

Double BA - TH 321
AG 179458

UNIVERSITE VICTOR SEGALEN – BORDEAUX 2
Institut de Santé Publique, d'Epidémiologie et de Développement

DOUBLE

MEMOIRE

14 OCT. 1999

pour le

Diplôme d'Etudes Approfondies

« Epidémiologie et Intervention en Santé Publique »

Option : Epidémiologie d'Intervention

**Détermination de la validité interne du test de tuberculination
utilisé pour le dépistage de la tuberculose bovine à Madagascar**

par

CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet

René Quirin

Année Universitaire 1998-1999

Laboratoire d'accueil : **Unité Tuberculose – Peste ;**

Institut Pasteur de Madagascar – Antananarivo

Chef d'unité : Dr. Suzanne Chanteau

Maître de stage : Dr. Pascal Boisier



* TH03055 *

UNIVERSITE VICTOR SEGALEN – BORDEAUX 2
Institut de Santé Publique, d'Epidémiologie et de Développement

MEMOIRE

pour le

Diplôme d'Etudes Approfondies

« Epidémiologie et Intervention en Santé Publique »

Option : Epidémiologie d'Intervention

**Détermination de la validité interne du test de tuberculination
utilisé pour le dépistage de la tuberculose bovine à Madagascar**

par

René Quirin

CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet

Année Universitaire 1998-1999

Laboratoire d'accueil : Unité Tuberculose – Peste ;

Institut Pasteur de Madagascar – Antananarivo

Chef d'unité : Dr. Suzanne Chanteau

Maître de stage : Dr. Pascal Boisier

Remerciements

Mes remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail. Son objectif s'inscrit dans le cadre du programme de lutte contre la maladie qui touche le plus gravement l'élevage bovin et qui par ailleurs affecte aussi l'homme : la tuberculose bovine.

Ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans un soutien institutionnel et un important appui technique de laboratoire. Il a nécessité également un travail de terrain soigneux dans des conditions souvent difficiles. Il est par conséquent le fruit d'un effort et d'une volonté communs et j'espère que le résultat apportera à tous la satisfaction d'y avoir contribué.

Je remercie tout particulièrement :

Dr. Ratovo Andriambololona, Directeur des Services Vétérinaires de Madagascar, pour ton appui inconditionnel et ta confiance

Dr. Hugues Rakotoaritahina et **Dr. Anicet Ramboasolo**, (DSV) pour votre aide dans l'exécution des tests de tuberculination et la collecte des prélèvements

Pr. Jean Roux, Directeur de l'Institut Pasteur de Madagascar, pour m'avoir accueilli dans votre Institut qui a été le garant de la qualité des résultats de laboratoire

Dr. Voahangy Rasolofo, **Dr. Clairette Raharisolo** et **Tiana Rasolonaivalona**, (IPM), pour avoir réalisé l'ensemble des analyses de laboratoire

Dr. Florette Andriamiarisatrana pour la mise à disposition de l'abattoir d'Antananarivo

Dr. Arsène Ralambofiringa, Coordonnateur National du Programme Sectoriel Elevage, pour le soutien administratif indispensable dans la réalisation de l'étude

Dr. Jean Blancou, Directeur de l'OIE, et précurseur de la lutte contre la tuberculose bovine à Madagascar, pour votre soutien

Résumé

La tuberculose est la principale maladie bovine à Madagascar, elle touche environ 16% des animaux. Son importance est surtout économique mais également sanitaire car c'est une zoonose ; cependant, sa répartition et sa prévalence n'étaient connues que par des données anciennes non actualisées. L'Etat malgache entreprend un programme national de lutte contre la tuberculose qui repose sur une enquête de prévalence récente réalisée au moyen du test classique de dépistage : l'intradermotuberculation (ID). Ce test produit des valeurs de prévalences apparentes qui nécessitent une correction en fonction des paramètres de validité interne du test.

L'objectif de l'étude est de déterminer ces paramètres qui ne sont pas connus dans les conditions malgaches, afin de redresser les valeurs de prévalences observées. Comme aucune prophylaxie n'est réalisée depuis longtemps, il existe un nombre important d'animaux portant des infections anciennes. Ces animaux ne réagissent pas aussi bien à l'ID ce qui entraîne une chute de sensibilité.

Les paramètres de validité interne ont été mesurés sur trois échantillons différents à l'aide de deux techniques de lecture (objective et subjective) et en utilisant deux tuberculines bovines (normales) différentes. L'étude a consisté à tuberculer des animaux destinés à l'abattoir et à réaliser des prélèvements sur les carcasses en post mortem pour détecter l'infection par *Mycobacterium bovis*.

La lecture subjective semble donner de meilleurs résultats que la lecture objective en raison de l'importance des signes cliniques associés à l'injection de tuberculine et appréciés par l'opérateur sans mesure. Dans les conditions de terrain et en utilisant la lecture subjective, la sensibilité du test est estimée à 0,524 (n=21) et la spécificité est estimée à 0,987 (n=79), quelle que soit la tuberculine utilisée. La sensibilité mesurée sur un échantillon sélectionné dans une zone de prévalence élevée est de 0,8 (n=10) sans que cette différence soit significative en raison du manque de puissance dû à la faiblesse de l'effectif.

Pour des raisons pratiques, l'étude a été réalisée sur des animaux destinés à l'abattoir mais la nature de ces échantillons les distingue du cheptel courant. La sensibilité du test mesurée sur un échantillon représentatif du cheptel devrait se situer entre ces deux valeurs. Il semble en effet que les paramètres de validité interne du test varient en fonction de critères physiopathologiques liés au développement de l'hypersensibilité retardée. Ce phénomène a une influence sur la sensibilité du test. Celle-ci devrait s'améliorer au fur et à mesure de la mise en route de la prophylaxie et de l'élimination des infectés anciens par mort ou abattage.

L'étude montre que l'ID est à retenir en utilisant la lecture subjective mais que la tuberculine utilisée donne une sensibilité faible. Elle a permis de montrer aussi qu'une cartographie de l'infection pouvait être établie par correction des valeurs de prévalence d'une étude transversale et par surveillance des abattages et notification des lésions tuberculeuses. La sensibilité du diagnostic de tuberculose sur observation de lésion est estimé à 0,937 (n=143) et la spécificité est estimée à 0,966 (n=320).

Mots clé : tuberculose – *Mycobacterium bovis* – diagnostic – épidémiologie – bovin – zoonose

Sommaire

| | |
|--|----|
| 1. Introduction | 5 |
| 2. Matériel et Méthodes | 7 |
| 2.1. Principe général de l'étude..... | 7 |
| 2.1.1. Type d'étude..... | 7 |
| 2.1.2. Définition biologique du résultat du test..... | 9 |
| 2.1.3. Variabilité dans l'installation de l'état d'HSR..... | 9 |
| 2.2. Exécution du test ID de terrain..... | 12 |
| 2.2.1. Recrutement des animaux de l'expérience et manipulations..... | 12 |
| 2.2.1.1. Recrutement auprès des opérateurs d'abattoirs d'exportation..... | 12 |
| 2.2.1.2. Recrutement en zone de forte enzootie..... | 13 |
| 2.2.2. Tuberculine, matériel de tuberculation..... | 14 |
| 2.2.3. Identification et tuberculation des animaux..... | 15 |
| 2.2.3.1. Pratique de l'injection de tuberculine et de l'identification ante et post mortem des animaux | 15 |
| 2.2.3.2. Protocoles de la tuberculation et de sa lecture..... | 16 |
| 2.3. Collecte de prélèvements..... | 19 |
| 2.4. Diagnostic de laboratoire..... | 21 |
| 2.5. Schéma de l'étude..... | 22 |
| 3. Résultats | 25 |
| 3.1. Paramètres de validité interne..... | 25 |
| 3.1.1. Etude préliminaire..... | 25 |
| 3.1.2. Etude de référence..... | 26 |
| 3.1.2.1. Tuberculine Imvavet..... | 26 |
| 3.1.2.1.1. Résultats de l'ID, des cultures et de l'histopathologie..... | 26 |
| 3.1.2.1.2. Calcul des valeurs de sensibilité et spécificité, IC et courbe ROC..... | 27 |
| 3.1.2.2. Tuberculine Solvay..... | 28 |
| 3.1.3. Etude en zone de prévalence élevée..... | 30 |
| 3.2. Paramètres de validité de qualification des cheptels à partir de l'anatomopathologie..... | 32 |
| 3.3. Etude descriptive des localisations anatomiques des lésions..... | 33 |
| 3.4. Redressement des valeurs de prévalence nationale..... | 34 |
| 4. Discussion | 37 |
| 5. Références | 44 |

1. Introduction

La Direction des Services Vétérinaires de Madagascar met en place un programme national de prophylaxie de la tuberculose bovine. Cette option sanitaire est recommandée par l'Office International des Epizooties (OIE) et encouragée par les bailleurs de fonds. Madagascar dispose en effet, dans le cadre des accords de Lomé, d'un quota d'exportation de viande bovine d'environ 7500 tonnes par an sur l'Union Européenne (UE). Outre cet argument économique d'exportation, la maladie entraîne une diminution des performances zootechniques du cheptel bovin et donc une production interne de viande réduite qui ne satisfait pas aux besoins d'une population en croissance constante.

Afin de promouvoir un développement de la production interne de viande et répondre aux exigences sanitaires de l'Organisation Mondiale du Commerce (accords SPS), les deux principaux bailleurs des projets de développement agricole (UE et Banque Mondiale) souhaitent que soient prises des mesures actives de lutte contre la tuberculose qui est le principal facteur limitant sanitaire de l'élevage bovin.

La maladie constitue par ailleurs un risque zoonotique ; l'incidence de la tuberculose pulmonaire humaine est estimée à 15000 nouveaux cas par an à Madagascar. La proportion de cas humains dus au bacille bovin *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) ou au bacille aviaire *Mycobacterium avium* (*M. avium*) est inconnue car d'une part, ils sont indifférentiables cliniquement et radiologiquement des cas dus au bacille humain *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) et d'autre part, le diagnostic de laboratoire repose la plupart du temps sur une lecture de lame par la méthode de Ziehl Nielsén, non accompagnée de bactériologie et d'identification de l'espèce. Le diagnostic d'espèce, défini par défaut, est alors *M. tuberculosis*. Des études anciennes ont démontré l'existence de cas de tuberculose pulmonaire à *M. bovis* [1] ; d'autres cas ont été mis en évidence récemment dans une étude centrée sur un recrutement hospitalier et carcéral citadin [2]. Le nombre de cas de tuberculose extrapulmonaire à *M. bovis*, est totalement inconnu en raison de la difficulté de diagnostiquer cliniquement la maladie sauf quand elle est localisée dans des ganglions peu profonds (adénite cervicale). Ces cas sont probablement importants dans les régions où la prévalence de tuberculose bovine est élevée, qui correspondent souvent à celles où le lait est traditionnellement consommé cru en nature, sous forme de yaourts ou de lait caillé.

Les objectifs primaires du programme national de prophylaxie de la tuberculose bovine à Madagascar sont de :

- définir l'importance de la tuberculose bovine dans le cheptel national par l'étude de la prévalence
- évaluer les pertes économiques dues à la maladie
- définir des méthodes de prophylaxie adaptées en fonction des conditions socio-économiques et écologiques de chaque région de prévalence homogène
- prévenir la contamination humaine par les animaux et les produits alimentaires d'origine animale.

La détermination de la prévalence de l'infection tuberculeuse se fait par sondage au moyen d'un test de diagnostic de terrain : l'intradermotuberculation (ID). L'évaluation des pertes économiques dues à la maladie nécessite une bonne connaissance de la prévalence réelle de l'infection tuberculeuse calculée d'après la prévalence apparente mesurée par ID. La prophylaxie de la tuberculose bovine emploie classiquement la technique de dépistage et d'abattage des animaux réagissants au test ID. L'élimination d'animaux réagissants ne peut se faire dans la pratique qu'au moyen d'une stimulation financière faisant recours à un fonds d'indemnisation. En l'absence de ce fonds, la prophylaxie passe généralement dans un premier temps par la détermination des troupeaux infectés et l'application de mesures de police sanitaire restreignant les déplacements et la commercialisation des animaux vivants et des produits d'origine animale (lait, viande et leurs dérivés) provenant de troupeaux non déclarés indemnes. La qualification des troupeaux selon l'infection se fait par dépistage à l'aide du test ID, lorsque celui-ci est réalisé, et/ou par découverte de lésions de type tuberculeuses sur les carcasses à l'abattoir. Enfin, la prévention de la contamination humaine nécessite à la fois une bonne connaissance des élevages et des animaux infectés et un contrôle hygiénique des denrées d'origine animales performant. Le premier point dépend une fois de plus de l'ID, seul test de diagnostic de terrain disponible dans la pratique.

Chacun des quatre objectifs généraux du programme repose donc totalement ou en partie sur le test de diagnostic dont la sensibilité et la spécificité sont inconnues.

L'objectif de cette étude est de déterminer les paramètres de validité interne du test de terrain ID dans le contexte malgache. Les données de l'étude permettent par ailleurs de déterminer la sensibilité et la spécificité de la classification des carcasses sur leur statut relatif à la tuberculose, en fonction de l'observation des lésions qui y sont rencontrées. Cet élément supplémentaire intervient, tout comme le test ID, dans les outils disponibles pour le diagnostic de terrain de la tuberculose.

Les paramètres de validité interne du test ID seront utilisés pour redresser les valeurs de prévalence apparente obtenues par l'enquête réalisée en 1997 par sondage sur l'ensemble du territoire. Les données produites constituent actuellement la nouvelle base de calcul pour l'ensemble des projets de lutte contre la maladie. Depuis l'étude de Blancou *et al* en 1971 [3], aucune étude n'avait été menée pour évaluer la prévalence de la tuberculose bovine à l'échelle nationale. Les corrections des valeurs de prévalence observées sont nécessaires pour les étapes ultérieures de calculs économiques, de qualification de cheptels ou de détermination de stratégies de prophylaxie.

