Sp4=p3*(p6*(p12*p24+(1-p12)*p25)+(1-p6)*(p13*p26+(1-p13)*p27))+(1-p3)*(p7*(p14*p28+(1-p14)*p29)+(1-p7)*(p15*p30+(1-p15)*p31))$$

$$Se5=p2*(p4*(p8*(p16*p32+(1-p16)*p33)+(1-p8)*(p17*p34+(1-p17)*p35))+(1-p4)*(p9*(p18*p36+(1-p18)*p37)+(1-p9)*(p19*p38+(1-p19)*p39)))+(1-p2)*(p5*(p10*(p20*p40+(1-p20)*p41)+(1-p10)*(p21*p42+(1-p21)*p43))+(1-p5)*(p11*(p22*p44+(1-p22)*p45)+(1-p11)*(p23*p46+(1-p23)*p47)))$$

$$Sp5=p3*(p6*(p12*(p24*p48+(1-p24)*p49)+(1-p12)*(p25*p50+(1-p25)*p51))+(1-p6)*(p13*(p26*p52+(1-p26)*p53)+(1-p13)*(p27*p54+(1-p27)*p55)))+(1-p3)*(p7*(p14*(p28*p56+(1-p28)*p57)+(1-p14)*(p29*p58+(1-p29)*p59))+(1-p7)*(p15*(p30*p60+(1-p30)*p61)+(1-p15)*(p31*p62+(1-p31)*p63)))$$

Annexe 9 : Expression des covariances des sensibilités de cinq tests dépendants étudiés par paires dans une population

$$\gamma_{SeT_1T_2} = p_2 * p_4 - se_1 * se_2$$

$$\gamma_{SeT_1T_3} = p_2 * (p_4 * p_8 + (1-p_4) * p_9) - se_1 * se_3$$

$$\gamma_{SeT_1T_4} = p_2 * (p_4 * (p_8 * p_{16} + (1-p_8) * p_{17}) + (1-p_4) * (p_9 * p_{18} + (1-p_9) * p_{19})) - se_1 * se_4$$

$$\gamma_{SeT_1T_5} = p_2 * (p_4 * (p_8 * (p_{16} * p_{32} + (1-p_{16}) * p_{33}) + (1-p_8) * (p_{17} * p_{34} + (1-p_{17}) * p_{35})) + (1-p_4) * (p_9 * (p_{18} * p_{36} + (1-p_{18}) * p_{37}) + (1-p_9) * (p_{19} * p_{38} + (1-p_{19}) * p_{39}))) - se_1 * se_5$$

$$\gamma_{SeT_2T_3} = p_2 * p_4 * p_8 + (1-p_2) * p_5 * p_{10} - se_2 * se_3$$

$$\gamma_{SeT_2T_4} = p_2 * (p_4 * (p_8 * p_{16} + (1-p_8) * p_{17}) + (1-p_2) * (p_5 * (p_{10} * p_{20} + (1-p_{10}) * p_{21}))) - se_2 * se_4$$

$$\gamma_{SeT_2T_5} <- p_2 * (p_4 * (p_8 * (p_{16} * p_{32} + (1-p_{16}) * p_{33}) + (1-p_8) * (p_{17} * p_{34} + (1-p_{17}) * p_{35}))) + (1-p_2) * (p_5 * (p_{10} * (p_{20} * p_{40} + (1-p_{20}) * p_{41}) + (1-p_{10}) * (p_{21} * p_{42} + (1-p_{21}) * p_{43}))) - se_2 * se_5$$

$$\gamma_{SeT_3T_4} = p_2 * (p_4 * p_8 * p_{16} + (1-p_4) * p_9 * p_{18}) + (1-p_2) * (p_5 * p_{10} * p_{20} + (1-p_5) * p_{11} * p_{22}) - se_3 * se_4$$

$$\gamma_{SeT_3T_5} = p_2 * (p_4 * (p_8 * (p_{16} * p_{32} + (1-p_{16}) * p_{33})) + (1-p_4) * (p_9 * (p_{18} * p_{36} + (1-p_{18}) * p_{37}))) + (1-p_2) * (p_5 * (p_{10} * (p_{20} * p_{40} + (1-p_{20}) * p_{41}) + (1-p_{10}) * (p_{21} * (p_{22} * p_{44} + (1-p_{22}) * p_{45})))) - se_3 * se_5$$

$$\gamma_{SeT_4T_5} = p_2 * (p_4 * (p_8 * (p_{16} * p_{32} + (1-p_8) * (p_{17} * p_{34})) + (1-p_4) * (p_9 * (p_{18} * p_{36} + (1-p_9) * (p_{19} * p_{38})))) + (1-p_2) * (p_5 * (p_{10} * (p_{20} * p_{40} + (1-p_{10}) * (p_{21} * p_{42})) + (1-p_5) * (p_{11} * (p_{22} * p_{44} + (1-p_{11}) * (p_{23} * p_{46})))) - se_4 * se_5$$

Annexe 10 : Expression des covariances de spécificités de cinq tests dépendants étudiés par paires dans une population

$$\gamma_{SpT_1T_2} = p_3 * p_6 - sp_1 * sp_2$$

$$\gamma_{SpT_1T_3} = p_3 * (p_6 * p_{12} + (1 - p_6) * p_{13}) - sp_1 * sp_3$$

$$\gamma_{SpT_1T_4} = p_3 * (p_6 * (p_{12} * p_{24} + (1 - p_{12}) * p_{25}) + (1 - p_6) * (p_{13} * p_{26} + (1 - p_{13}) * p_{27})) - sp_1 * sp_4$$

$$\gamma_{SpT_1T_5} = p_3 * (p_6 * (p_{12} * (p_{24} * p_{48} + (1 - p_{24}) * p_{49}) + (1 - p_{12}) * (p_{25} * p_{50} + (1 - p_{25}) * p_{51})) + (1 - p_6) * (p_{13} * (p_{26} * p_{52} + (1 - p_{26}) * p_{53}) + (1 - p_{13}) * (p_{27} * p_{54} + (1 - p_{27}) * p_{55}))) - sp_1 * sp_5$$

$$\gamma_{SpT_2T_3} = p_3 * p_6 * p_{12} + (1 - p_3) * p_7 * p_{14} - sp_2 * sp_3$$

$$\gamma_{SpT_2T_4} = p_3 * (p_6 * (p_{12} * p_{24} + (1 - p_{12}) * p_{25})) + (1 - p_3) * (p_7 * (p_{14} * p_{28} + (1 - p_{14}) * p_{29})) - sp_2 * sp_4$$

$$\gamma_{SpT_2T_5} = p_3 * (p_6 * (p_{12} * (p_{24} * p_{48} + (1 - p_{24}) * p_{49}) + (1 - p_{12}) * (p_{25} * p_{50} + (1 - p_{25}) * p_{51}))) + (1 - p_3) * (p_7 * (p_{14} * (p_{28} * p_{56} + (1 - p_{28}) * p_{57}) + (1 - p_{14}) * (p_{29} * p_{58} + (1 - p_{29}) * p_{59}))) - sp_2 * sp_5$$

$$\gamma_{SpT_3T_4} = p_3 * (p_6 * p_{12} * p_{24} + (1 - p_6) * p_{13} * p_{26}) + (1 - p_3) * (p_7 * p_{14} * p_{28} + (1 - p_7) * p_{15} * p_{30}) - sp_3 * sp_4$$

$$\gamma_{SpT_3T_5} = p_3 * (p_6 * (p_{12} * (p_{24} * p_{48} + (1 - p_{24}) * p_{49})) + (1 - p_6) * (p_{13} * (p_{26} * p_{52} + (1 - p_{26}) * p_{53}))) + (1 - p_3) * (p_7 * (p_{14} * (p_{28} * p_{56} + (1 - p_{28}) * p_{57})) + (1 - p_7) * (p_{15} * (p_{30} * p_{60} + (1 - p_{30}) * p_{61}))) - sp_3 * sp_5$$

$$\gamma_{SpT_4T_5} = p_3 * (p_6 * (p_{12} * (p_{24} * p_{48}) + (1 - p_{12}) * (p_{25} * p_{50})) + (1 - p_6) * (p_{13} * (p_{26} * p_{52}) + (1 - p_{13}) * (p_{27} * p_{54}))) + (1 - p_3) * (p_7 * (p_{14} * (p_{28} * p_{56}) + (1 - p_{14}) * (p_{29} * p_{58})) + (1 - p_7) * (p_{15} * (p_{30} * p_{60}) + (1 - p_{15}) * (p_{31} * p_{62}))) - sp_4 * sp_5$$