L'étude doit fournir aux Services Vétérinaires, au delà d'un simple résultat d'évaluation d'une technique de diagnostic, une solution pratique dans la mise en œuvre d'une stratégie de prophylaxie tenant compte des différents outils disponibles et du fonctionnement global des services sanitaires.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Principe général de l'étude

2.1.1 Type d'étude

L'étude consiste à déterminer la validité intrinsèque d'un test de diagnostic de terrain, la tuberculination intradermique ou intradermotuberculination (ID), en comparant les résultats obtenus sur le terrain à ceux d'un diagnostic de référence pratiqué au laboratoire. Le principe du test ID repose sur le pouvoir allergène des mycobactéries. Il a pour particularité de révéler une hypersensibilité retardée (HSR) qui se développe lorsque l'organisme de l'animal est infecté par *M. bovis* ou exceptionnellement par *M. tuberculosis*. Parfois cependant, cette HSR se développe aussi, mais de manière moins prononcée, lorsque l'animal est infecté par d'autres bacilles du groupe des mycobactéries pathogènes, par des mycobactéries opportunistes (*M. atypiques*), pathogènes facultatifs, ou encore par des mycobactéries saprophytes apathogènes (*M. environnementales*) (Tableau 1).

Les paramètres de validité interne du test déterminés dans d'autres pays ne peuvent pas être utilisés à Madagascar. Ils présentent une variabilité très importante selon les études (sensibilité : 0,5 à 0,96 ; spécificité : 0,74 à 0,99) [4-6] ce qui rend impossible l'utilisation d'une valeur moyenne comme approximation.

La fiabilité du test ID dépend de quatre facteurs principaux : l'opérateur, la tuberculine, les instruments et la technique utilisée et enfin, l'animal. Seuls les facteurs tuberculine, instruments et méthode opératoire peuvent être standardisés. La variabilité liée à l'opérateur peut être réduite par une formation adéquate à la réalisation du test mais le facteur animal reste inconnu. Aucun programme de lutte contre la tuberculose bovine n'a été mené à Madagascar depuis environ 30 ans. L'infection présente donc des caractéristiques très différentes de celles rencontrées dans les pays où une lutte active contre la maladie, par dépistage suivi d'élimination de tous les réagissants, est en cours depuis de longues années. Il faut s'attendre à Madagascar à rencontrer des bovins malades depuis plusieurs années. Ce type d'animaux ne manifeste plus une hypersensibilité aussi marquée, vis à vis de la tuberculine, que des animaux infectés récemment. Ils peuvent parfois rester totalement anergiques [7], la sensibilité du test est dans ce cas diminuée. Par ailleurs, la pression des mycobactéries atypiques et environnementales est inconnue à Madagascar. Il est admis qu'elles exercent généralement une pression plus forte en zone intertropicale et peuvent moduler la réaction d'hypersensibilité [8]. Il est par conséquent important de mesurer leur part relative dans les mycobactéries infectant les bovins afin d'en tenir compte dans l'interprétation des tests de terrain.

Tableau 1 : Principaux bacilles du genre *Mycobacterium* actuellement reconnus en diagnostic vétérinaire (d'après [9])

| Groupe de classement | Espèce | Signification pathologique |
|---|---------------------------------------|--|
| M. pathogènes | <i>M. tuberculosis</i> | ++++ tuberculose humaine |
| | <i>M. bovis</i> | ++++ tuberculose bovine |
| | <i>M. africanum</i> | ++++ tuberculose bovine |
| | <i>M. avium</i> | ++++ tuberculose aviaire |
| | | + moins pathogène chez mammifères |
| | <i>M. microti</i> | ++ tuberculose du campagnol |
| | <i>M. paratuberculosis</i> | ++++ paratuberculose |
| | <i>M. leprae</i> | ++++ lèpre humaine |
| | <i>M. lepraemurium</i> | ++ lèpre murine |
| | <i>M. farcinogenes</i> | ++ farcin du bœuf |
| M. opportunistes ou atypiques | <i>M. chelonae</i> | +/- |
| | <i>M. fortuitum</i> | + formes cutanées, mammites, adénites |
| | <i>M. gordonae</i> (ou <i>aquae</i>) | +/- thélite nodulaire de la vache |
| | <i>M. intracellulare</i> | + |
| | <i>M. kansasii</i> | + affections pulmonaires et ganglionnaires |
| | <i>M. marinum</i> | + |
| | <i>M. ulcerans</i> | + |
| | <i>M. xenopi</i> | + |
| M. saprophytes ou environnementales | <i>M. flavescens</i> | - |
| | <i>M. gastri</i> | - |
| | <i>M. phlei</i> | - |
| | <i>M. smegmatis</i> | - |
| | <i>M. tamnophaeos</i> | - |
| | <i>M. terrae</i> | - |
| | <i>M. vaccae</i> | - |

Le diagnostic de référence de l'infection servant de standard pour le test ID est une combinaison de deux examens de laboratoire exécutés successivement. Le premier consiste à mettre en culture le contenu de prélèvements réalisés post mortem à l'abattoir sur les carcasses et le cinquième quartier¹. Lorsqu'il n'y a pas de lésions, la culture est réalisée à partir des ganglions de localisation préférentielle de la maladie. En cas de lésion d'apparence tuberculeuse, la culture est faite à partir de la, ou des lésions et des ganglions de localisation préférentielle. Lorsque les cultures réalisées à partir de ces

¹ Terme de boucherie désignant l'ensemble constitué par l'animal abattu sans la carcasse

lésions restent stériles, elles sont doublées par un examen histopathologique. Cet examen complémentaire sera en mesure de confirmer ou d'infirmer la nature tuberculeuse de la lésion, sans toutefois permettre de préciser la nature du germe en cause. Dans le cas d'un tel diagnostic, il est convenu arbitrairement que l'animal était infecté par *M. bovis* car c'est l'attitude la plus sûre du point de vue de la santé publique qui est retenue en hygiène alimentaire et c'est la plus probable d'un point de vue épidémiologique. L'examen histopathologique n'est pas réalisé sur les ganglions sans lésions apparente en raison d'une part de son coût élevé et d'autre part de la probabilité infime de tomber exactement sur la zone où va se développer la lésion dans le cas d'un animal contaminé récemment.

2.1.2. Définition biologique du résultat du test

L'infection d'un bovin (*Bos taurus* ou *Bos indicus* ainsi que leurs croisements) par *M. bovis* n'implique pas forcément l'évolution vers la maladie. Lorsque la prévalence de la tuberculose bovine était de l'ordre de 10% en France, la maladie se développait chez environ 3% des animaux infectés par *M. bovis*. Cependant, c'est l'infection et non la maladie qui est mise en évidence par l'HSR. C'est elle aussi qui est recherchée car elle évolue dans la majorité des cas vers une forme stabilisée capable de se réactiver après plusieurs années. Les animaux ne présentent pas forcément à l'abattoir des lésions tuberculeuses actives (œdème, inflammation, néovascularisation, ramollissement, etc.) ; des lésions « froides » sous forme d'abcès froids pourront être trouvées à partir desquelles il sera possible de faire pousser des mycobactéries. Des lésions de ce type peuvent rester quiescentes pendant de nombreuses années et se réveiller brutalement suite à une chute de l'immunité.

Par conséquent, les résultats du test seront comparés au statut de l'animal par rapport à l'infection par *M. bovis* (Tableau 2) qui est définie de la manière suivante :

- est déclaré **infecté** tout animal dont l'un des prélèvements effectués post mortem donne une culture de *M. bovis* ou qui présente à l'histopathologie une lésion de nature tuberculeuse restée stérile à la culture ;
- est déclaré **non infecté** tout animal pour lequel la mise en culture des ganglions reste stérile ou donne lieu à l'identification d'une mycobactérie différente de *M. bovis*.

2.1.3. Variabilité dans l'installation de l'état d'HSR

L'infection par *M. bovis* peut évoluer de différentes manières (Figure 1) qui sont grossièrement la stabilisation, la guérison ou la maladie. Plusieurs cas de figure peuvent se présenter et expliquer les valeurs faussement positives et négatives rencontrées.

Tableau 2 : Contingence des animaux selon leur statut d'infection et leur réaction au test ID et définition des paramètres

| Résultat du test ID | statut / tuberculose bovine | | total |
|---------------------|-----------------------------|-------------|---------------|
| | infecté | non infecté | |
| Positif | a | b | a + b |
| Négatif | c | d | c + d |
| Total | a + c | b + d | a + b + c + d |

a : infectés réagissant au test ou vrais positifs

b : non infectés réagissant au test ou faux positifs (responsables de chute de spécificité)

c : infectés ne réagissant pas au test ou faux négatifs (responsables de chute de sensibilité)

d : non infectés ne réagissant pas au test ou vrais négatifs

Sensibilité = $a / (a + c)$

Spécificité = $d / (b + d)$

Prévalence apparente = $(a + b) / (a + b + c + d)$

Prévalence réelle = $(a + c) / (a + b + c + d)$

Les faux négatifs (valeur 'c' du Tableau 2) s'expliquent de la manière suivante :

- Suite à une infection récente, la réaction d'HSR n'aura pas le temps de se mettre en place (délai variant de 3 à 6 semaines) [10] ce qui entraîne un test négatif et un défaut de sensibilité. Il sera toutefois possible d'isoler le bacille à partir du ganglion d'apparence macroscopique saine, satellite du point de pénétration s'il fait partie des ganglions collectés systématiquement
- La réaction au test ID peut être négative et la carcasse présenter une lésion tuberculeuse fertile en *M. bovis*. Ce phénomène d'anergie est fréquent dans les infections anciennes dans lesquelles la réponse immunitaire de l'organisme est dépassée par la maladie [7] ; ces animaux qui présentent en général des lésions étendues et actives.
- Le phénomène d'anergie concerne aussi des animaux épuisés, malnutris qui viennent de fournir un important effort physique (transport, déplacement à pied). Il peut concerner aussi des animaux stressés par une castration récente qui présentent une anergie temporaire [7].
- L'anergie peut aussi apparaître dans le cas de lésions de petite taille, peu actives et anciennes en voie de guérison [7,11].
- Enfin, les conditions de réalisation du test ID par l'opérateur (application d'une dose insuffisante [5], mauvaise conservation de la tuberculine) peut conduire un diagnostic de faux négatif et sont responsables de la dernière fraction de défaut de sensibilité ; cependant, ce cas n'entre pas dans le calcul des paramètres de validité interne du test qui est supposé être fait dans de bonnes conditions.

Les faux positifs du test (valeur 'b' du Tableau 2), responsable de défaut de spécificité, s'expliquent par :

- Le test peut réagir positivement en raison de la sensibilisation par des mycobactéries opportunistes ou environnementales [7,8]. Comme tous les prélèvements seront mis en culture, il sera facile a posteriori de trier les zébus infectés ou non selon la définition établie ci-dessus.
- Il peut aussi donner un résultat positif en raison d'une réaction atypique qui n'apparaît généralement que dans les 48 premières heures suivant la tuberculination et disparaît ensuite (due par exemple au matériel utilisé (aiguilles sales) [7]), ou qui apparaît suite à des infections chroniques (dont la brucellose) [7].
- Il peut encore réagir positivement suite à l'infection par certains agents qui entraînent des réactions croisées avec les mycobactéries (*Corynebacterium pyogenes*, *Nocardia spp* et *Actinobacillus spp* pour les bactéries et *Fasciola spp* pour les parasites) [7,10].
- Il a été montré qu'en Afrique du Sud, les jeunes bœufs présentent souvent des réactions positives sans lésions détectables ; les femelles en fin de gestation et en période de *post partum* donnent aussi des résultats faussement positifs [7]
- Enfin, la réaction faussement positive peut être due à l'observateur, particulièrement dans cette étude où il est suggéré de classer positive toute réaction douteuse en raison de la faiblesse de l'HSR, liée à l'ancienneté des infections.

Pour éviter le problème de la réaction positive à une infection atypique, les tests sont faits en parallèle avec une tuberculination au moyen de tuberculine d'origine aviaire qui permet de différencier les groupes de mycobactéries en cause. Ils permettent d'établir un diagnostic différentiel et d'écarter le cas échéant l'hypothèse d'infection par *M. bovis*. Cependant, l'évaluation de ce test n'entre pas dans le cadre de la présente étude et n'est réalisé qu'à titre indicatif.

Par ailleurs, il peut exister chez l'animal une lésion tuberculeuse caractéristique, résultant d'une infection et qui sera détectée ou non par le test ID mais dont la culture restera négative. Ceci peut être un défaut de sensibilité de la culture qui est influencée par plusieurs paramètres (ancienneté de la lésion, calcification, caractère paucibacillaire, etc.). Dans ce cas, l'histopathologie permettra de déterminer la nature de la lésion et l'animal sera déclaré infecté s'il s'agit d'une lésion tuberculeuse.

Il est évident aussi qu'un animal infecté récemment par une porte d'entrée différente des ganglions de localisation préférentielle explorés en l'absence de lésion présentera une culture négative car la lésion du ganglion touché n'aura pas eu le temps de se développer. Il passera inaperçu, aussi bien au test ID qu'à la culture. Ce cas, probablement assez rare, n'influe que très peu sur les résultats du test puisqu'il devrait figurer dans la case 'a' du Tableau 2 (car une fois la lésion présente, l'HSR serait présente aussi) et figurerait à la fois au numérateur et au dénominateur du calcul de la sensibilité.

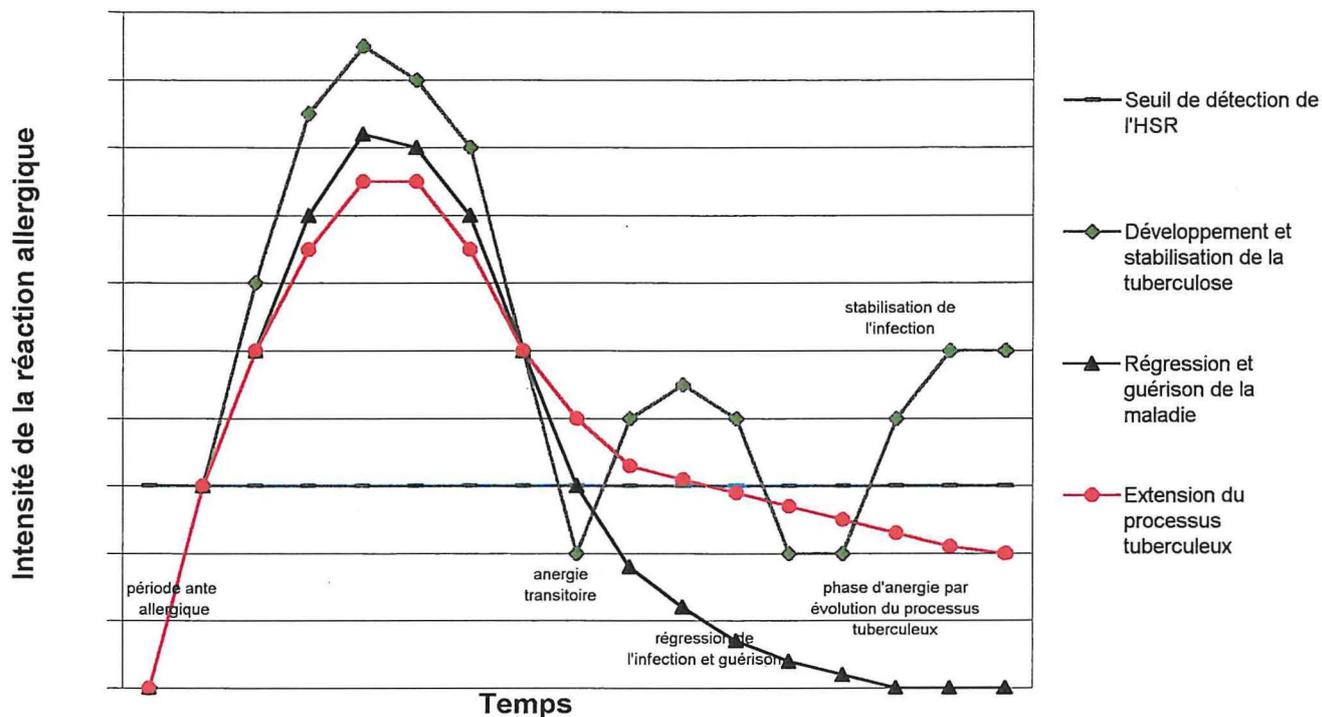


Figure 1 : Evolution de l'hypersensibilité retardée en fonction du temps

2.2. Exécution du test ID de terrain

2.2.1. Recrutement des animaux de l'expérience et manipulations

2.2.1.1. Recrutement auprès des opérateurs d'abattoirs d'exportation

La tuberculination n'est pas utilisée en routine à Madagascar, que ce soit pour le dépistage des élevages infectés ou pour les échanges commerciaux. La technique de dépistage n'est pas habituelle et ne peut pas être mise en œuvre dans n'importe quelles conditions car aucune réglementation n'oblige les éleveurs à la pratiquer. Par ailleurs, il faut que les animaux sur lesquels est effectué le test dans le cadre de cette étude, soient abattus pour faire l'objet des prélèvements nécessaires. Economiquement, il est irréalisable d'acheter les animaux pour les abattre donc l'attitude la plus logique est de travailler avec des animaux destinés à l'abattoir.

Les endroits qui réunissent les conditions les plus favorables sont les abattoirs destinés à l'exportation qui sont gérés par des opérateurs uniques, ce qui facilite les démarches de demandes d'autorisations. Il existe deux abattoirs de ce type en service à Madagascar. Ces abattoirs présentent un certain nombre d'avantages : ils abattent des animaux provenant d'une grande partie des zones d'élevage de

l'ensemble du territoire. Leurs installations sont en très bon état ce qui facilite le travail du point de vue de la propreté, du conditionnement des prélèvements et de la chaîne du froid. De plus, une réglementation européenne (UE) oblige les exportateurs à tuberculiner systématiquement tous les animaux avant leur arrivée dans l'enceinte de l'abattoir. Dans ce cas également, les installations permettent une contention efficace des animaux pour la réalisation d'une tuberculination dans de bonnes conditions.

Le recours aux abattoirs d'exportation présente cependant un certain nombre d'inconvénients. Les textes européens ne permettent pas l'entrée des animaux réagissants à l'ID dans l'enceinte de l'abattoir. Il faut donc suivre les animaux réagissants abattus dans les tueries locales pour y effectuer les prélèvements ce qui présente des difficultés car les acheteurs peuvent être nombreux et les lieux d'abattage variés et difficiles d'accès.

Un autre inconvénient est inhérent à la législation malgache : il est interdit d'abattre des femelles. L'échantillon ne comporte donc que des mâles la plupart du temps castrés et âgés (l'abattage des jeunes animaux est antiéconomique).

Enfin, les animaux achetés par l'exportateur engendrent un coût lié à leur recherche, transport, entretien, vaccination et tuberculination. L'intérêt pour l'exportateur est de réduire les charges ; un animal réagissant est pour lui une perte pratiquement totale car après les frais engagés, il sera vendu sur le marché local. Aussi, les agents responsables de l'achat des animaux les choisissent en fonction de leur état physiologique en évitant d'acheter des individus apparemment malades (les éleveurs refusent de tester les animaux avant la vente). Il est par conséquent avantageux d'effectuer l'étude de la spécificité sur un tel échantillon où le nombre de non infectés sera théoriquement maximal. En revanche, l'étude de la sensibilité sur un tel échantillon nécessiterait beaucoup trop d'animaux et de travail de laboratoire pour obtenir un nombre convenable d'animaux infectés et un intervalle de confiance étroit.

2.2.1.2. Recrutement en zone de forte enzootie

L'étude de la sensibilité se fait à partir de la réaction mesurée sur les animaux infectés qui sont en minorité ; leur proportion est estimée à près de 10 % selon la prévalence apparente moyenne sur l'ensemble du territoire. La sensibilité des tests ID est connue pour être assez faible, principalement dans le cas d'infections anciennes [6,7], ce qui est le cas d'un pays où aucune prophylaxie n'existe. L'intervalle de confiance de la sensibilité dans ce cas de figure ne sera étroit qu'avec un nombre élevé d'animaux infectés ce qui augmente considérablement le nombre d'analyses en raison de la prévalence d'infection estimée. La recherche de l'augmentation du nombre d'animaux infectés peut faciliter l'étude mais en revanche, il n'est pas possible de la réaliser dans un abattoir d'exportation.

L'endroit choisi pour réaliser l'étude est une île proche de la côte (Nosy Be) où la prévalence apparente est élevée (27,5%). La production de viande locale ne satisfait pas aux besoins de la consommation et la région voisine sur la grande île d'où proviennent les animaux est celle où la prévalence tuberculeuse apparente est l'une des plus forte du territoire . Par conséquent, les animaux présentant des signes de faiblesse sont dirigés vers l'abattoir et présentent des taux d'infection élevés ; les études préliminaires menées sur cette île ont montré qu'environ 30% des animaux abattus présentent des lésions tuberculeuses.

Comme la législation n'oblige pas les propriétaires à tuberculer leurs animaux, il faut les convaincre d'accepter de collaborer. Généralement, le propriétaire des animaux destinés à être abattus est le boucher. Celui-ci doit accepter de garder son animal trois jours supplémentaires pour réaliser le test avant de l'abattre. Par ailleurs, il faut lui donner dans la pratique des garanties de ne pas effectuer de saisie de viande. Ceci est difficilement acceptable du point de vue de la santé publique, sur ces animaux dont on sait qu'une part importante est infectée et malade, mais sans cette garantie, aucun boucher n'accepterait de collaborer.

De plus, le travail est rendu difficile par le caractère sommaire des installations de la tuerie qui ne comporte pas d'eau courante, pas d'électricité ; l'abattage est pratiqué de nuit pour améliorer la conservation de la viande qui doit être sur l'étal du marché tôt le matin. Enfin, l'île étant un lieu touristique, les bouchers voient d'un mauvais œil cet intérêt soudain des services vétérinaires pour l'hygiène des viandes et la surveillance de l'abattage.

Les animaux sont choisis pour le test sur des critères cliniques. Pour obtenir le maximum d'animaux infectés, ne sont retenus que les animaux apparemment affaiblis, maigres et présentant éventuellement des adénites.

2.2.2. Tuberculine ; matériel de tuberculation

Il existe une production de tuberculine bovine à Madagascar (Institut Malgache des Vaccins Vétérinaires - Imvavet) qui pourra être utilisée dans les futures campagnes de dépistage. Son efficacité doit être vérifiée. Il est nécessaire aussi d'utiliser une tuberculine produite selon des normes européennes connues et contrôlées [12] pour obtenir des résultats sur lesquels on peut se baser pour une comparaison éventuelle avec d'autres travaux similaires.

La tuberculine européenne utilisée (Tuberculine Bovine PPD) est distribuée par le laboratoire Solvay Santé Animale. Il s'agit d'une tuberculine produite à partir de *Mycobacterium bovis* (souche AN5) qui titre 20.000 UCT par ml (Unités Communautaires de Tuberculine).

La tuberculine aviaire utilisée est produite par Rhône Mérieux (Avituber). C'est de la tuberculine PPD, obtenue par culture de bacilles aviaires, souche D 4 ER de Weybridge et titrant 25.000 Unités par ml.

La tuberculine est conservée au réfrigérateur jusqu'à son utilisation. Son séjour hors du réfrigérateur ne dépasse théoriquement pas 24 heures selon les lieux de son utilisation et dans ce cas, elle est transportée dans des caisses isothermes contenant des réserves de glace.

La tuberculine importée est conditionnée dans de petites carpules de 1,8 ml. Le pistolet ou seringue à tuberculer automatique adapté à l'utilisation de ces carpules est un appareil de marque Hauptner délivrant par dose un volume de 0,1 ml soit 2.000 UCT de tuberculine bovine ou 2.500 unités de tuberculine aviaire.

La tuberculine locale est produite à partir de *Mycobacterium bovis* sur milieu synthétique. Elle titre 25.000 UI/ml ; la dose recommandée est de 0,2 ml par animal par voie intradermique à la jonction du 1/3 moyen et du 1/3 supérieur de l'encolure. Elle est conditionnée dans des flacons de 16 ml. Elle est administrée à l'aide de seringues à tuberculer classiques.

Deux types d'appareils sont utilisés pour mesurer le pli de peau : l'un est un cutimètre à ressort de marque Hauptner et l'autre est un simple pied à coulisse.

2.2.3. Identification et tuberculination des animaux

2.2.3.1. Pratique de l'injection de tuberculine et l'identification ante et post mortem des animaux

L'ID est un acte qui se déroule sur 3 jours ; la date de lecture optimale pour laquelle la réaction HSR est maximale et pour laquelle les réactions non spécifiques diminuent se situe au environs de 72 heures après l'injection de tuberculine [4]. Puis, l'animal est dirigé vers l'abattoir. Les prélèvements sont réalisés au niveau de la carcasse et du 5^{ème} quartier. Chacune de ces étapes doit être réalisée de manière à conserver l'identification initiale du bovin et de ne pas intervertir les numéros correspondant aux injections de tuberculine avec ceux de la lecture, puis du bovin abattu et enfin des prélèvements qui sont effectués sur des organes séparés de la carcasse et entreposés sur un plan de travail où ils côtoient les fressures² des animaux qui ont été abattus avant et après.

L'identification des animaux lors de la tuberculination se fait à la peinture. Un numéro est attribué à chaque animal et il est le même que celui des prélèvements, qui comportent en plus un code permettant d'identifier la nature de l'organe prélevé. Les animaux sont identifiés par tirage au sort. Un nombre d'animaux compatible avec le travail de collecte qui peut être réalisé en une journée sans perturber la chaîne d'abattage, est tiré au sort dans le lot de zébus destinés à être abattus un même jour. Le tirage se fait par la technique de sondage systématique où le premier zébu est tiré au sort et les autres en découlent. L'ordre est celui de pénétration dans le couloir de contention.

² terme de boucherie désignant l'ensemble anatomique composé par la trachée, les bronches, les poumons et le cœur

Le lieu d'injection de la tuberculine est lui aussi marqué à la peinture par un cercle au centre duquel se fait l'injection. La contention des animaux est réalisée soit dans un couloir dans les installations de l'abattoir d'exportation, soit au lasso dans un enclos disposant d'un pieu de contention. L'immobilisation doit être de bonne qualité pour pouvoir pratiquer l'ID dans de bonnes conditions et vérifier la présence de la papule intradermique. L'injection se pratique entre le tiers moyen et le tiers postérieur de l'encolure selon le comportement de l'animal. Pour les zébus très agressifs, elle peut être pratiquée au niveau de la bosse mais la mesure du pli de peau y est plus difficile. Il est important d'éviter de pratiquer l'ID dans une zone où il existe des épaissements du derme dus à des cicatrices d'injections médicamenteuses ou parasitaires.

Le rasage de la zone d'injection ou la tonte à l'aide de ciseaux n'est pas nécessaire en raison de la faible taille des poils et du marquage à la peinture.

Les animaux restent ensuite pendant trois jours ou plus dans le parc de tuberculination en attendant le jour d'abattage. L'ID est lue le troisième jour le plus près possible de la 72^{ème} heure après l'injection. Ils sont ensuite acheminés vers l'abattoir.

2.2.3.2. Protocoles de la tuberculination et de sa lecture

Plusieurs protocoles de tuberculination ont été mis au point au fil des années et utilisés avec des variations sur le lieu d'injection, le nombre d'injections, la tuberculine, la dose, le type de mesure etc. [5]. En l'absence de réglementation précise en la matière à Madagascar et pour être conforme avec les objectifs d'exportation, celui qui est retenu est le protocole préconisé par l'UE dans la directive 80/219/EEC [12].

Il est appliqué d'une part en mesure subjective par palpation manuelle et d'autre part en mesure objective par mesure du pli de peau. Dans le cas présent, les deux protocoles peuvent être utilisés successivement en pratiquant d'abord la lecture subjective suivie de la mesure du pli de peau pour éviter la contamination des résultats subjectifs par la lecture objective. Il a déjà été montré par utilisation simultanée des deux techniques que la mesure du pli de peau n'est pas significativement supérieure à la technique subjective [13].