Annexe 11 : Code WinBUGS utilisé pour l'estimation des caractéristiques de cinq tests dépendants dans une population

```

model
{
r[1:32]~dmulti(pr[1:32],n1)
pr[1] <- prev1*(1-p2)*(1-p5)*(1-p11)*(1-p23)*(1-p47)+ (1-prev1)*p3*p6*p12*p24*p48
pr[2] <- prev1*(1-p2)*(1-p5)*(1-p11)*(1-p23)*p47+ (1-prev1)*p3*p6*p12*p24*(1-p48)
pr[3] <- prev1*(1-p2)*(1-p5)*(1-p11)*p23*(1-p46)+ (1-prev1)*p3*p6*p12*(1-p24)*p49
pr[4] <- prev1*(1-p2)*(1-p5)*(1-p11)*p23*p46 + (1-prev1)*p3*p6*p12*(1-p24)*(1-p49)
pr[5] <- prev1*(1-p2)*(1-p5)*p11*(1-p22)*(1-p45)+ (1-prev1)*p3*p6*(1-p12)*p25*p50
pr[6] <- prev1*(1-p2)*(1-p5)*p11*(1-p22)*p45 + (1-prev1)*p3*p6*(1-p12)*p25*(1-p50)
pr[7] <- prev1*(1-p2)*(1-p5)*p11*p22*(1-p44) + (1-prev1)*p3*p6*(1-p12)*(1-p25)*p51
pr[8] <- prev1*(1-p2)*(1-p5)*p11*p22*p44 + (1-prev1)*p3*p6*(1-p12)*(1-p25)*(1-p51)
pr[9] <- prev1*(1-p2)*p5*(1-p10)*(1-p21)*(1-p43)+ (1-prev1)*p3*(1-p6)*p13*p26*p52
pr[10] <- prev1*(1-p2)*p5*(1-p10)*(1-p21)*p43 + (1-prev1)*p3*(1-p6)*p13*p26*(1-p52)
pr[11] <- prev1*(1-p2)*p5*(1-p10)*p21*(1-p42) + (1-prev1)*p3*(1-p6)*p13*(1-p26)*p53
pr[12] <- prev1*(1-p2)*p5*(1-p10)*p21*p42 + (1-prev1)*p3*(1-p6)*p13*(1-p26)*(1-p53)
pr[13] <- prev1*(1-p2)*p5*p10*(1-p20)*(1-p41) + (1-prev1)*p3*(1-p6)*(1-p13)*p27*p54
pr[14] <- prev1*(1-p2)*p5*p10*(1-p20)*p41 + (1-prev1)*p3*(1-p6)*(1-p13)*p27*(1-p54)
pr[15] <- prev1*(1-p2)*p5*p10*p20*(1-p40) + (1-prev1)*p3*(1-p6)*(1-p13)*(1-p27)*p55
pr[16] <- prev1*(1-p2)*p5*p10*p20*p40+ (1-prev1)*p3*(1-p6)*(1-p13)*(1-p27)*(1-p55)
pr[17] <- prev1*p2*(1-p4)*(1-p9)*(1-p19)*(1-p39)+ (1-prev1)*(1-p3)*p7*p14*p28*p56
pr[18] <- prev1*p2*(1-p4)*(1-p9)*(1-p19)*p39 + (1-prev1)*(1-p3)*p7*p14*p28*(1-p56)
pr[19] <- prev1*p2*(1-p4)*(1-p9)*p19*(1-p38) + (1-prev1)*(1-p3)*p7*p14*(1-p28)*p57
pr[20] <- prev1*p2*(1-p4)*(1-p9)*p19*p38 + (1-prev1)*(1-p3)*p7*p14*(1-p28)*(1-p57)
pr[21] <- prev1*p2*(1-p4)*p9*(1-p18)*(1-p37) + (1-prev1)*(1-p3)*p7*(1-p14)*p29*p58
pr[22] <- prev1*p2*(1-p4)*p9*(1-p18)*p37 + (1-prev1)*(1-p3)*p7*(1-p14)*p29*(1-p58)
pr[23] <- prev1*p2*(1-p4)*p9*p18*(1-p36) + (1-prev1)*(1-p3)*p7*(1-p14)*(1-p29)*p59
pr[24] <- prev1*p2*(1-p4)*p9*p18*p36 + (1-prev1)*(1-p3)*p7*(1-p14)*(1-p29)*(1-p59)
pr[25] <- prev1*p2*p4*(1-p8)*(1-p17)*(1-p35)+ (1-prev1)*(1-p3)*(1-p7)*p15*p30*p60
pr[26] <- prev1*p2*p4*(1-p8)*(1-p17)*p35 + (1-prev1)*(1-p3)*(1-p7)*p15*p30*(1-p60)
pr[27] <- prev1*p2*p4*(1-p8)*p17*(1-p34) + (1-prev1)*(1-p3)*(1-p7)*p15*(1-p30)*p61
pr[28] <- prev1*p2*p4*(1-p8)*p17*p34+ (1-prev1)*(1-p3)*(1-p7)*p15*(1-p30)*(1-p61)
pr[29] <- prev1*p2*p4*p8*(1-p16)*(1-p33) + (1-prev1)*(1-p3)*(1-p7)*(1-p15)*p31*p62
pr[30] <- prev1*p2*p4*p8*(1-p16)*p33+ (1-prev1)*(1-p3)*(1-p7)*(1-p15)*p31*(1-p62)
pr[31] <- prev1*p2*p4*p8*p16*(1-p32) + (1-prev1)*(1-p3)*(1-p7)*(1-p15)*(1-p31)*p63
pr[32] <- prev1*p2*p4*p8*p16*p32 + (1-prev1)*(1-p3)*(1-p7)*(1-p15)*(1-p31)*(1-p63)
prev1~ dbeta(1,1)
p2 ~ dbeta(a,b)
p3 ~ dbeta(a,b)
p4 ~ dbeta(1,1)
p5 ~ dbeta(1,1)
p6 ~ dbeta(1,1)
p7 ~ dbeta(1,1)
p8 ~ dbeta(1,1)
p9 ~ dbeta(1,1)
p10 ~ dbeta(1,1)
p11 ~ dbeta(1,1)
p12 ~ dbeta(1,1)
p13 ~ dbeta(1,1)

```


p14 ~ dbeta(1,1)
p15 ~ dbeta(1,1)
p16 ~ dbeta(1,1)
p17 ~ dbeta(1,1)
p18 ~ dbeta(1,1)
p19 ~ dbeta(1,1)
p20 ~ dbeta(1,1)
p21 ~ dbeta(1,1)
p22 ~ dbeta(1,1)
p23 ~ dbeta(1,1)
p24 ~ dbeta(1,1)
p25 ~ dbeta(1,1)
p26 ~ dbeta(1,1)
p27 ~ dbeta(1,1)
p28 ~ dbeta(1,1)
p29 ~ dbeta(1,1)
p30 ~ dbeta(1,1)
p31 ~ dbeta(1,1)
p32 ~ dbeta(1,1)
p33 ~ dbeta(1,1)
p34 ~ dbeta(1,1)
p35 ~ dbeta(1,1)
p36 ~ dbeta(1,1)
p37 ~ dbeta(1,1)
p38 ~ dbeta(1,1)
p39 ~ dbeta(1,1)
p40 ~ dbeta(1,1)
p41 ~ dbeta(1,1)
p42 ~ dbeta(1,1)
p43 ~ dbeta(1,1)
p44 ~ dbeta(1,1)
p45 ~ dbeta(1,1)
p46 ~ dbeta(1,1)
p47 ~ dbeta(1,1)
p48 ~ dbeta(1,1)
p49 ~ dbeta(1,1)
p50 ~ dbeta(1,1)
p51 ~ dbeta(1,1)
p52 ~ dbeta(1,1)
p53 ~ dbeta(1,1)
p54 ~ dbeta(1,1)
p55 ~ dbeta(1,1)
p56 ~ dbeta(1,1)
p57 ~ dbeta(1,1)
p58 ~ dbeta(1,1)
p59 ~ dbeta(1,1)
p60 ~ dbeta(1,1)
p61 ~ dbeta(1,1)
p62 ~ dbeta(1,1)
p63 ~ dbeta(1,1)

```

se1 <- p2
sp1 <- p3
se2 <- p2*p4 + (1-p2)*p5
sp2 <- p3*p6 + (1-p3)*p7
se3 <- p2*(p4*p8 + (1-p4)*p9) + (1-p2)*(p5*p10 + (1-p5)*p11)
sp3 <- p3*(p6*p12 + (1-p6)*p13) + (1-p3)*(p7*p14 + (1-p7)*p15)
se4 <- p2*(p4*(p8*p16 + (1-p8)*p17) + (1-p4)*(p9*p18+ (1-p9) *p19)) + (1-p2)*(p5*(p10*p20 + (1-
p10)*p21)+(1-p5)*(p11*p22+(1-p11)*p23))
sp4 <- p3*(p6*(p12*p24 + (1-p12)*p25) + (1-p6)*(p13*p26 + (1-p13)*p27)) + (1-p3)*(p7*(p14*p28 +
(1-p14)*p29) + (1-p7)*(p15*p30 + (1-p15)*p31))
se5a <- p2*(p4*(p8*(p16*p32 + (1-p16)*p33) + (1-p8)*(p17*p34 + (1-p17)*p35)) + (1-
p4)*(p9*(p18*p36 + (1-p18)*p37) + (1-p9)*(p19*p38 + (1-p19)*p39)))
se5b <- (1-p2)*(p5*(p10*(p20*p40 + (1-p20)*p41) + (1-p10)*(p21*p42 + (1-p21)*p43)) + (1-
p5)*(p11*(p22*p44 + (1-p22)*p45) + (1-p11)*(p23*p46 + (1-p23)*p47)))
se5 <-se5a+se5b
sp5a <- p3*(p6*(p12*(p24*p48 + (1-p24)*p49) + (1-p12)*(p25*p50 + (1-p25)*p51)) + (1-
p6)*(p13*(p26*p52 + (1-p26)*p53) + (1-p13)*(p27*p54 + (1-p27)*p55)))
sp5b <- (1-p3)*(p7*(p14*(p28*p56 + (1-p28)*p57) + (1-p14)*(p29*p58 + (1-p29)*p59)) + (1-
p7)*(p15*(p30*p60 + (1-p30)*p61) + (1-p15)*(p31*p62 + (1-p31)*p63)))
sp5 <- sp5a+sp5b
covse12 <- p2*p4 - se1*se2
covsp12 <- p3*p6 - sp1*sp2
covse13 <- p2*(p4*p8+(1-p4)*p9) - se1*se3
covsp13 <- p3*(p6*p12+(1-p6)*p13) - sp1*sp3
covse14 <- p2*(p4*(p8*p16+(1-p8)*p17)+(1-p4)*(p9*p18+(1-p9)*p19)) - se1*se4
covsp14 <- p3*(p6*(p12*p24+(1-p12)*p25)+(1-p6)*(p13*p26+(1-p13)*p27)) - sp1*sp4
covse15 <- p2*(p4*(p8*(p16*p32 + (1-p16)*p33) + (1-p8)*(p17*p34 + (1-p17)*p35)) + (1-
p4)*(p9*(p18*p36 + (1-p18)*p37) + (1-p9)*(p19*p38 + (1-p19)*p39))) - se1*se5
covsp15 <- p3*(p6*(p12*(p24*p48 + (1-p24)*p49) + (1-p12)*(p25*p50 + (1-p25)*p51)) + (1-
p6)*(p13*(p26*p52 + (1-p26)*p53) + (1-p13)*(p27*p54 + (1-p27)*p55))) - sp1*sp5
covse23 <- p2*p4*p8+(1-p2)*p5*p10 - se2*se3
covsp23 <- p3*p6*p12+(1-p3)*p7*p14 - sp2*sp3
covse24 <- p2*(p4*(p8*p16 + (1-p8)*p17)) + (1-p2)*(p5*(p10*p20 + (1-p10)*p21)) - se2*se4
covsp24 <- p3*(p6*(p12*p24 + (1-p12)*p25)) + (1-p3)*(p7*(p14*p28 + (1-p14)*p29)) - sp2*sp4
covse25 <- p2*(p4*(p8*(p16*p32 + (1-p16)*p33) + (1-p8)*(p17*p34 + (1-p17)*p35))) + (1-
p2)*(p5*(p10*(p20*p40 + (1-p20)*p41) + (1-p10)*(p21*p42 + (1-p21)*p43))) - se2*se5
covsp25 <- p3*(p6*(p12*(p24*p48 + (1-p24)*p49) + (1-p12)*(p25*p50 + (1-p25)*p51)))+(1-
p3)*(p7*(p14*(p28*p56 + (1-p28)*p57) + (1-p14)*(p29*p58 + (1-p29)*p59))) - sp2*sp5
covse34 <- p2*(p4*p8*p16 + (1-p4)*p9*p18) + (1-p2)*(p5*p10*p20+(1-p5)*p11*p22) - se3*se4
covsp34 <- p3*(p6*p12*p24+(1-p6)*p13*p26) + (1-p3)*(p7*p14*p28+(1-p7)*p15*p30) - sp3*sp4
covse35 <- p2*(p4*(p8*(p16*p32 + (1-p16)*p33)) + (1-p4)*(p9*(p18*p36 + (1-p18)*p37)))+(1-
p2)*(p5*(p10*(p20*p40 + (1-p20)*p41)+(1-p5)*(p11*(p22*p44 + (1-p22)*p45))) - se3*se5
covsp35 <- p3*(p6*(p12*(p24*p48 + (1-p24)*p49)) + (1-p6)*(p13*(p26*p52 + (1-p26)*p53)))+(1-
p3)*(p7*(p14*(p28*p56 + (1-p28)*p57)))+(1-p7)*(p15*(p30*p60 + (1-p30)*p61))) - sp3*sp5
covse45 <- p2*(p4*(p8*(p16*p32) + (1-p8)*(p17*p34)))+(1-p4)*(p9*(p18*p36)+(1-
p9)*(p19*p38)))+(1-p2)*(p5*(p10*(p20*p40)+(1-p10)*(p21*p42)))+(1-p5)*(p11*(p22*p44)+(1-
p11)*(p23*p46))) - se4*se5
covsp45 <- p3*(p6*(p12*(p24*p48) + (1-p12)*(p25*p50)) + (1-p6)*(p13*(p26*p52) + (1-
p13)*(p27*p54)))+(1-p3)*(p7*(p14*(p28*p56) + (1-p14)*(p29*p58)) + (1-p7)*(p15*(p30*p60) + (1-
p15)*(p31*p62))) - sp4*sp5
}

```

Annexe 12 : Estimation des covariances de sensibilité et de spécificité des cinq tests de dépistage de la brucellose porcine étudiés par paires en France métropolitaine

(Analyse « Résultats douteux exclus »)

Test 1	Test 2	Estimation des covariances des sensibilités (γ_{Se} , ICr 95% ¹)	Estimation des covariances des spécificités (γ_{Sp} , ICr 95% ¹)
EAT	FPA	0,01728 [3,64E ⁻⁰³ ; 0,03677]	0,03181 [0,02589 ; 0,03797]
EAT	I-ELISA	-1,532E ⁻⁰³ [-0,01751 ; 0,01835]	0,01496 [0,01084 ; 0,01987]
EAT	C-ELISA ₁	0,02103 [3,192E ⁻⁰³ ; 0,04698]	0,02812 [0,02228 ; 0,03451]
EAT	C-ELISA ₂	0,01433 [1,313E ⁻⁰³ ; 0,0431]	1,778E ⁻⁰³ [1,625E ⁻⁰⁵ ; 7,369E ⁻⁰³]
FPA	I-ELISA	9,699E ⁻⁰³ [-3,663E ⁻⁰³ ; 0,02904]	0,03615 [0,01978 ; 0,03294]
FPA	C-ELISA ₁	0,01606 [1,923E ⁻⁰³ ; 0,03731]	0,03272 [0,02588 ; 0,04033]
FPA	C-ELISA ₂	0,01297 [1,367E ⁻⁰³ ; 0,0392]	2,154E ⁻⁰³ [1,281E ⁻⁰⁵ ; 9,706E ⁻⁰³]
I-ELISA	C-ELISA ₁	0,01238 [-3,029E ⁻⁰³ ; 0,03502]	0,01862 [0,01317 ; 0,02556]
I-ELISA	C-ELISA ₂	9,316E ⁻⁰³ [-7,422E ⁻⁰³ ; 0,03756]	1,911E-03 [9,943E ⁻⁰⁶ ; 8,899E ⁻⁰³]
C-ELISA ₁	C-ELISA ₂	0,0145 [-3,633E ⁻⁰⁴ ; 0,054]	1,938E-03 [-1,281E ⁻⁰⁵ ; 0,01011]