La pratique de la tuberculination et son interprétation sont synthétisés dans le Tableau 3.

- La mesure subjective se fait par palpation du point d'injection où est recherchée la présence ou non d'une réaction inflammatoire associant selon les cas œdème, exsudation et nécrose. La réaction peut s'étendre à certains ganglions superficiels (adénite des ganglions préscapulaires) mise en évidence par une palpation douloureuse.

La réaction est déclarée positive lorsqu'il existe un épaissement du pli de peau et que les signes inflammatoires sont présents avec douleur à la palpation des ganglions superficiels régionaux. Elle est déclarée négative lorsque l'épaissement du pli de peau est minime et qu'il n'existe pas de

signes cliniques associés. Elle peut être considérée comme douteuse lorsque certains signes sont présents mais pas très prononcés. Ce type de diagnostic est évité dans le cas de cette étude et un doute entraînera un diagnostic de réaction positive. C'est l'attitude la plus logique à adopter dans les régions de prévalence élevée où l'on s'attend à une sensibilité faible et où les infections sont anciennes donc peu réactives. La prise en compte de la tuberculine aviaire ne se fait que si la réaction est plus importante que celle de l'ID avec la tuberculine bovine pour juger de l'éventualité d'une infection par une mycobactérie autre que *M. bovis*.

- La mesure objective ne fait intervenir que la mesure de la réaction. Il existe deux types d'ID : l'intradermotuberculation simple ou IDS et l'intradermotuberculation comparée ou IDC qui fait intervenir l'injection simultanée de tuberculine aviaire en deux points voisins. Pour l'IDS, la réglementation détermine les seuils de réaction à prendre en compte mais la détermination du seuil optimal dans les conditions malgaches se fait par traçage d'une courbe ROC.

L'IDC est plus délicate à évaluer ; elle est appliquée en routine dans les cas particuliers où une infection par une mycobactérie différente de *M. bovis* est suspectée, particulièrement dans les opérations de prophylaxie en région de prévalence très faible lorsque l'ID donne des réactions positives ou douteuses, qu'aucune lésion tuberculeuse n'est retrouvée à l'abattoir et que des infections par d'autres mycobactéries sont suspectées. La technique est utilisée dans ce cas pour réduire le nombre de réactions faussement positives par une IDS.

De manière générale, l'IDS est recommandée dans la majorité des cas. Elle peut être pratiquée aussi à l'aide de tuberculine forte titrant 100.000 UCT/ml ce qui augmente la sensibilité de la réaction. L'indication de l'utilisation de la tuberculine forte est une zone de prévalence élevée. Bien que son utilisation était indiquée, cette tuberculine n'a pas été utilisée pour des raisons de coût et pour n'être pas fabriquée localement.

La détermination des paramètres de validité interne de l'IDC ne fait pas partie des objectifs de cette étude. Son utilisation a ici un objectif différent. Elle est liée à la méconnaissance de la pression des autres mycobactéries et au fait que toute infection par une mycobactérie sera typée ce qui permettra de vérifier a posteriori la réaction mesurée ainsi que la norme admise pour les bovins dans d'autres conditions.

L'ID permet de tracer dans chaque cas une courbe ROC pour étudier le meilleur seuil et le comparer aux normes recommandées. Dans cette étude, elle est pratiquée avec les deux tuberculines bovines de manière simultanée, l'une d'un côté de l'encolure et l'autre de l'autre côté. L'ID aviaire est réalisée aussi sur l'un des deux côtés au choix. Arbitrairement, chaque côté est attribué à une tuberculine bovine pour ne pas entraîner de confusion lors de la lecture des résultats. Le point d'injection de la tuberculine aviaire est marqué à la peinture à l'aide d'une couleur différente. Le fait d'utiliser les deux tuberculines bovines de manière simultanée permet de réaliser une économie substantielle de cultures. Elle doit par ailleurs augmenter légèrement la sensibilité globale de chaque test et de vérifier la

concordance des résultats. Cette pratique ne comporte aucun risque de toxicité pour l'animal. Lors de campagnes futures de tuberculination et en fonction des résultats obtenus, il devra être gardé en mémoire que l'utilisation d'une dose totale de tuberculine plus forte pour cette étude (2 doses simples bovines + 1 dose aviaire) a tendance à surévaluer légèrement la sensibilité du test.

Tableau 3 : Pratique et interprétation de la tuberculination

| Type de lecture | Type d'ID pratiquée | Mesure ou signes recherchés | Interprétation | Indication |
|-----------------|---------------------|--|---|--|
| Subjective | IDS | recherche de symptômes cliniques : | | dépistage à grande échelle |
| | | <ul style="list-style-type: none"> locaux : œdème, érythème, chaleur exsudation, nécrose, douleur | <i>positif</i> : présence de symptômes | |
| | | <ul style="list-style-type: none"> régionaux : adénite préscapulaire, engorgement lymphatique, douleur, œdème déclive généraux: hyperthermie, inrumination | <i>négatif</i> : absence de symptômes <i>douteux (**)</i> : symptômes discrets | |
| Objective | IDS | valeur de l'épaississement : | (***) | dépistage à échelle réduite, répétition de l'ID, évaluation de seuil de réaction |
| | | ≤ 2 mm | négatif | |
| | |]2 mm ; 4 mm] | douteux | |
| | | > 4 mm | positif | |
| | IDC (*) | ID bovine = B ; ID aviaire = A | | diagnostic en cas de contamination par M. atypiques ou saprophytes |
| | | B ≤ 2 mm | négatif | |
| | | B – A < 1 mm | négatif | |
| | | B > 2 mm 1 mm ≤ B – A ≤ 4 mm | douteux | |
| | | B – A > 4 mm | positif | |

* paramètres de validité interne de l'IDC non évalués dans le cadre de cette étude ; IDC pratiquée pour détecter les réactions dues aux mycobactéries atypiques et environnementales

** le cas « douteux » est interprété comme « positif » dans cette étude

*** dans cette étude, une courbe ROC permet de définir le seuil adéquat indépendamment de l'épaississement ; il n'est pas tenu compte des valeurs préconisées par la réglementation

L'étude réalisée en région de prévalence élevée n'est faite qu'avec une tuberculine pour des raisons de disponibilité de réactif.

Trois personnes, toutes de formation vétérinaire, ont participé à la réalisation des tests, soit ensemble, soit individuellement. Un rappel de la technique a été effectué pour obtenir une bonne uniformité des résultats. Comme la validité dépend en partie de la bonne exécution de l'injection de tuberculine et

qu'il s'agit de déterminer la valeur des paramètres dans des conditions de terrain, l'effet opérateur n'est pas étudié en tant que facteur de variabilité car cela aurait augmenté considérablement le nombre de tests à effectuer.

Il faut cependant garder en mémoire ce facteur de variation qui peut influencer de manière non négligeable sur la sensibilité du test. Compte tenu du soin apporté par les opérateurs pour la réalisation de cette étude, la sensibilité déterminée sera considérée comme étant proche de la valeur maximale qui peut être atteinte.

2.3. Collecte de prélèvements

Les zébus identifiés pour l'étude arrivent parmi le lot journalier sur la chaîne d'abattage au hasard de leur entrée dans le couloir. Les premiers examens sont faits sur la fressure et les viscères abdominaux qui sont séparés de la carcasse, après avoir été correctement identifiés. Puis les ganglions de la tête sont explorés lors de la séparation de celle-ci. Enfin, les ganglions de la carcasse sont explorés ; le numéro de carcasse qui est apposé dès le retrait de la peau ne permet pas d'erreur d'identification comme cela pourrait être le cas pour le 5^{ème} quartier. Cette opération de collecte de prélèvements est réalisée dans le cours normal du processus d'habillage des carcasses. Les ganglions explorés (Tableau 4) sont retirés de la carcasse et coupés en fines lamelles pour détecter la moindre lésion interne qui ne serait pas visible à l'œil nu. Les organes explorés sont découpés en plusieurs tranches et palpés pour rechercher les lésions. Le matériel utilisé est un couteau de boucher qui est stérilisé entre chaque prélèvement dans un bac de stérilisation contenant un flux d'eau à une température de 82°C. Ce type d'installation est d'usage obligatoire dans les abattoirs d'exportation ; dans les tueries traditionnelles, la stérilisation est faite avec de l'eau additionnée de détergent et à l'alcool à 90°.

En absence de lésions, seuls certains ganglions de localisation préférentielle sont prélevés pour être mis en culture ; ces ganglions ne sont alors pas coupés en lamelles pour éviter une contamination. Il s'agit des ganglions rétropharyngiens droit et gauche, médiastinaux antérieur et postérieur et trachéobronchiques droit et gauche. Les prélèvements sont numérotés en spécifiant leur aspect apparemment sain.

En cas de présence de lésions, c'est la lésion qui va être prélevée. Le ganglion satellite de la zone où se trouve la lésion est lui aussi collecté. Si il existe plusieurs lésions localisées sur des organes différents, la même opération est reproduite pour chaque lésion. Si la lésion est unique et tous les ganglions hors de la zone lésée sont sains, les ganglions de localisation préférentielle sont eux aussi collectés. Toute carcasse présentant une lésion dans l'abattoir d'exportation est aussitôt écartée de la chaîne, tout comme son 5^{ème} quartier et acheminée en salle de saisie.

Les prélèvements sont mis dans des récipients stériles de PVC et placés immédiatement dans une chambre froide ou une glacière à 4°C. L'identification des prélèvements se fait sur le récipient au

moyen d'un marqueur indélébile par une codification qui est utilisée également au laboratoire (Tableau 4). Selon le cas, ils sont transportés immédiatement au laboratoire où ils sont congelés, ou ils sont d'abord congelés pour être transportés ultérieurement en envoi groupé. Cette dernière solution est indiquée dans l'un des abattoirs d'exportation (Majunga) et dans la région de forte enzootie, tous deux distants du laboratoire.

Tableau 4 : Liste des organes à explorer

| Région anatomique | Code laboratoire | Nom de l'organe exploré | Localisation anatomique |
|-------------------|---------------------|---|--------------------------------------|
| Tête | 1a | N.L.** sous maxillaire | droit et gauche |
| | 1b | N.L. rétropharyngien | droit * et gauche * |
| | 1c | N.L. préparotidien | droit et gauche |
| | 1d | N.L. préatloïdien | droit et gauche |
| | 1e | Amygdale | |
| Thorax | 2 a | N.L. médiastinaux | antérieur* et postérieur* |
| | 2 b | N.L. trachéobronchique | droit *, gauche *, cranial et caudal |
| | 2 c | Poumon | |
| | 2 d | Cœur | |
| | 2 e | Plèvre | |
| Abdomen | 3 a | Foie | |
| | 3 b | N.L. hépatique | |
| | 3 c | Rate | |
| | 3 d | N.L. mésentériques | sur tout le tractus |
| | 3 e | Rein | |
| Carcasse | 4 a | N.L. préscapulaire | droit et gauche |
| | 4 b | N.L. subiliaque | droit et gauche |
| | 4 c | N.L. iliaque interne | droit et gauche |
| | 4 d | N.L. iliaque médial | droit et gauche |
| | 4 e | N.L. iliaque latéral | droit et gauche |
| | 4 f | N.L. ischiatique | droit et gauche |
| | 4 g | N.L. sacraux | droit et gauche |
| | 4 h | N.L. inguinaux superficiels scrotaux | droit et gauche |
| | 4 i | Contenu scrotum et vésicules séminales | |

* ganglions à prélever au minimum en cas d'absence de lésion sur l'ensemble des organes

** N.L. : nœud lymphatique ou ganglion

Le nombre de cultures sera au maximum de 4 par animal ; comme il peut y avoir jusqu'à 6 prélèvements, les ganglions homologues sont broyés ensemble au laboratoire et mis dans une seule culture.

2.4. Diagnostic de laboratoire

Les prélèvements sont acheminés au laboratoire soit immédiatement après la collecte, soit après congélation en transport groupé. Au laboratoire, ils sont stockés au congélateur en attendant leur mise en culture.

L'Institut Pasteur de Madagascar (Centre National de Référence des Mycobactéries) répond à tous les besoins de l'étude : cultures, identification et histopathologie. Les cultures et identifications sont réalisées au laboratoire des mycobactéries, l'histopathologie est faite dans le laboratoire d'analyses médicales. Un contrôle externe des identifications est assuré par le Centre de Référence des Mycobactéries de l'Institut Pasteur de Paris.

Les prélèvements de ganglions et d'organes sont décontaminés à l'acide sulfurique avant d'être mis en culture pour isolement des bacilles. Les milieux de culture utilisés sont les milieux de Lowenstein-Jensen et Lowenstein-Jensen additionné de pyruvate selon les recommandations de l'OMS [14].

Les *M. bovis* sont identifiés en utilisant les tests biochimiques suivants : production de niacine, catalase, nitrate réductases et uréases.

Quatre cultures sont réalisées pour chaque zébu. Les résultats sont mesurés de manière quantitative par le nombre de colonies qui est évalué par comptage et arrondi. Il n'est cependant pas utilisé pour mesurer la gravité de l'infection ou l'importance de la réaction ID. Le nombre de colonies dépend surtout de la richesse du prélèvement en bacilles qui n'est pas corrélée à la taille ou à la gravité de la lésion.

Les cultures qui restent apparemment stériles sont observées pendant une durée totale de 3 mois avant d'être déclarées stériles.

Les lésions qui restent stériles à la culture sont analysées par histopathologie. Si la lésion est de nature tuberculeuse, l'animal est considéré comme infecté. Il existe une certaine incertitude dans cette démarche liée à l'identification du germe responsable de la lésion mais cette éventualité est la plus probable et semble être la plus raisonnable du point de vue de la santé publique. Le risque est de surévaluer le taux d'infection des bovins par *M. bovis* et de sous évaluer celui des mycobactéries atypiques. Il faut évaluer ce choix au vu des résultats des cultures qui donnent une idée sur l'importance des mycobactéries atypiques.

2.5. Schéma de l'étude

L'étude des paramètres de validité interne du test ID se décompose en trois phases réalisées sur des échantillons de zébus différents sur lesquels sont calculés la sensibilité et la spécificité. Les différentes valeurs obtenues correspondent aux choix des échantillons orientés par la nécessité de travailler sur des animaux non infectés pour le calcul de la spécificité ou sur des animaux infectés pour celui de la sensibilité.

Une première phase a été réalisée avec le test ID utilisé de manière subjective. Au cours de l'étude sont apparus au laboratoire des résultats surprenants qui ont conduit à la reprise de l'étude avec des précautions supplémentaires (voir résultats et discussion) et en utilisant également la mesure objective. Cette phase est qualifiée d'étude préliminaire.

La seconde phase de l'étude, ou étude de référence, a été réalisée en abattoir d'exportation sur un échantillon provenant de zones à faible taux d'infection. Elle se subdivise elle-même en deux études correspondant aux deux tuberculines bovines différentes appliquées sur les mêmes animaux. Cette option a été choisie pour des raisons d'économies d'analyses de laboratoire. Elle a été réalisée avec le test ID utilisé de manière subjective et objective. La lecture des résultats par la méthode subjective se fait avant la mesure du pli de peau et de manière indépendante de celle de l'autre tuberculine.

L'étude produit des résultats en fonction de chaque tuberculine ; cependant, elle n'est pas destinée à comparer les tuberculines entre elles. L'étude réalisée à l'aide de la tuberculine importée constitue la réponse de référence à une tuberculine testée selon des normes standardisées et c'est celle qui sera prise en compte.

Une courbe ROC est tracée avec chacune des deux tuberculines bovines testées pour déterminer le meilleur seuil de discrimination et évaluer la pertinence de l'utilisation de normes européennes [12].

Dans la troisième phase de l'étude, les paramètres de validité interne du test sont calculés sur un échantillon d'animaux réalisé en zone de forte enzootie tuberculeuse pour augmenter l'effectif de calcul de la sensibilité. Cette étude est qualifiée d'étude en zone de prévalence élevée.

La troisième phase clôt l'étude des paramètres de validité interne du test ID. Cependant, le déroulement des études a permis de collecter un grand nombre d'informations de domaines variés qui apportent des précisions à la fois sur la qualité du test ID utilisé mais également sur l'importance de l'inspection en hygiène alimentaire en tant qu'outil de détection de troupeaux infectés.

Il est donc intéressant de calculer également la sensibilité et la spécificité de la qualification des animaux comme tuberculeux ou non à partir de l'observation de lésions c'est à dire relier l'anatomopathologie à la culture et à l'histopathologie. L'objectif de cette démarche est de pouvoir utiliser en routine dans les abattoirs et tueries l'observation de lésions supposées tuberculeuses sur des carcasses comme moyen de déclarer infecté l'élevage d'origine de l'animal. La qualification des cheptels vis à vis de la tuberculose fait partie de la stratégie de lutte contre la maladie. Elle peut être effectuée aussi bien par le test de terrain ID que par la surveillance à l'abattoir. En attendant de mettre

en place les moyens logistiques et législatifs pour pouvoir entreprendre des dépistages de masse, la qualification d'élevage infecté à partir de la découverte de lésions d'abattoir peut offrir des résultats à faible coût. Cet objectif accessoire permet de compléter la validation du dispositif de surveillance de la maladie.

Pour compléter les observations, les résultats d'une étude faite à partir d'un échantillon sélectionné après réaction positive à l'ID (114 animaux) sont ajoutés aux précédents. Ce choix est motivé par la recherche de l'augmentation du nombre de lésions, sur lesquelles se font le diagnostic, et qui sont présentes en plus grand nombre chez les animaux réagissant à l'ID. Les différentes études sont synthétisées dans le Tableau 5.

Les résultats produits par les différentes études apportent des informations d'ordre général sur les organes atteints, le type de lésion, etc. Les données sont analysées de manière descriptive.

Suite au calcul de ces différents paramètres d'évaluation de qualité du test ID, ils sont utilisés pour redresser les valeurs de prévalence apparente obtenus dans l'enquête nationale.

La formule utilisée pour le redressement des valeurs est la suivante [15] :

$$Pr = (Po + Sp - 1) / (Se + Sp - 1)$$

Où : Pr = prévalence réelle

Po = prévalence apparente (ou observée)

Les nouveaux résultats sont discutés en fonction des particularités régionales.

Tableau 5 : Synthèse des études en fonction des objectifs et des différents échantillons de zébus testés

| Nom de l'étude | Nature de l'étude | Objectif | Type de mesure | Taille échantillon |
|---------------------------------------|--|--|--|--------------------|
| 1. Etude préliminaire | Etude de Se / Sp par ID avec 2 tuberculines bovines et 1 aviaire | calcul des paramètres de validité interne du test ID | subjective (palpation manuelle) | 227 |
| 2. Etude de référence | Etude de Se / Sp par ID avec 2 tuberculines bovines et 1 aviaire | * mesurer paramètres de validité interne du test ID | | |
| | a) tuberculine Imvavet | * évaluer le meilleur seuil de discrimination | subj / objective (mesure au cutimètre) | 100 |
| | b) tuberculine Solvay | | subj / objective (mesure au cutimètre) | 100 |
| 3. Etude en zone de prévalence élevée | Etude de Se / Sp de ID | mesurer Se en région de prévalence élevée | subj / objective (mesure au cutimètre) | 22 |
| 4. Classification de carcasses | paramètres de validité interne de classification de carcasses à l'abattoir | évaluer outil de détection des élevages infectés | évaluation visuelle | 457 |

3. Résultats

3.1. Paramètres de validité interne du test ID

3.1.1. Etude préliminaire

La détermination des paramètres de validité interne a été réalisée dans un premier temps sur un échantillon de 227 animaux à l'aide de deux tuberculines bovines et pour une part d'entre eux (100), avec la tuberculine aviaire. L'ID été pratiquée sur 127 zébus avec une tuberculine (Solvay) et sur 100 animaux avec l'autre (Imvavet). La tuberculine aviaire a été utilisée avec chacune des deux tuberculines bovines sur 50 zébus.

Sur tout l'échantillon, *M. bovis* a été isolé à partir de 13 carcasses parmi lesquelles, 9 présentaient des lésions et 4 n'en présentaient pas. Des mycobactéries atypiques ont poussé sur les prélèvements de 41 zébus ce qui est très élevé. Les espèces isolées de certains d'entre eux sont *M. flavescens*, *M. vaccae*, *M. mucogenicum*, *M. thermoresistibile*, appartenant toutes aux mycobactéries environnementales a pathogènes pour les bovins.

Des lésions ont été observées sur 15 carcasses en tout et l'une d'entre elles a donné une culture d'une mycobactérie atypique (espèce non identifiée ; 1 seule colonie a poussé). Parmi les 5 lésions restées stériles et traitées en histopathologie, 3 d'entre elles étaient de type tuberculeuse et les 2 autres n'étaient pas interprétables pour des raisons de conservation des prélèvements : elles ont été déclarées négatives.

Au total, 16 zébus ont été classés infectés. Compte tenu du faible nombre d'animaux infectés, les résultats n'ont pas été discriminés selon la tuberculine utilisée pour le calcul de la sensibilité. C'est également ce qui a motivé la poursuite de l'étude pour augmenter la puissance.

Sur les 100 tests réalisés, la tuberculine aviaire a réagi positivement 3 fois. Les zébus pour lesquels des mycobactéries atypiques ont été isolées n'ont pas eu de réaction à la tuberculine aviaire. Elle n'a réagi qu'une fois sur un animal infecté par *M. bovis*.

Les résultats de Se et de Sp sont portés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Paramètres de validité intrinsèque ID mesurés par la méthode subjective dans l'étude préliminaire

| Paramètre / Etude (taille échant.) | Spécificité | | | Sensibilité | | |
|---------------------------------------|-------------|-----|----------------|-------------|----|----------------|
| | Valeur | N | IC | Valeur | N | IC* |
| Et. préliminaire (227) | 0,991 | 211 | [0,977 ; 1,00] | 0,438 | 16 | [0,198; 0,701] |

* IC relatif aux petits échantillons calculé sans approximation par la méthode binomiale

Le test IDC n'apporte rien dans ce cas. Ce qui est recherché, c'est une discordance maximale entre les deux diagnostics sur les animaux infectés par *M. bovis* ou par d'autres mycobactéries alors qu'on observe une concordance parfaite. De plus, il n'y a pas eu de réaction positive de la tuberculine aviaire pour les nombreux isollements de mycobactéries environnementales.

3.1.2. Etude de référence

Cette étude a été réalisée au niveau de l'abattoir d'exportation de Tananarive. Un échantillon total de 100 zébus a été testé simultanément avec deux tuberculines bovines et la tuberculine aviaire. Les tests se sont étalés sur trois mois. L'étude a duré plus longtemps que prévu pour des raisons de disponibilités en zébus en raison d'une menace d'embargo européen sur la viande suite à une épizootie de charbon symptomatique près de l'une des zones de collecte des animaux.

3.1.2.1. Tuberculine Imvavet

3.1.2.1.1. Résultats de l'ID, des cultures et de l'histopathologie

L'ID a donné une réponse positive pour 12 zébus, soit une prévalence apparente de 12 %.

Sur les prélèvements de 100 animaux mis en culture, 17 ont poussé parmi lesquels 16 *M. bovis* et 1 mycobactérie atypique. Un nombre total de 17 animaux présentaient des lésions dont 6 en l'absence de réaction aux tests ID soit 6% des animaux testés ; ce sont ceux qui sont communément qualifiés d'anergiques car le défaut de sensibilité du test est révélé en partie par les découvertes d'abattoir. En réalité, l'anergie sensu stricto s'étend aux animaux non réagissants à l'ID et sans lésions, pour lesquels se développe une culture positive (4 cas). L'anergie représente donc 10 % des animaux présentés à l'abattoir et 47,6 % des infectés.

Parmi les lésions, 5 sont restées stériles et ont été traitées en histologie ; elles étaient de nature tuberculeuse et ont permis de classer les zébus porteurs comme infectés. Elles proviennent sans doute d'animaux en phase de tuberculose stabilisée ou en voie de guérison. Une synthèse des résultats est présentée dans le Tableau 7.

Finalement, 21 animaux ont été déclarés infectés dans l'échantillon initial de 100 zébus choisis par les agents chargés de l'approvisionnement de l'abattoir d'exportation comme étant des animaux probablement sains et donc non malades. En effet, ce dernier critère ne permet pas de prévoir l'état de l'animal vis à vis de l'infection tuberculeuse. La prévalence réelle de l'infection tuberculeuse est en fait de 21 % ce qui est bien supérieur à ce qui était attendu. Dans la pratique, seuls ont été détectés et/ou écartés de la chaîne d'abattage les zébus réagissant à l'ID dans un premier temps, puis les carcasses et 5^{ème} quartiers présentant des lésions d'apparence tuberculeuse sur la chaîne. Les quatre

animaux présentant des cultures positives en l'absence de réaction à l'ID et de lésion (soit 4% des animaux abattus ou 19% des animaux infectés) ne peuvent pas être identifiés macroscopiquement à l'anatomopathologie et par conséquent sont considérés à tort comme sains.

Un zébu a réagi positivement sans présenter de lésions et les cultures de ses ganglions sont restées stériles ; il s'agit d'une erreur par excès du test. Cet animal a été écarté aussi de la chaîne d'abattage d'exportation.

Tableau 7 : Synthèse des résultats de culture et d'histopathologie

| ID | Lésion | Culture | Anapath. | Diagnostic | Nb cas |
|---------|----------|-----------------|-----------|-------------|--------|
| négatif | absente | stérile | pas faite | non infecté | 77 |
| | | <i>M. bovis</i> | | infecté | 4 |
| | | M. atypiques | | non infecté | 1 |
| | présente | stérile | faite | infecté | 3 |
| | | <i>M. bovis</i> | pas faite | | 3 |
| positif | absente | stérile | | non infecté | 1 |
| | présente | | faite | infecté | 2 |
| | | <i>M. bovis</i> | pas faite | | 9 |

3.1.2.1.2. Calcul des valeurs de sensibilité et spécificité ; IC et courbe ROC

Les résultats de lecture du test par méthode subjective sont présentés dans le Tableau 8.