¹ Intervalle de crédibilité à 95%

Annexe 13 : Estimation des sensibilités et de spécificités de cinq tests de dépistage de la brucellose porcine étudiés en France métropolitaine après inclusion des résultats douteux en I-ELISA et/ou en FPA dans l'étude

(Analyses « Résultats douteux interprétés comme négatifs », « Résultats douteux interprétés comme positifs » et « Résultats douteux interprétés selon le contexte »)

Paramètre		Douteux interprétés comme négatifs [ICr 95%] ¹	Douteux interprétés comme positifs [ICr 95%] ¹	Douteux interprétés selon le contexte [ICr 95%] ¹
EAT	Se ²	0,879 [0,833 ; 0,927]	0,868 [0,828 ; 0,904]	0,869 [0,825 ; 0,909]
	Sp ³	0,943 [0,930 ; 0,953]	0,945 [0,937 ; 0,953]	0,943 [0,905 ; 0,953]
FPA	Se	0,929 [0,913 ; 0,940]	0,941 [0,894 ; 0,972]	0,936 [0,885 ; 0,970]
	Sp	0,930 [0,917 ; 0,941]	0,830 [0,817 ; 0,841]	0,911 [0,870 ; 0,923]
I-ELISA	Se	0,664 [0,612 ; 0,717]	0,687 [0,639 ; 0,730]	0,692 [0,630 ; 0,945]
	Sp	0,969 [0,957 ; 0,970]	0,960 [0,952 ; 0,967]	0,964 [0,951 ; 0,972]
C-ELISA₁	Se	0,908 [0,849 ; 0,986]	0,951 [0,905 ; 0,989]	0,946 [0,893 ; 0,987]
	Sp	0,949 [0,935 ; 0,959]	0,950 [0,940 ; 0,959]	0,950 [0,908 ; 0,962]
C-ELISA₂	Se	0,960 [0,896 ; 0,994]	0,963 [0,904 ; 0,994]	0,959 [0,898 ; 0,993]
	Sp	0,994 [0,977 ; 1,0]	0,996 [0,986 ; 1,0]	0,993 [0,949 ; 1,0]
Prévalence		0,118 [0,099 ; 0,132]	0,120 [0,107 ; 0,132]	0,117 [0,072 ; 0,132]
DIC		173	175	166

¹ Intervalle de crédibilité à 95% ; ² Se = Sensibilité ; ³ Sp = Spécificité

Annexe 14 : Estimation des sensibilités et de spécificités de cinq tests de dépistage de la brucellose porcine étudiés en Polynésie française après inclusion des résultats douteux en I-ELISA et/ou en FPA dans l'étude

(Analyses « Résultats douteux interprétés comme négatifs », « Résultats douteux interprétés comme positifs » et « Résultats douteux interprétés selon le contexte »)

Paramètre		Douteux interprétés comme négatifs [ICr 95%] ¹	Douteux interprétés comme positifs [ICr 95%] ¹	Douteux interprétés selon le contexte [ICr 95%] ¹
EAT	Se ²	0,723 [0,493 ; 0,920]	0,733 [0,503 ; 0,931]	0,769 [0,514 ; 0,975]
	Sp ³	0,863 [0,820 ; 0,906]	0,865 [0,821 ; 0,908]	0,834 [0,771 ; 0,872]
FPA	Se	0,754 [0,527 ; 0,942]	0,779 [0,577 ; 0,950]	0,773 [0,544 ; 0,970]
	Sp	0,834 [0,792 ; 0,875]	0,760 [0,721 ; 0,799]	0,854 [0,803 ; 0,900]
I-ELISA	Se	0,856 [0,691 ; 0,980]	0,874 [0,730 ; 0,982]	0,858 [0,647 ; 0,987]
	Sp	0,839 [0,800 ; 0,877]	0,832 [0,797 ; 0,867]	0,828 [0,774 ; 0,870]
C-ELISA₁	Se	0,709 [0,369 ; 0,982]	0,714 [0,397 ; 0,982]	0,647 [0,375 ; 0,991]
	Sp	0,874 [0,819 ; 0,928]	0,876 [0,824 ; 0,927]	0,867 [0,795 ; 0,933]
C-ELISA₂	Se	0,955 [0,890 ; 0,992]	0,954 [0,888 ; 0,992]	0,969 [0,915 ; 0,995]
	Sp	0,859 [0,829 ; 0,889]	0,861 [0,833 ; 0,890]	0,860 [0,811 ; 0,891]
Prévalence		0,210 [0,209 ; 0,294]	0,209 [0,137 ; 0,290]	0,210 [0,138 ; 0,293]
DIC		135	134	76

¹ Intervalle de crédibilité à 95% ; ² Se = Sensibilité ; ³ Sp = Spécificité

Annexe 15 : Code WinBUGS utilisé pour l'estimation des caractéristiques de deux tests dépendants dans une population

```

model
{
r[1:4] ~ dmulti(pr[1:4], n1)
pr[1] <- prev1*(se1*se2+covDp) + (1-prev1)*((1-sp1)*(1-sp2)+covDn)
pr[2] <- prev1*(se1*(1-se2)-covDp) + (1-prev1)*((1-sp1)*sp2-covDn)
pr[3] <- prev1*((1-se1)*se2-covDp) + (1-prev1)*(sp1*(1-sp2)-covDn)
pr[4] <- prev1*((1-se1)*(1-se2)+covDp) + (1-prev1)*(sp1*sp2+covDn)
ls <- (se1-1)*(1-se2)
us <- min(se1,se2) - se1*se2
lc <- (sp1-1)*(1-sp2)
uc <- min(sp1,sp2) - sp1*sp2
prev1~ dbeta(1,1)
se1 ~dbeta(31.5,3.5)
sp1 ~dbeta(7.07,0.372)
se2 ~dbeta(1,1)
sp2 ~dbeta(11.025,0.225)
covDn ~ dunif(lc, uc)
covDp ~ dunif(ls, us)
rhoDp <- covDp / sqrt(se1*(1-se1)*se2*(1-se2))
rhoDn <- covDn / sqrt(sp1*(1-sp1)*sp2*(1-sp2))
}

```

**Annexe 16 : Estimation des caractéristiques de deux tests de dépistage de l'épididymite contagieuse du bélier (FC et I-ELISA) en interprétant les résultats de L'I-ELISA selon les seuils recommandés par le fabricant
(Analyse « Résultats douteux exclus »)**

	Sensibilité	Spécificité
FC	0,852 [0,741 ; 0,962] _{ICr95%}	0,989 [0,940 ; 1,0] _{ICr95%}
I-ELISA	0,939 [0,839 ; 0,995] _{ICr95%}	0,952 [0,884 ; 1,0] _{ICr95%}
γ_{Se}^1	0,025 [-0,004 ; 0,102] _{ICr95%}	
γ_{Sp}^2		0,006 [-2,24.10 ⁻⁵ ; 0,046] _{ICr95%}

¹Covariance des sensibilités ; ²Covariance des spécificités

La prévalence estimée dans la population étudiée était de 26,6% [20,4% ; 31,3%]_{ICr95%}.

Le DIC était de 24.

Annexe 17 : Principe des tests allergiques de dépistage de la tuberculose bovine : Intradermotuberculation simple et intradermotuberculation comparative

On distingue deux types d'intradermotuberculation : l'intradermotuberculation simple (IDS) et l'intradermotuberculation comparative (IDC).

❖ L'intradermotuberculation simple (IDS)

Le principe de l'IDS est similaire à celui du test cutané à la tuberculine développé par Charles Mantoux en 1908 pour le diagnostic de la tuberculose chez l'Humain (Snider, 1982).

L'intradermotuberculation simple consiste en l'injection intradermique de 0,1 mL de tuberculine bovine dans l'encolure du bovin.

La réaction se traduit par une réaction inflammatoire qui peut être accompagnée d'une adénite des nœuds lymphatiques pré-scapulaires (l'observation de la réaction inflammatoire est dite lecture « subjective » ou « qualitative »).

La lecture « objective » ou « quantitative » doit être effectuée par mensuration du pli cutané avant injection et 72 heures après injection. Elle ne peut pas être avancée car la réaction débute tardivement (24 à 48 heures après injection). La réaction atteint son maximum 72 heures après injection et s'atténue progressivement pour disparaître au bout de quelques jours.

La lecture objective du résultat est réalisée comme indiqué dans le [tableau A](#) :

Tableau A : Modalités de lecture des résultats de l'IDS selon la réaction observée (lecture qualitative) et la mesure d'épaississement cutané Δx

Lecture qualitative	Lecture quantitative	Résultat
Réaction inflammatoire	$\Delta x \geq 4$ mm	Positif
Réaction faible ou absente	$\Delta x \leq 2$ mm	Négatif
Autres cas	$2 \text{ mm} < \Delta x < 4$ mm	Douteux

❖ L'intradermotuberculation comparative (IDC)

L'intradermotuberculation comparative (IDC) repose sur les mêmes principes que l'IDS mais permet de différencier les réactions d'HSR dues à l'infection par *M. bovis* (ou *M. tuberculosis*) de celles engendrées par des mycobactéries atypiques. L'objectif de ce test est de comparer l'intensité de la réaction d'un animal à la tuberculine bovine d'une part et à la tuberculine aviaire d'autre part. Les mycobactéries atypiques sont apparentées à *M. avium* : lors d'infection paraspécifique (par *M. kansasii* par exemple), l'intensité de la réaction à la tuberculine aviaire sera plus importante que l'intensité de la réaction à la tuberculine bovine (Pollock *et al.*, 2003). De plus, Les réactions spécifiques de *M. bovis* restent stables dans le temps, tandis que les réactions non spécifiques évoluent.

Après mensuration des plis de peau aux sites d'injection, on injecte, du même côté de l'encolure et en deux points distincts de 0,1 mL de tuberculine bovine et de 0,1 mL de tuberculine aviaire. Les mensurations cutanées avant injection sont notées A0 (au site d'injection de la tuberculine aviaire) et B0 (au site d'injection de la tuberculine bovine).

La lecture est réalisée 72 heures après injection, par mensuration des plis de peau aux deux sites (notés A3 site « tuberculine aviaire » et B3 site « tuberculine bovine »). On pose :

- $\Delta B = B3 - B0$ l'épaississement du pli cutané au site d'injection de la tuberculine bovine ;
- $\Delta A = A3 - A0$ l'épaississement du pli cutané au site d'injection de la tuberculine aviaire.

Les modalités de lecture objective des résultats de l'IDC sont indiquées dans le [tableau B](#) :

Tableau B : Modalités de lecture des résultats de l'IDC selon les mesures d'épaississement cutané aux points d'injection de la tuberculine bovine (ΔB) et de la tuberculine aviaire (ΔA)

Réaction à l'injection de tuberculine bovine	Différence d'épaississement cutané entre les points d'injection de tuberculine bovine et aviaire	Résultat
$\Delta B > 2 \text{ mm}$	$\Delta B - \Delta A > 4 \text{ mm}$	Positif
	$1 \text{ mm} \leq \Delta B - \Delta A \leq 4 \text{ mm}$	Douteux
	$\Delta B - \Delta A < 1 \text{ mm}$	Négatif
$\Delta B \leq 2 \text{ mm}$		Négatif

Dans certains départements (Côte d'Or par exemple), l'arbre décisionnel prévoit une distinction entre animaux « grands douteux » (*i.e.* animaux dont le résultat est douteux en IDC mais qui présentent une réaction positive à l'injection tuberculine bovine, $\Delta B \geq 4 \text{ mm}$) et animaux « petits douteux », qui présentent un résultat douteux en IDC et une réaction douteuse à l'injection de tuberculine bovine, $2 \text{ mm} < \Delta B < 4 \text{ mm}$).

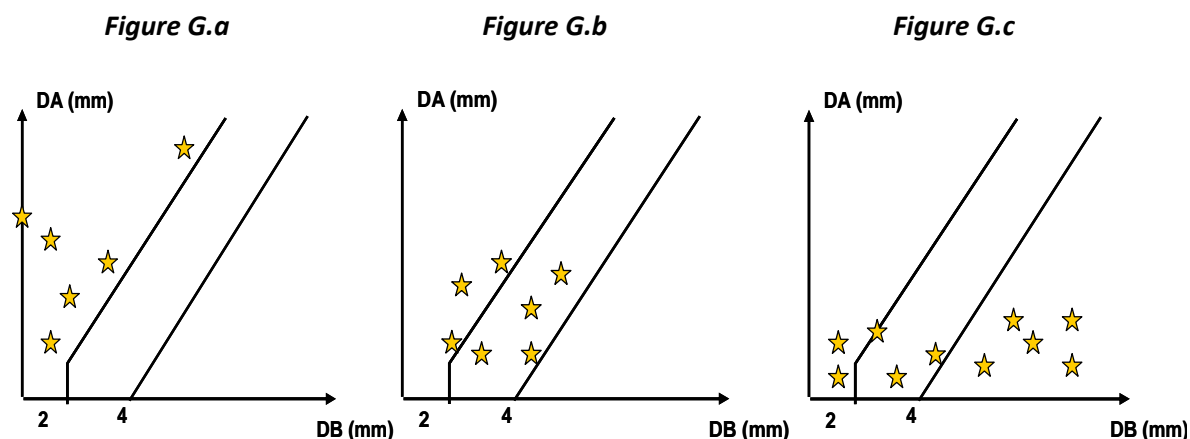
L'interprétation des résultats de l'IDC est réalisée à l'échelle du troupeau. Elle est effectuée à l'aide d'un graphique regroupant les résultats des animaux du cheptel sous forme d'un nuage de points. Chaque point, de coordonnées ΔB (en abscisses) et ΔA (en ordonnées), correspond au résultat d'un animal du troupeau. Deux droites d'équations $\Delta 1 : y = x - 1$ et $\Delta 2 : y = x - 4$ divisent le graphique en trois zones :

- les résultats situés au-dessus de $\Delta 1$ sont négatifs ;
- les résultats situés entre $\Delta 1$ et $\Delta 2$ sont douteux ;
- les résultats situés au-dessous de $\Delta 2$ sont positifs.

Le résultat global du troupeau prend en compte la position du nuage de points. Si plusieurs points sont dans la zone de positivité, le résultat global est positif. Si les points sont à cheval sur le secteur négatif et le secteur douteux, le résultat global est douteux. Si les points appartiennent tous à la zone de négativité, le résultat global est négatif.

Figure G: Représentation graphique des résultats d'IDC de trois cheptels :

- un cheptel indemne de tuberculose dans lequel aucune réaction non spécifique n'est observée (Figure G.a) ;
- un cheptel atteint de paratuberculose (*M. paratuberculosis*) (Figure G.b) ;
- un cheptel atteint de tuberculose bovine (Figure G.c).



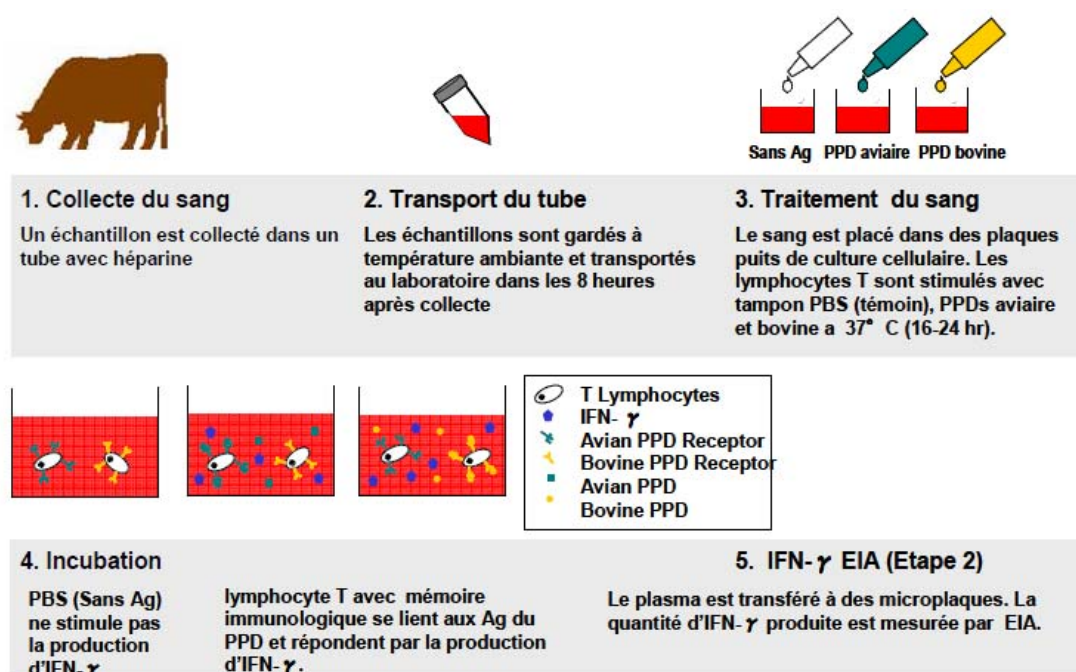
Annexe 18 : Principe du test de dosage de l'interféron gamma pour le dépistage de la tuberculose bovine

Le dosage de l'interféron gamma (IFN) est réalisé sur prélèvement sanguin (sang total sur tube hépariné). Des aliquotes de sang sont mis en présence de différents antigènes : dérivés protéiques purifiés bovin et aviaire (« Purified Derivative Protein », PPD) et antigène témoin négatif (PBS) puis mis en incubation. La mise en présence des antigènes doit être effectuée au plus tard 8 heures après le prélèvement.