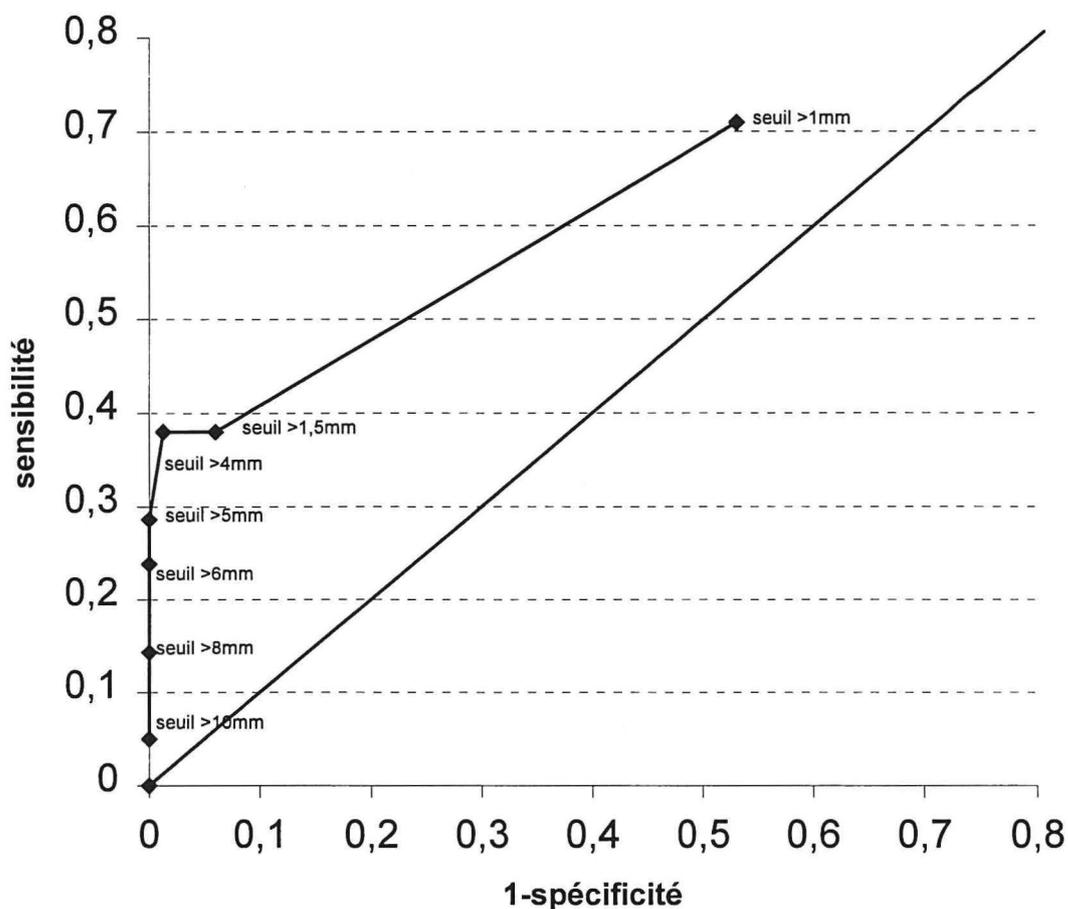
Tableau 8 : Paramètres de validité intrinsèque mesurés par la méthode subjective dans l'étude de référence

| Paramètre / Etude (taille échant.) | Spécificité | | | Sensibilité | | |
|---|--------------|----|----------------|--------------|----|----------------|
| | Valeur | N | IC | Valeur | N | IC* |
| Tub. Imvavet (100) | 0,987 | 79 | [0,962 ; 1,00] | 0,524 | 21 | [0,298; 0,743] |
| Tub. Solvay (100) (valeurs de référence) | 0,987 | 79 | [0,962 ; 1,00] | 0,524 | 21 | [0,298; 0,743] |

* IC relatifs aux petits échantillons calculés sans approximation par la méthode binomiale

La méthode de lecture objective permet de tracer une courbe ROC (Graphique 1). Le meilleur compromis entre sensibilité et spécificité se situe aux environs de 4 mm mais la courbe est tracée avec

peu de points ce qui la rend difficilement interprétable. Cependant, il est possible de voir que cette mesure, identique à celle retenue par les normes européennes (4 mm), ne permet pas de conclure avec une bonne sensibilité (de l'ordre de 0,4). La réaction semble bien moins importante que ce qui est annoncé dans d'autres études [4-6]. Par ailleurs, la sensibilité reste toujours inférieure à celle obtenue par la lecture subjective qui elle, fait intervenir davantage de symptômes et de critères de jugement (Tableau 3).



Graphique 1 : Courbe Roc établie à l'aide des données de la tuberculine Imvavet

3.1.2.2. Tuberculine Solvay

Les résultats de l'étude avec la tuberculine Solvay, qui sont utilisés comme référence des paramètres de validité interne du test, sont identiques à ceux de la tuberculine Imvavet en ce qui concerne les cultures car effectuées sur les mêmes animaux. En lecture subjective, les résultats sont les mêmes que pour la tuberculine Imvavet (Tableau 8) bien que les deux tuberculines divergent sur 2 cas. Les deux

cas concernent pour chacune des tuberculines un zébu non infecté sans lésion ; les résultats synthétiques présentés dans le Tableau 7 sont donc identiques pour la tuberculine Solvay.

La concordance entre les tests ID effectués avec chacune des tuberculines est mesurée par le coefficient Kappa. Sa valeur est égale à la différence entre la concordance observée et la concordance aléatoire rapportée à la concordance potentielle [16]. La réponse des deux tuberculines l'une par rapport à l'autre est présentée dans le Tableau 9.

La formule du coefficient Kappa s'écrit :

$$\kappa = 2 (ad-bc) / (a+b)(b+d)+(c+d)(a+c)$$

Dans ce cas, le coefficient kappa a pour valeur :

$$\kappa = 0,905$$

Cet indice est très bon, ce qui est normal car il s'agit du même type de diagnostic sur le même animal. S'il n'était pas bon, il faudrait penser à incriminer l'une des deux tuberculines.

Tableau 9 : Contingence des réactions des deux tuberculines l'une par rapport à l'autre

| Réaction tub. Imvavet | Réaction tuberculine Solvay | | total |
|-----------------------|-----------------------------|---------|-------|
| | positif | négatif | |
| positif | 11 | 1 | 12 |
| négatif | 1 | 87 | 88 |
| total | 12 | 88 | 100 |

La contamination des résultats au cours de la lecture entre les deux tests n'intervient théoriquement pas. Pour plus de sûreté, le coefficient Kappa peut être calculé de nouveau à partir des données objectives pour un seuil fixé arbitrairement.

Pour un seuil fixé à 4 mm, le coefficient Kappa est de :

$$\kappa = 1$$

Pour un seuil supérieur (5 mm) il devient :

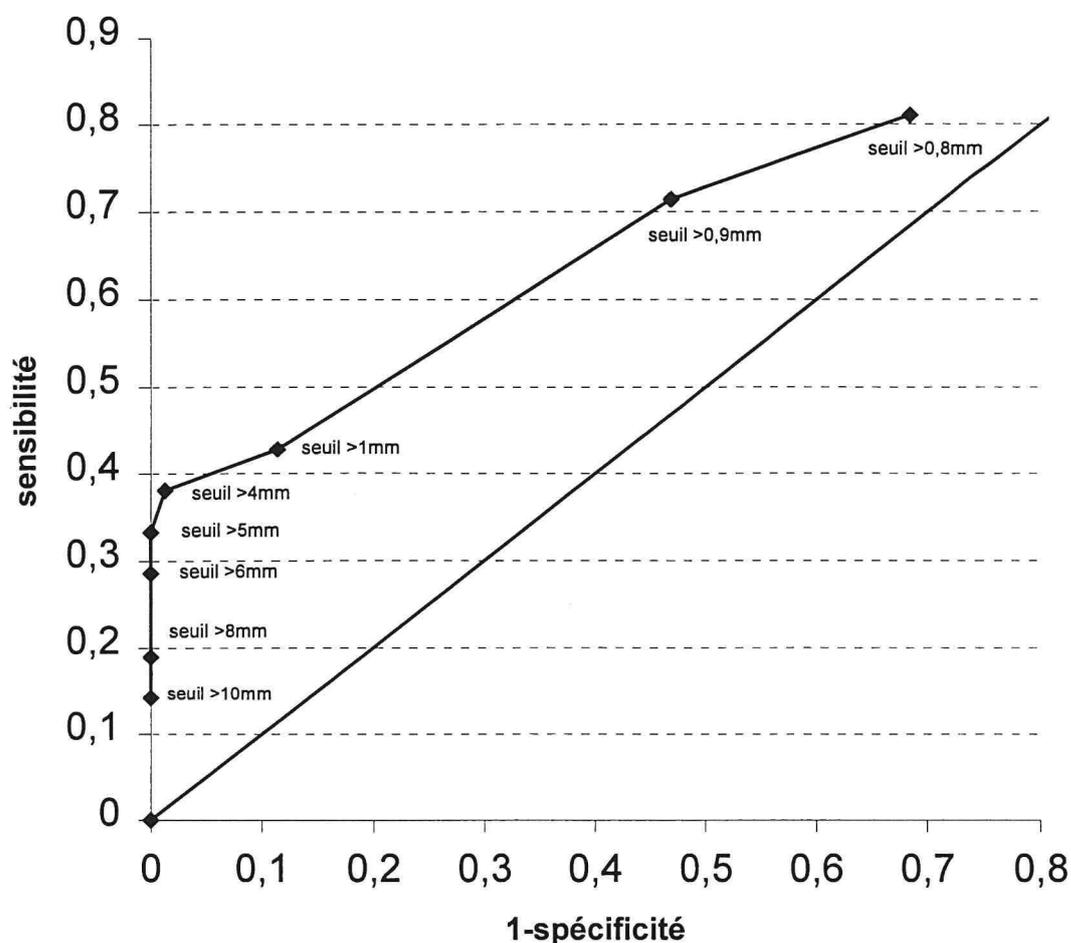
$$\kappa = 0,9$$

Pour un seuil inférieur (1,5 mm), il est de :

$$\kappa = 0,795$$

Le coefficient kappa est donc le meilleur pour le seuil de 4 mm mais le faible nombre de données ne permet pas d'évaluer des seuils voisins pour lesquels la sensibilité serait meilleure.

Les résultats de la mesure objective sont portés sur le Graphique 2. Comme pour la tuberculine Imvavet, le meilleur compromis entre sensibilité et spécificité se situe aux environs de la valeur seuil de 4 mm, seuil pour lequel la sensibilité est de l'ordre de 0,4. La forme de la courbe diffère légèrement de celle tracée avec les données de la tuberculine Imvavet. Cependant, il ne semble pas réaliste de porter un jugement à partir d'un nombre aussi faible de points.



Graphique 2 : Courbe Roc établie à l'aide des données de la tuberculine Solvay

3.1.3. Etude en zone de prévalence élevée

L'étude faite à l'aide de tuberculine importée a été réalisée sur 36 animaux en région d'enzootie élevée. Dans ce dernier cas, et compte tenu des réticences des bouchers (cf § 2.2.1.2.), seuls 22 animaux ont été présentés et les autres ont été abattus dans d'autres tueries pour échapper à tout contrôle. Il a été impossible d'obtenir des informations sur ces perdus de vue mais il est fort probable qu'en raison de réactions générales importantes sur les animaux témoignant une maladie avancée, les bouchers aient craint une attitude répressive des services vétérinaires et les aient soustraits à notre

contrôle. Leur attitude ne peut pas s'expliquer autrement car ils ont choisi en nous évitant une solution plus difficile pour eux : aller les faire abattre dans des tueries éloignées. On peut donc supposer que le groupe des animaux non présentés soit encore plus infecté (et sans doute malade) que celui des zébus présentés spontanément.

L'éloignement de la zone de collecte et les difficultés logistiques de mise en place d'une telle étude d'une part, et les fortes réticences des bouchers d'autre part, n'ont pas permis de renouveler l'étude.

Sur les 22 zébus présentés, 10 ont été déclarés infectés, soit 45,5 % des animaux. Ce chiffre ne représente pas la réalité car d'une part ces animaux ont été choisis, parmi le lot des zébus destinés à l'abattage sur une semaine, sur leur aspect « malade » et d'autre part, 14 zébus choisis sur ces mêmes critères n'ont pas été présentés. Les études préliminaires destinées à localiser une région de prévalence élevée avaient signalé la présence de lésions sur environ 30% des animaux abattus en routine.

La culture a permis d'isoler *M. bovis* à partir des prélèvements de 9 zébus et 1 animal a été déclaré infecté par le résultat de l'histopathologie. Enfin, une mycobactérie atypique a été isolée à partir d'un prélèvement sans lésion.

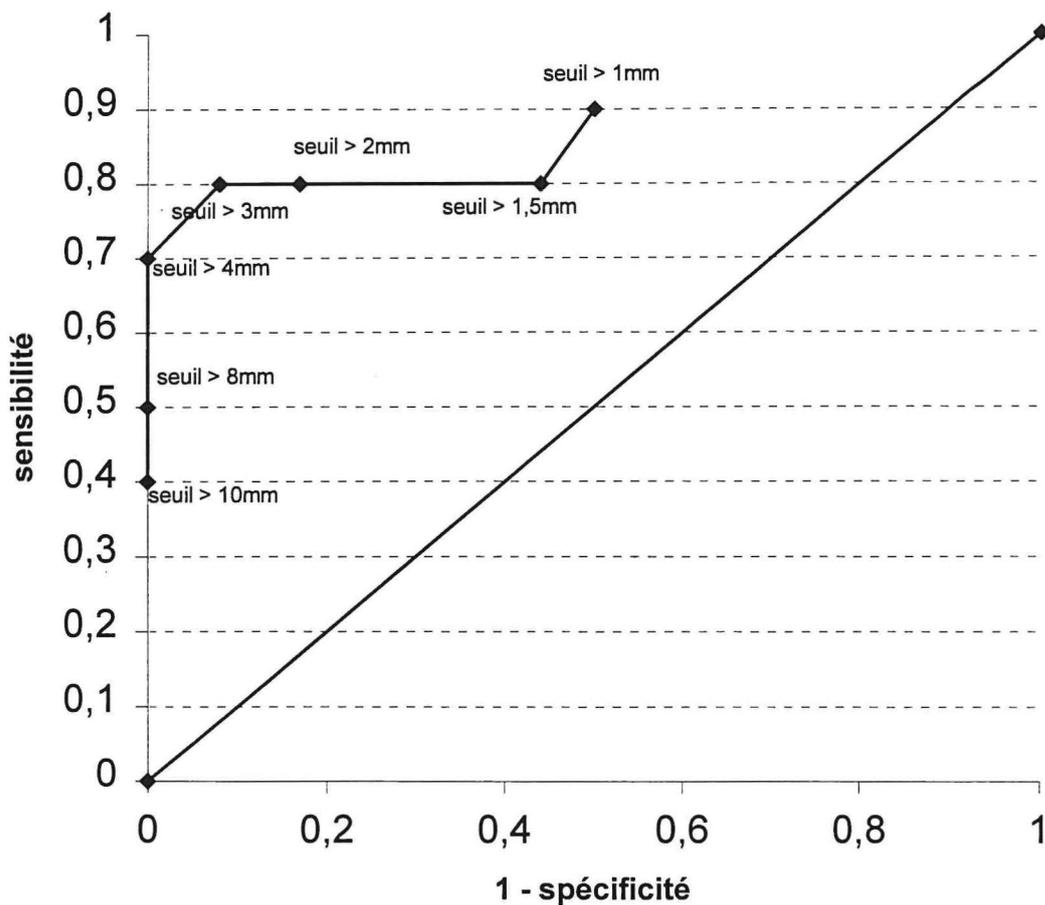
Tous les animaux déclarés infectés et seulement eux présentaient des lésions. Les résultats de sensibilité et de spécificité sont présentés dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Paramètres de validité intrinsèque des tests mesurés par la méthode subjective

| Paramètre / Etude (taille échant.) | Spécificité | | | Sensibilité | | |
|---------------------------------------|-------------|----|----------------|-------------|----|----------------|
| | Valeur | N | IC* | Valeur | N | IC* |
| Nosy Be (22) | 1,000 | 12 | [0,735 ; 1,00] | 0,800 | 10 | [0,444; 0,975] |

* IC relatifs aux petits échantillons calculés sans approximation par la méthode binomiale

La courbe Roc est réalisée sur un échantillon très restreint et peut difficilement être interprétée en raison du faible nombre de points (Graphique 3). Le meilleur seuil semble se situer entre 3 et 4 mm, soit une valeur proche de celle recommandée par les normes européennes. Pour une valeur seuil de 4 mm, la sensibilité du test se situe aux environs de 0,7 et pour une valeur seuil de 3 mm, elle est de 0,8. Il serait intéressant d'avoir un nombre de points plus important pour avoir une courbe plus précise.