L'IFN présent dans le surnageant est dosé par ELISA sandwich (kit commercial Bovigam®), pour chacun des types d'antigènes utilisés, avec quantification par mesure de la densité optique (DO). Si l'animal a déjà été en contact avec un des antigènes utilisés, le contact *in vitro* sang/antigène provoque la production de cytokines (dont l'IFN) par les lymphocytes T (Pollock *et al.*, 2003).

Le principe du dosage de l'IFN est représenté dans la [figure H](#) :

Figure H : Principe de l'IFN par la méthode ELISA (Bovigam®) (d'après M.L. Boschioli, LNR Tuberculose)



Certains procédés permettent d'améliorer les capacités du dosage de l'IFN :

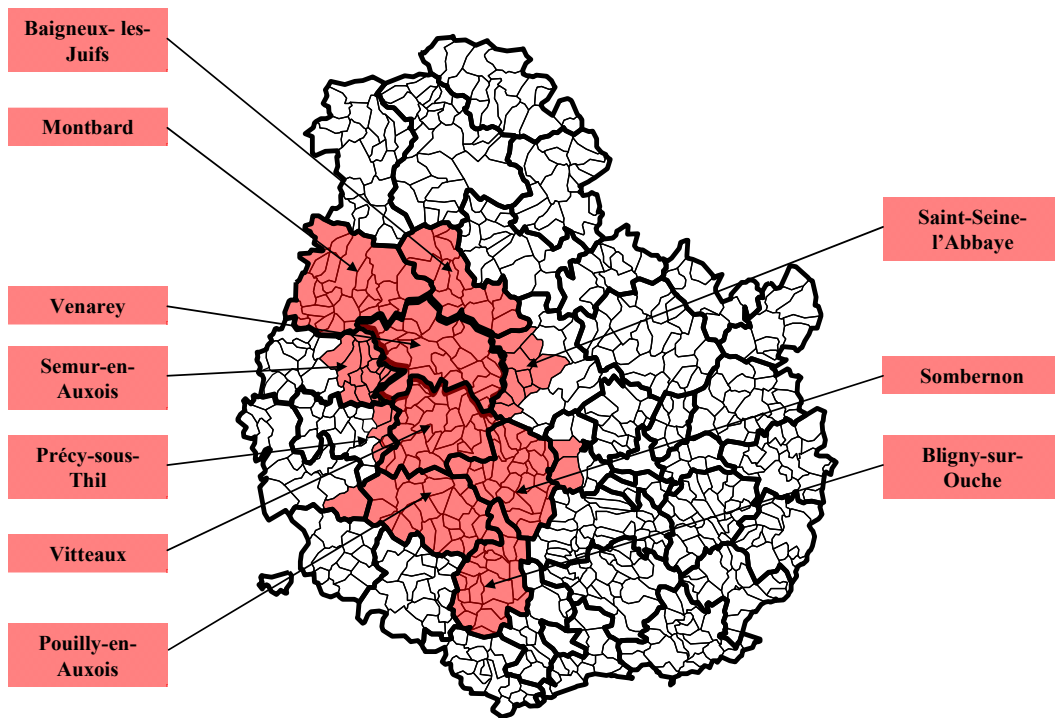
- l'ajout d'un témoin mitogène est un révélateur de l'état des lymphocytes et de leur capacité à produire de l'interféron ;
- l'ajout de peptides recombinants (ESAT-6 et CFP-10) améliore la spécificité du test sans trop en détériorer la sensibilité (Buddle *et al.*, 2000) : l'ESAT-6 est un antigène présent chez *M. bovis* mais absent chez la plupart des mycobactéries environnementales, à l'exception de *M. kansasii*, *M. szulgai* et *M. marinum* (Gormley *et al.*, 2006).

Les résultats chiffrés peuvent être exprimés sous forme d'une densité optique brute ou sous une forme dite « normalisée ». Cette dernière modalité est utilisée depuis quelques années par les laboratoires vétérinaires des départements français utilisant l'IFN afin de limiter les variations de résultats liées aux différents lots d'antigènes utilisés (Faye *et al.*, 2008). Les formules « normalisées » pour le kit Bovigam® et pour les antigènes recombinants (ESAT-6 et CFP-10) sont les suivantes :

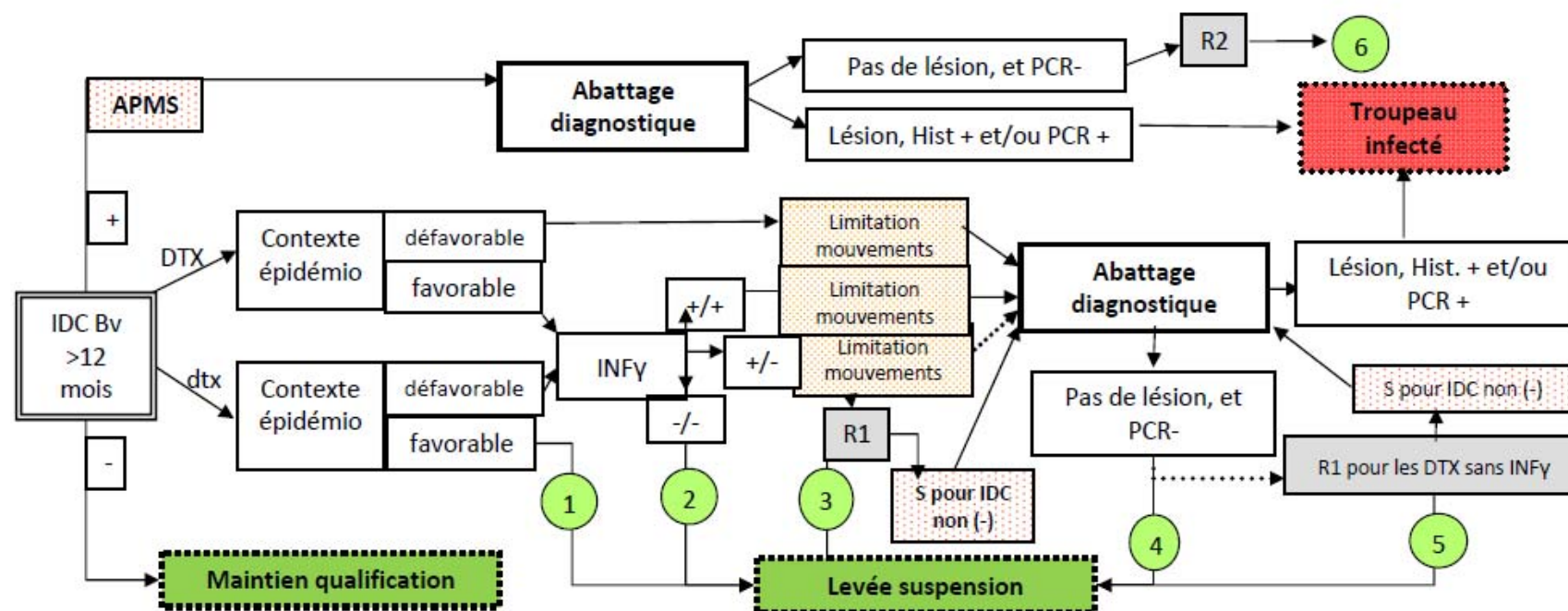
Résultat Bovigam® = (PPD Bovine – PPD Aviaire) / (Témoin positif – Témoin négatif)

Résultat Recombinant = (Recombinant – PBS) / (Témoin positif – Témoin négatif)

Annexe 19 : Localisation des cantons appartenant à la « zone rouge » en Côte d'Or



Annexe 20 : Arbre décisionnel utilisé pour la prise de décisions sanitaires en matière de tuberculose bovine dans le département de Côte d'Or



IDC pos si $(B3-B0)-(A3-A0) > 4\text{mm}$.
 IDC nég si $(B3-B0)-(A3-A0) < 1\text{mm}$.
 IDC dtx si $1\text{mm} < (B3-B0)-(A3-A0) < 4\text{mm}$ et $2 > DB < 4\text{mm}$
 IDC DTX si $1\text{mm} \leq (B3-B0)-(A3-A0) \leq 4\text{mm}$ et $DB > 4\text{mm}$.