Graphique 3 : Courbe Roc établie à partir des données de la région de prévalence élevée

3.2. Paramètres de validité de la qualification des cheptels à partir de l'observation de lésions à l'abattoir

L'estimation des paramètres de validité interne de la qualification des cheptels à partir de l'observation anatomopathologique à l'abattoir est faite à partir d'un échantillon total de 463 zébus pour lesquels ont été réalisées des cultures et, le cas échéant, des analyses histopathologiques.

Les résultats de cultures sont portés dans le (Tableau 11).

Tableau 11 : Synthèse des résultats de cultures et histologies faites sur 463 animaux

| Lésion | Culture | Histopathologie | Conclusion | Nombre de cas |
|----------|--------------|-------------------|---------------|---------------|
| absente | stérile | non faite | non infecté | 267 |
| | M. atypiques | | non infecté | 42 |
| | M. bovis | | infecté | 9 |
| présente | stérile | faite (positive) | infecté | 27 |
| | | non interprétable | (non) infecté | 6 |
| | M. bovis | non faite | infecté | 107 |
| | M. atypiques | | non infecté | 5 |

La valeur des paramètres de validité du diagnostic de tuberculose formulé par l'agent à l'observation de lésions sur la carcasse sont présentés dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Paramètres de validité interne de la classification des animaux par examen anatomopathologique

| Paramètre / hypothèse | Spécificité | | | Sensibilité | | |
|--------------------------|-------------|-----|-----------------|-------------|-----|-----------------|
| | Valeur | N | IC* | Valeur | N | IC* |
| n°1* | 0,966 | 320 | [0,946 ; 0,986] | 0,937 | 143 | [0,897 ; 0,977] |
| n°2** | 0,984 | 314 | [0,970 ; 0,998] | 0,940 | 149 | [0,902 ; 0,978] |

* les résultats histopathologiques ininterprétables sont considérés non infectés

** les résultats histopathologiques ininterprétables sont considérés infectés

La différence observée pour la valeur de la sensibilité dans les deux cas de figure est due aux diagnostics de maladie réalisés par l'agent qui ne sont confirmés ni par la culture, ni par l'histopathologie pour des raisons techniques ; 6 prélèvements dans ce cas n'ont pas pu être exploités en raison de leur mauvais état de conservation (structure histologique détruite par la congélation).

Les deux hypothèses donnent les valeurs maximales de variation des paramètres en fonction du classement « infecté » ou « non infecté » des résultats d'histopathologie non interprétables.

3.3. Etude descriptive des localisations anatomiques des lésions

Cette étude est faite sur l'échantillon de 100 animaux testé avec deux tuberculines, sur celui de Nosy Be et sur les animaux choisis pour leur réaction positive au test (n=114).

Sur un total de 257 lésions collectées, 67 l'ont été sur des ganglions rétropharyngiens, 81 sur des médiastinaux et 75 sur des trachéobronchiques. Ces trois localisations représentent 86,8 % des lésions rencontrées et c'est ce qui explique le choix du prélèvement de ces ganglions en l'absence de lésion. Les lésions prélevées sur la tête représentent 28,4 % des lésions, celles prélevées sur la fressure représentent 61,4 %, celles prélevées sur les organes de la cavité abdominale représentent 4,4 % et enfin, celles prélevées sur la carcasse représentent 5,8 % du total des lésions prélevées.

3.4. Redressement des valeurs de prévalence nationale

La prévalence de l'infection tuberculeuse à l'échelle individuelle est portée sur deux cartes : l'une avant redressement et l'autre après redressement des valeurs observées (Carte 1 et Carte 2).

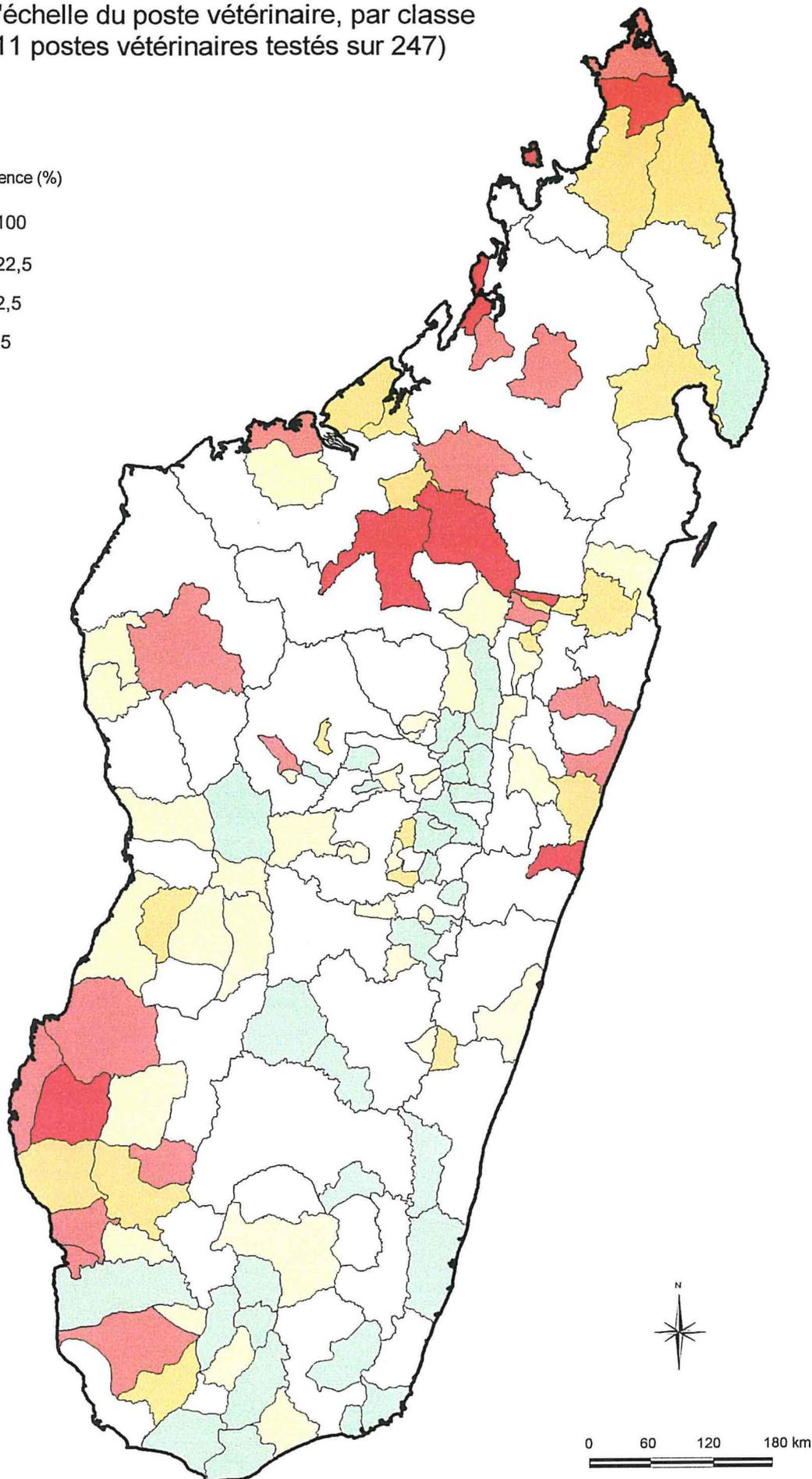
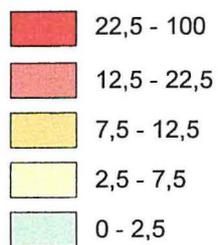
Les valeurs réelles ont tendance à augmenter par rapport aux valeurs apparentes ; la prévalence moyenne nationale de l'infection tuberculeuse qui était de 9,6 % passe après redressement à 16,0 %. Une pondération sommaire a été faite pour prendre en compte les différences d'effectifs au sein des 6 provinces malgaches ; les provinces où la population bovine est la plus dense sont aussi celles où la prévalence de l'infection est la plus élevée ce qui explique cette augmentation importante de l'estimation de la moyenne nationale. La pondération n'a pas pu être faite à l'échelle du poste vétérinaire qui est l'unité d'observation élémentaire utilisée en raison de lacunes dans les estimations d'effectifs à cette échelle.

Pour la définition d'une stratégie de lutte, il est important d'avoir également la prévalence de l'infection à l'échelle des élevages. Avant redressement et sans pondération, cette prévalence est estimée à 48,6 %, avec des valeurs extrêmes allant de 0 à 100 % des élevages infectés selon le poste vétérinaire sondé. Il est donc évident que les stratégies de lutte devront être différenciées.

Le redressement des valeurs des taux d'infection des élevages fait appel à d'autres modèles et ne peut pas être obtenu par simple calcul arithmétique. Il ne fait pas l'objet de cette étude.

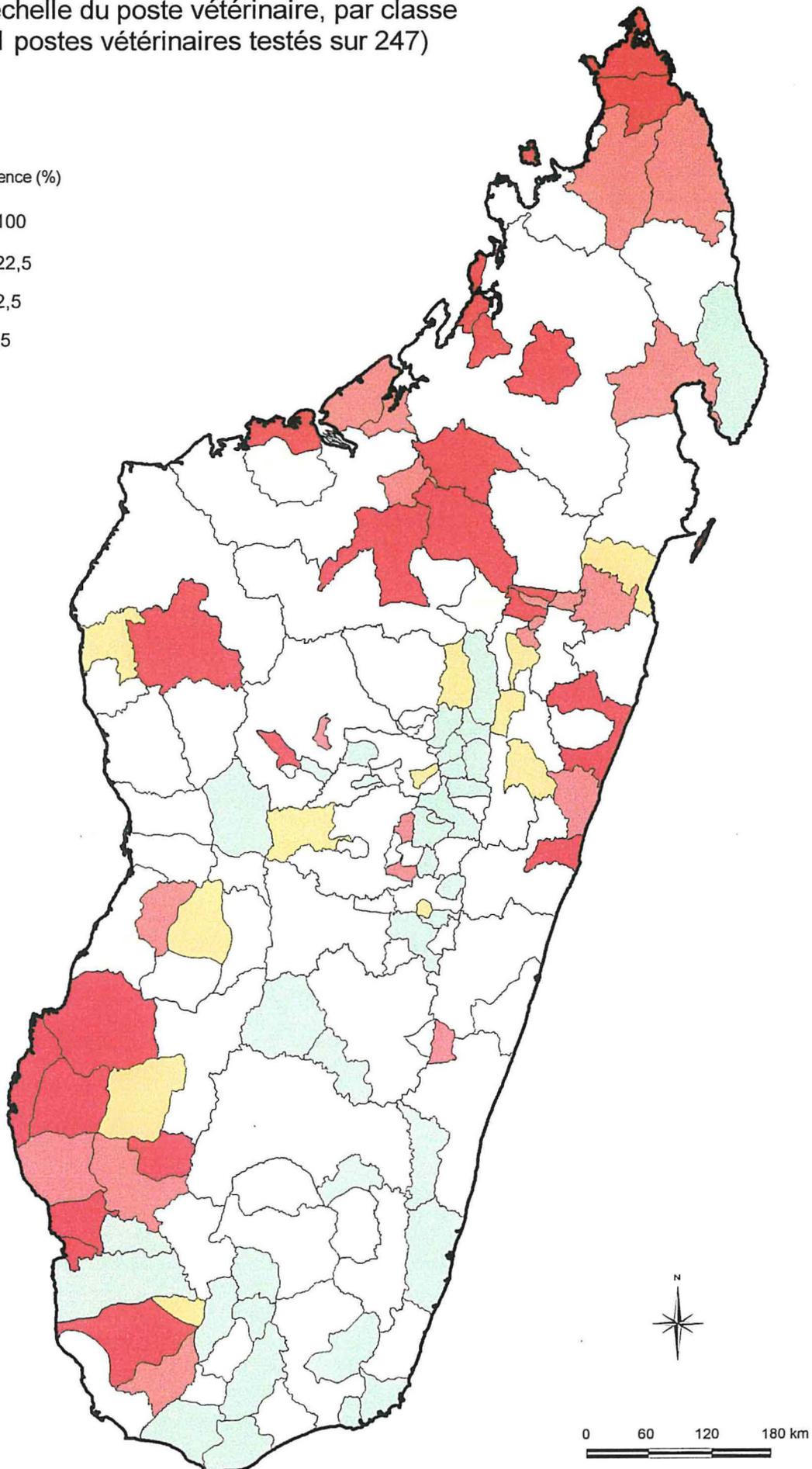
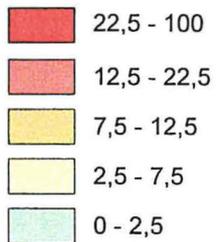
Carte 1 : Prévalence observée de la tuberculose bovine à l'échelle du poste vétérinaire, par classe (111 postes vétérinaires testés sur 247)

classes de prévalence (%)



Carte 2 : Prévalence corrigée de la tuberculose bovine à l'échelle du poste vétérinaire, par classe (111 postes vétérinaires testés sur 247)

classes de prévalence (%)



4. Discussion

La détermination des paramètres de validité interne du test ID a nécessité plusieurs adaptations et une étude en trois phases successives. Au cours de l'étude préliminaire, les animaux auraient dû être abattus dans les deux abattoirs d'exportation. Des problèmes administratifs sont apparus dans l'abattoir localisé dans la région où l'enzootie tuberculeuse est relativement élevée et l'étude a finalement dû être effectuée en totalité dans l'abattoir de la capitale qui draine des régions d'enzootie faible. Par ailleurs, le projet de lutte contre la tuberculose avait pour objectif, entre autres, de former des techniciens de laboratoire aux techniques microbiologiques particulières aux mycobactéries. Ces techniciens ont été entraînés sur les prélèvements de cet échantillon d'animaux.