S = Suspension qualification, APMS et SIGAL

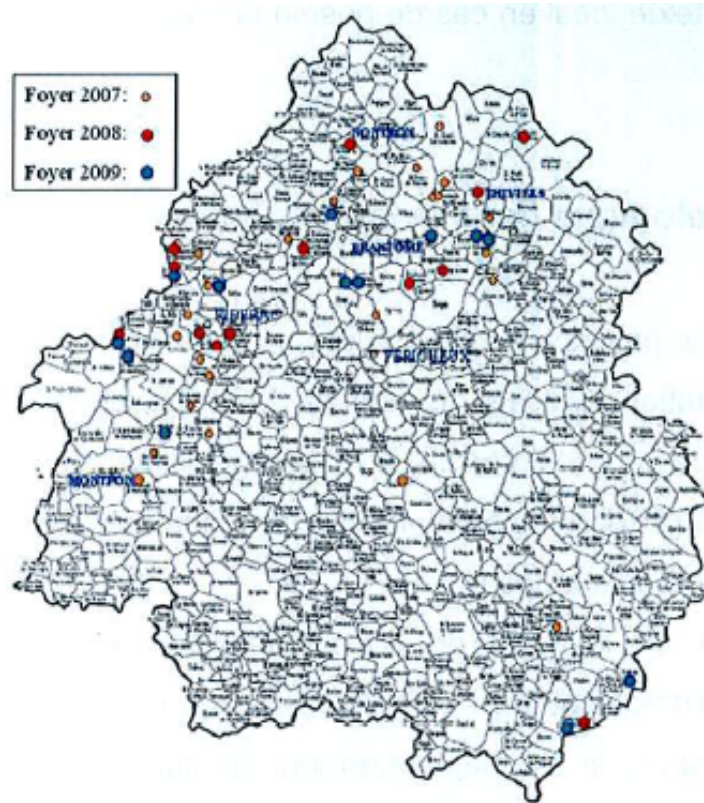
N° Sortie de requalification

R1 = Recontrôle à 2 mois de 10% des bovins > 12 mois (contacts) 15 bovins au minimum.

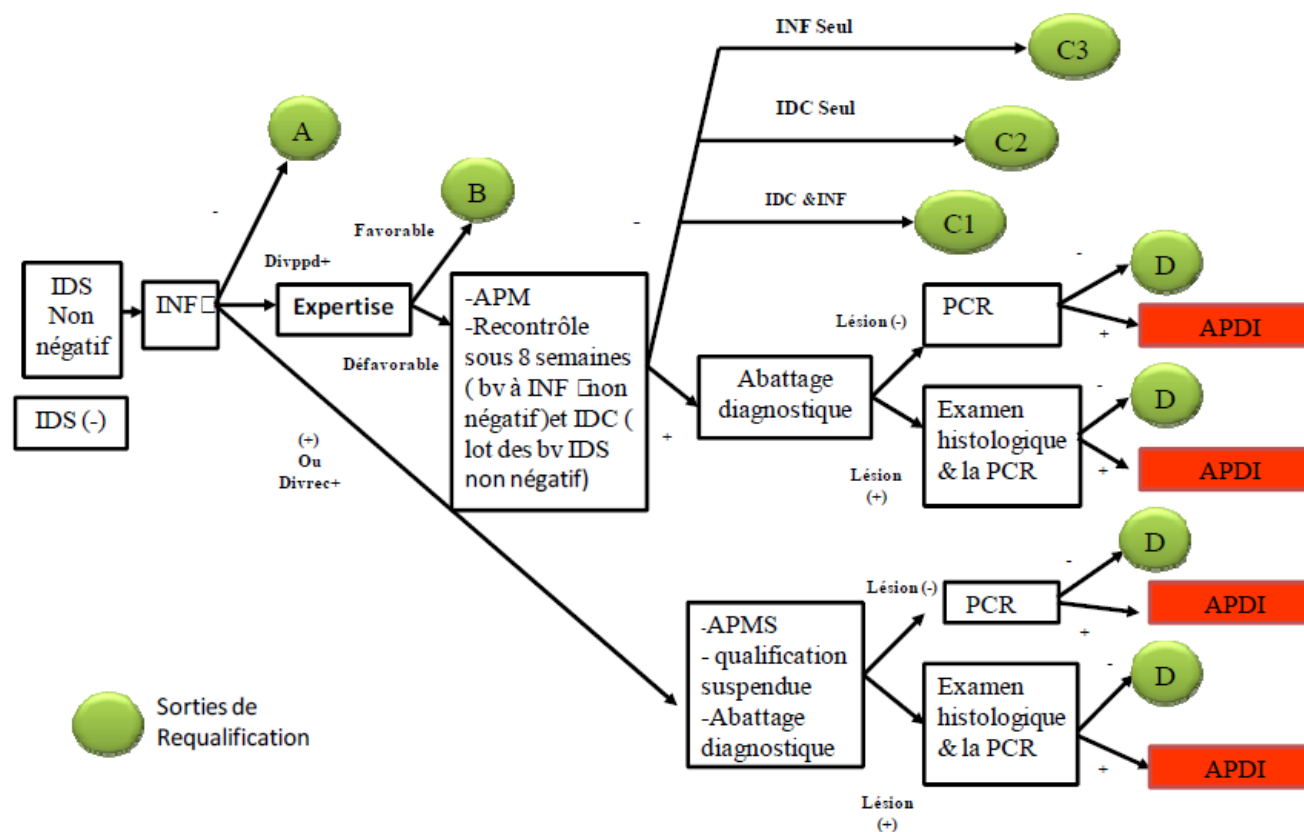
R2 = Recontrôle à 2 mois de tous les bovins > 6 semaines non testés et 10% des bovins > 12 mois (divergents, contacts) 15 bovins au minimum

Contexte épidémiologique favorable = nouvelle zone
Contexte épidémiologique défavorable = zone à risque (résidents et pâturants) + liens épidémiologiques + anomalies récurrentes et cheptels à problème

Annexe 21 : Localisation des foyers de tuberculose bovine en Dordogne entre 2007 et 2009



Annexe 22 : Arbre décisionnel utilisé pour la prise de décisions sanitaires en matière de tuberculose bovine dans le département de la Dordogne au cours des campagnes 2009-2010 et 2010-2011



Sortie A : INF (-)

Sortie B : INF (divppd+) suivi d'une expertise (DDCSPP 24)¹ favorable

Sortie C1 : INF (divppd+) suivi d'une expertise défavorable et d'un reconrôle INF & IDC favorable

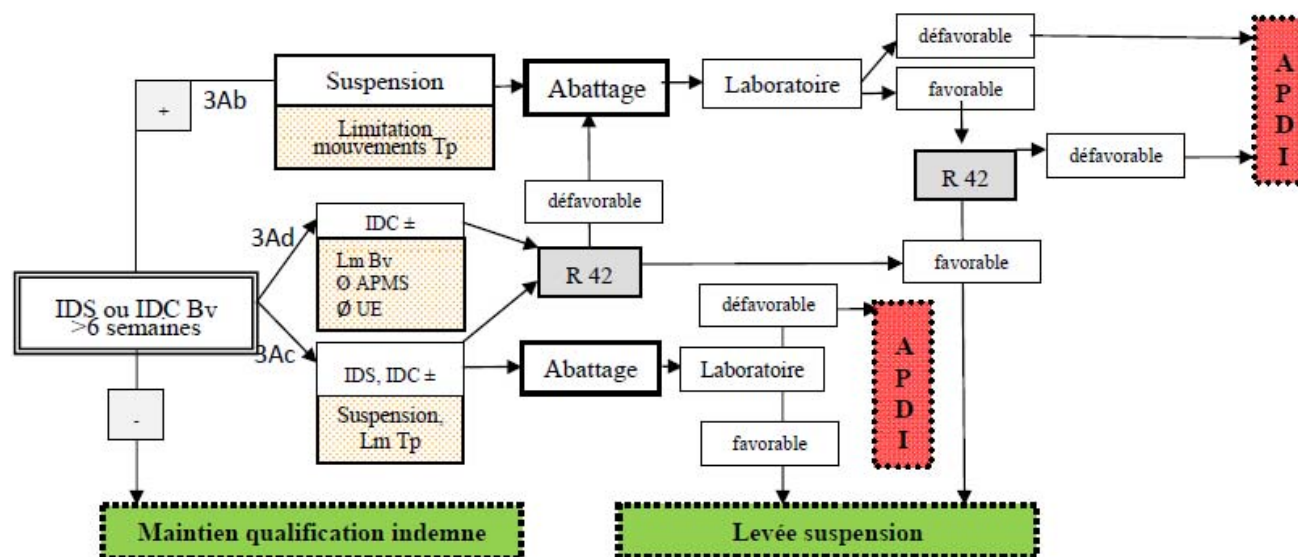
Sortie C2 : INF (divppd+) suivi d'une expertise défavorable et d'un reconrôle IDC seul favorable

Sortie C3 : INF (divppd+) suivi d'une expertise défavorable et d'un reconrôle INF seul favorable

Sortie D : INF(+) ou IDC(+)

1 : Direction Départementale de la Cohésion Sociale et de la Protection des Populations de la Dordogne

Annexe 23 : Protocole décisionnel prévu par la réglementation européenne (Directive CE/64/432)



IDC positive si $(B3-B0)-(A3-A0) > 4\text{mm}$, $DB \geq 2\text{ mm}$.
 IDC négative si $(B3-B0)-(A3-A0) < 1\text{mm}$.
 IDC Dtx si $1\text{mm} < (B3-B0)-(A3-A0) < 4\text{mm}$.
 IDS Dtx si pli peau entre 2 et 4mm.
 IDS positive $> 4\text{ mm}$.
 IDS négative $< 2\text{ mm}$.

3Ab = Chemin selon le paragraphe 3Ab de la directive UE/64/432, annexe A


IDT = Intradermotuberculination
 IDS = Intradermotuberculination simple
 IDC = Intradermotuberculination comparative
 ± = résultat douteux à l'IDT
 Bv = bovins ; Tp = troupeau.
 APDI : Arrêté préfectoral de mise sous surveillance (Troupeau infecté)
 Ø APMS = Pas d'arrêté préfectoral de mise sous surveillance
 Lm = Limitation de mouvements
 Ø UE = pas de commerce pour UE

R 42 = Recontrôle au 42 jours au minimum de tous les bovins > 6 semaines douteux. Les bovins IDS sont recontrôlés avec un IDC où, pour obtenir la levée de la suspension, les résultats doivent être négatives après 42 jours après l'élimination du dernier animal ayant présenté un IDT(+).

Annexe 24 : Détail des résultats de l'estimation des caractéristiques des tests de dépistage de la tuberculose bovine par une approche bayésienne en Côte d'Or

Test	Paramètre	Moyenne	Bornes de l'intervalle de crédibilité à 95%	
IDC	Se ¹	0,803	0,616	0,980
	Sp ²	0,083	0,070	0,095
IDS	Se	0,842	0,590	0,982
	Sp	0,104	0,089	0,119
IFN	Se	0,881	0,728	0,975
	Sp	0,623	0,602	0,645
IDC et IDS	γ Se ³	0,025	-0,048	0,122
	γ Sp ⁴	0,037	0,030	0,046
IDC et IFN	γ Se	0,023	-0,038	0,105
	γ Sp	-0,001	-0,008	0,005
IDS et IFN	γ Se	0,026	-0,025	0,105
	γ Sp	0,006	0,0003	0,012


¹Se : Sensibilité ; ²Sp : Spécificité ; ³ γ Se : Covariance des sensibilités ; ⁴ γ Sp : Covariance des spécificités

 **Remarque :** La majorité des animaux de la population étudiée, pour lesquels des résultats individuels étaient disponibles, avaient été soumis à un test IFN suite à une intradermotuberculation non négative (à l'exception des animaux provenant de troupeaux suivant un protocole d'abattage partiel). Les spécificités estimées de l'IDS et de l'IDC sont donc extrêmement et anormalement faibles, en raison de ce biais de sélection. Elles n'ont pas de signification épidémiologique.

Annexe 25 : Détail des résultats de l'estimation des caractéristiques des tests de dépistage de la tuberculose bovine par une approche bayésienne en Dordogne

Test	Paramètre	Moyenne	Bornes de l'intervalle de crédibilité à 95%	
IDS	Se ¹	0,882	0,758	0,975
	Sp ²	0,272	0,249	0,295
IFN	Se	0,842	0,589	0,981
	Sp	0,608	0,582	0,633
IDS et IFN	γ Se ³	0,026	-0,026	0,104
	γ Sp ⁴	-0,068	-0,080	-0,057

¹Se : Sensibilité ; ²Sp : Spécificité ; ³ γ Se : Covariance des sensibilités ; ⁴ γ Sp : Covariance des spécificités

 **Remarque :** La majorité des animaux de la population étudiée, pour lesquels des résultats individuels étaient disponibles, avaient été soumis à un test IFN suite à une intradermotuberculination non négative (à l'exception des animaux appartenant à des troupeaux sous suivi renforcé). La spécificité estimée de l'IDS est donc extrêmement et anormalement faible, en raison de ce biais de sélection. Elle n'a pas de signification épidémiologique.

RESUME

L'étude et le choix des stratégies décisionnelles en santé animale nécessite de disposer d'informations sur l'efficacité des outils disponibles, qu'il s'agisse d'un test unique, d'une association de plusieurs tests ou d'un ensemble de critères cliniques et épidémiologiques. La validation des tests de dépistage ou de diagnostic constitue donc un prérequis à la conception de protocoles d'aide à la prise de décisions sanitaires. Lorsqu'il existe une référence fournissant une information sur le statut infectieux des individus étudiés, l'estimation des caractéristiques des tests peut être effectuée de manière directe. En santé animale, il est toutefois fréquent de ne pas disposer de cette information, lorsqu'aucun test ne référence n'est disponible ou lorsqu'il n'a pas pu être mis en œuvre, pour des raisons pratiques, économiques ou éthiques. Dans ce cas, l'étude des tests requiert l'utilisation de méthodes statistiques adaptées, telles l'utilisation de modèles à classe latente implémentés par une approche bayésienne.

Nous avons choisi, au cours de nos travaux, de nous intéresser à l'estimation de la part d'incertitude liée à l'utilisation de tests en tant qu'outils d'aide à la prise de décision. Nous exposons dans un premier chapitre les enjeux et les modalités de la lutte contre les maladies animales, les outils épidémiologiques disponibles pour l'élaboration de stratégies décisionnelles et les méthodes permettant l'évaluation de ces outils et leur comparaison. Les trois chapitres suivants constituent une application de ces méthodes, dans des contextes différents correspondant à trois types de situations dans lesquelles il existe un besoin d'aide à la décision sanitaire en santé animale : le dépistage de la brucellose porcine chez les porcs reproducteurs, le dépistage de l'épididymite contagieuse du bélier chez les béliers destinés à l'export et le dépistage de la tuberculose bovine dans les départements de Côte d'Or et de Dordogne et dans la région camarguaise. Le dernier chapitre de ce manuscrit consiste en une discussion générale sur les modalités de choix d'un outil d'aide à la décision sanitaire.

Mots-clefs : Approche bayésienne, brucellose, décision sanitaire, dépistage, santé animale, test, tuberculose

ABSTRACT

Knowing the efficacy of a diagnostic tool, whether it is a test used alone, a sequence of several tests or a group of clinical criteria, is essential to study and choose decision strategies. The validation of diagnostic and screening tests is thus necessary to conceive decision schemes. When a gold standard is available, the characteristics of a test can be estimated directly. However, the true individual disease status of the animals is often unknown, particularly in absence of a gold standard or when the gold standard cannot be used because of economical, practical or ethical constraints. In these cases, specific statistical methods like latent class models implemented through a Bayesian approach must be used.

Our work aimed at estimating the uncertainty due to the use of diagnostic tests as decision tools. The first chapter presents the issues and practical details of the struggle against animal disease and the epidemiological tools available to estimate the characteristics of the tests and to compare them. In the three following chapters, these methods are applied to three different contexts in which the conception and the evaluation of decision tools are needed: the screening of porcine brucellosis in breeding hogs, the screening of *Brucella ovis* infection in exported rams and the screening of bovine tuberculosis in Côte d'Or, Dordogne and Camargue (France). The last chapter consists in a global discussion about how to choose a decision tool.

Key-words: Animal health, Bayesian approach, brucellosis, decision tool, screening, test, tuberculosis