Il a été mis en évidence lors des résultats des premières cultures des prélèvements un nombre anormalement élevé de mycobactéries du groupe des mycobactéries environnementales, non reliées à une réaction positive à l'ID, qu'elle soit bovine ou aviaire et en l'absence de toute lésion. Les cultures de ces bacilles semblaient apparaître de manière groupée à certaines périodes. De plus, les mycobactéries en cause, présentes souvent en faible nombre, sont apathogènes pour les bovins (*M. flavescens*, *M. vaccae*, *M. mucogenicum*, *M. thermoresistibile*). L'hypothèse d'une contamination externe a été retenue sans pouvoir identifier si l'origine résidait au niveau de la collecte des prélèvements ou au moment de leur mise en culture. Il est connu que ce type de mycobactéries peuvent être hébergées sur le sol, dans l'eau ou le tube digestif des herbivores et sont isolées communément dans des prélèvements [8]. Une contamination de ce type peut donc avoir eu lieu à l'abattoir ou au laboratoire et avoir été multipliée, par défaut de stérilisation des instruments, entre deux ou plusieurs prélèvements successifs. L'argument majeur qui va en faveur d'une contamination est la quasi absence de lésions associées aux infections par les atypiques (1 lésion sur 41 carcasses desquelles ont été isolées des atypiques).

Par conséquent, il a été décidé de reprendre l'étude. La technique de collecte des prélèvements a été revue en essayant d'identifier les sources possibles de contamination (couteaux, plan de travail, technique opératoire). Au niveau du laboratoire, les techniciens étant formés, les cultures suivantes ont été réalisées par une seule personne qui est responsable des cultures effectuées en routine pour le Centre National de Référence des Mycobactéries. Un nouvel échantillon de 100 animaux a été sélectionné pour une seconde phase à partir des animaux destinés à l'abattoir d'exportation de la capitale et un échantillon de 36 animaux a été sélectionné en région de forte enzootie pour la troisième phase.

L'étude préliminaire a toutefois pu être exploitée car les résultats comportant des mycobactéries opportunistes ne changent rien au niveau de la classification par rapport au test (classés en non infectés). La mesure des paramètres n'a cependant été faite que de manière subjective et donne une

valeur de sensibilité très faible. L'intervalle de confiance de cette valeur est très large en raison du faible effectif d'animaux infectés et c'est pourquoi une nouvelle étude était de toute façon bienvenue.

L'étude de référence a permis de mesurer les paramètres sur un échantillon sélectionné en principe dans une région à prévalence faible. Pour améliorer la puissance du calcul de la sensibilité, un autre échantillon provenant d'une région à prévalence élevée a été constitué afin d'augmenter le nombre d'animaux infectés.

Cependant, il s'avère que les animaux sélectionnés dans cette dernière région ne sont pas comparables, par leur statut vis à vis de l'infection tuberculeuse, à ceux sélectionnés par les opérateurs d'abattoirs pour l'exportation. Il est recommandé lors de détermination de la qualité du test ID, de constituer une population d'animaux représentative des différents états de l'infection [6]. Dans ce cas, les animaux destinés à l'exportation sont sélectionnés sur leur bon état général alors que ceux abattus dans la région de forte enzootie le sont pour les éliminer car ils sont présumés malades. Des zébus de chacun des deux échantillons se trouvent dans les divers états de l'infection mais en des proportions très différentes. Comme les paramètres de validité du test sont influencés par des critères biologiques de réponse immunitaire entrant en jeu dans l'HSR, il est légitime de s'attendre à une légère différence de ces paramètres mesurés dans chaque étude. Les deux études n'ont pas été mélangées pour cette raison.

Par ailleurs, pour des raisons pratiques d'accès aux prélèvements d'organes, l'étude a été conduite dans des conditions particulières sur des animaux qui ne représentent pas le cheptel dans son ensemble. S'agissant d'une étude de détermination de paramètres de validité interne d'un test, cette représentativité ne devrait pas être nécessaire car ils ne dépendent que du test en question. Cependant, dans le cas présent, les conditions particulières qui ont été réunies pour pouvoir déterminer les paramètres du test peuvent avoir une influence sur le résultat.

La sélection des animaux est faite dans ceux destinés à l'abattoir afin de pouvoir collecter les prélèvements. Ces animaux peuvent présenter à divers titres des réactions particulières vis à vis de la tuberculine par rapport aux animaux courants du cheptel national, ce qui influe sur les paramètres de validité du test.

- Les études réalisées sur les animaux sélectionnés pour l'exportation concernent des animaux choisis par les opérateurs sur leur aspect « sain » et leur bon état d'embonpoint. Par conséquent, s'ils ont été infectés par *M. bovis* au cours de leur vie, il est assez improbable que cette infection soit au stade de maladie (sans quoi les animaux exprimeraient des symptômes cliniques) ou au stade d'anergie consécutive à une chute de la défense immunitaire de l'organisme (qui concerne des animaux malades dans une phase terminale de la maladie, cachectiques et donc non commercialisables). Certains animaux infectés font pourtant partie de ce lot et peuvent présenter des lésions stabilisées (moyennant quoi ils seront normalement réactifs au test) ou être en voie de guérison de l'infection et donc présenter des lésions stabilisées totalement calcifiées ou de très petite taille ; ce dernier cas peut entraîner une hyporéactivité au test qui sera interprétée comme un défaut de sensibilité. Cependant, la sélection d'animaux destinés à l'abattoir, donc âgés d'au

moins 5 ans dans le contexte malgache, entraîne une augmentation de la probabilité de trouver des animaux infectés. Comme ces animaux ont été choisis sur leur aspect de bonne santé, il est probable de trouver de nombreux animaux présentant des lésions très anciennes qui vont entraîner un défaut de sensibilité alors que la population bovine normale ne présenterait pas cette exagération du nombre d'animaux à lésions anciennes stabilisées et peu actives ou en voie de guérison.

On observe dans l'étude de référence une prévalence de l'infection de 21 % sur les animaux présentés à l'abattoir ce qui semble très élevé compte tenu de la sélection réalisée par les opérateurs. Cependant, seulement un peu plus de la moitié de ces animaux sont détectés par le test (52,4 %) et parmi les animaux non détectés, un pourcentage important se trouve probablement dans le cas qui vient d'être décrit.

- Un second cas de figure peut avoir aussi été sélectionné dans l'étude : il s'agit des animaux non réagissant et ne présentant pas de lésions. Parmi les animaux infectés de l'étude de référence, ce groupe représente 19 % ce qui est très important. Il est probable que ces animaux aient été contaminés lors de la phase d'acheminement à l'abattoir d'une durée d'environ un mois correspondant à l'achat, au rassemblement et au transport. Au cours de cette période, la fatigue a pu faire chuter les défenses immunitaires de certains animaux infectés qui ont à leur tour contaminé d'autres animaux, lesquels n'ont pas eu le temps matériel de développer la réaction allergique. Ces contacts forcés associés au stress du transport ne sont pas représentatifs des conditions normales d'élevage et par conséquent peuvent faire chuter artificiellement la sensibilité du test en surreprésentant ce groupe d'animaux. En effet, si l'incidence de la tuberculose était de cet ordre dans la population courante : 4 animaux contaminés sur 83 sur une période moyenne d'un mois soit 58 cas pour 100 animaux - an, l'ensemble du cheptel serait contaminé en très peu de temps.
- Un troisième cas de figure qui influe sur les paramètres de validité interne du test peut être consécutif à la sélection : comme il est interdit à Madagascar d'abattre des femelles bovines, seuls sont représentés dans cette étude les mâles en général castrés et âgés. Il a été montré que les femelles pouvaient présenter des réactions faussement positives en période de péri et post partum [7], réactions qui ne sont pas détectées dans cette étude. Les tests effectués au cours de dépistage dans la population générale pourront donc souffrir de cette chute prévisible de spécificité. Kleeberg [7] a montré aussi que les mâles castrés récemment pouvaient présenter une anergie temporaire en raison du stress. Ce groupe est peut être surreprésenté dans cette étude et explique une partie des animaux infectés non réagissants. Enfin, il a été montré que chez les jeunes animaux (de 2 à 3 ans), les réactions aux tests peuvent être plus faibles (infection récente) ou exister sans lésions visibles [7]. Ce cas de figure entraînera aussi d'une variation dans les effectifs dépistés par rapport à ceux attendus en fonction des paramètres mesurés sur un échantillon où n'apparaissent pas ces caractéristiques.

- Enfin, un dernier critère lié à la sélection des animaux intervient dans la détermination des paramètres de validité interne du test. L'étude de la sensibilité a été faite en partie en région d'enzootie élevée pour augmenter le nombre d'animaux infectés. En fait, il est apparu que les animaux de la région d'enzootie élevée semblent présenter une meilleure réactivité vis à vis de la tuberculine que ceux destinés à l'exportation. Les paramètres de validité d'un test ne dépendent normalement pas des animaux mais dans ce cas, il s'avère que l'état allergique des deux groupes d'animaux n'est pas comparable et que la sensibilité s'en trouve affectée. Les résultats ne permettent pas de conclure avec certitude sur la supériorité de la sensibilité mesurée sur les animaux en région d'enzootie élevée mais probablement seulement en raison du manque de puissance dû au faible nombre de zébus infectés testés. Les raisons décrites dans le premier paragraphe entraînent une réactivité au test diminuée sur les animaux destinés à l'exportation. En région de forte enzootie, les animaux abattus sont justement ceux qui sont suspectés de maladie et donc présentant une bonne réactivité allergique à la tuberculine. Aucun de ces deux groupes ne représente correctement la population bovine courante de Madagascar, l'un par son état de santé globalement meilleur, l'autre par son état probablement malade mais sans le groupe des animaux cachectiques malades depuis longtemps et anergiques.

Il est donc probable, au vu de tous ces différents critères de sélection d'animaux faisant varier les paramètres soit dans un sens, soit dans l'autre, que les valeurs qui seraient mesurées sur la population courante se situeraient entre les valeurs mesurées sur nos échantillons. Ce n'est qu'après plusieurs années de dépistage, accompagné de mesures de marquage des animaux infectés (au défaut de leur élimination) qu'il serait possible de s'attendre à une amélioration de la sensibilité du test. Celui-ci ne serait jugé que sur des animaux testés régulièrement et dont une réaction témoignerait d'une infection ayant eu lieu entre la réalisation des deux tests à dates connues. Le cheptel malgache présente actuellement un état d'infection trop ancien qui s'accompagne de différents types d'anergies pour qu'il soit possible de s'attendre à une bonne sensibilité.

La discussion de l'étude doit porter aussi sur le diagnostic de référence de l'infection choisi pour cette étude. La culture seule est insuffisante car de véritables lésions tuberculeuses anciennes calcifiées en voie de guérison peuvent rester stériles alors qu'elles hébergent encore des bacilles. L'histopathologie permet de confirmer la nature tuberculeuse de certaines lésions mais ne permet pas de déterminer la nature du bacille en cause. Le choix de qualifier « infectés » les animaux présentant une lésion de type tuberculeuse mais restée stérile peut augmenter artificiellement le nombre d'infections à *M. bovis* alors que les germes en cause étaient des bacilles d'une espèce différente. La détermination de l'espèce par technique PCR aurait pu être réalisée en complément mais les réactifs n'étaient pas disponibles au moment de l'étude. Cette technique aurait pu donner avec une certitude presque absolue la nature du bacille en cause. Elle aurait par ailleurs pu être utilisée aussi sur les prélèvements produisant des cultures de mycobactéries atypiques ou environnementales qui peuvent aussi renfermer *M. bovis* et qui

présentent la particularité de pousser plus vite et de masquer la présence de *M. bovis*. Le diagnostic négatif effectué serait alors erroné, ce qui dans l'étude pourrait conduire à une sous estimation du nombre d'animaux infectés.

La sensibilité mesurée dans l'étude est plus faible que celles relatées dans d'autres études [3,4] mais ceci s'explique en partie par l'ancienneté des infections particulière aux conditions malgaches. Ce critère est cité dans d'autres travaux comme étant un facteur réduisant la sensibilité [6,7]. Aussi, il n'est pas étonnant de trouver une sensibilité aussi faible et il est recommandé d'utiliser dans la pratique la valeur correspondant aux données produites sur l'échantillon de référence, soit $Se = 0,524$. Cette valeur est obtenue suite à l'injection simultanée de deux doses de tuberculine bovine et d'une dose de tuberculine aviaire sur le même animal, pratique qui a tendance à augmenter un peu la réactivité aux tests. Comme il s'agit d'un échantillon particulier d'animaux en bonne santé, même cette dose supplémentaire n'a pas contribué à produire une bonne sensibilité. Cependant, il est supposé que les animaux courants sont en moyenne plus réactifs que ceux-ci et que cette valeur, bien que légèrement surestimée, soit une valeur minimale rencontrée.

La sensibilité du test mesurée par la technique objective donne une valeur inférieure à celle obtenue par la méthode subjective aux seuils préconisés dans les textes européens (4mm). Une sensibilité du même ordre, soit encore très faible, ne serait obtenue qu'avec des valeurs seuils incompatibles avec une bonne spécificité et trop sujette aux erreurs de mesures (seuils inférieurs à 1,5 mm pour la tuberculine Solvay et inférieur à 1 mm pour la tuberculine Imvavet).

Pour l'étude réalisée en zone de forte enzootie, il semble cependant que la sensibilité soit relativement bonne (entre 0,7 et 0,8 pour un seuil voisin des recommandations européennes (entre 3 et 4 mm). Cependant, le faible nombre de valeurs utilisées pour établir la courbe d'une part et les caractéristiques particulières de l'échantillon d'autre part ne permettent pas de penser que ces valeurs puissent être généralisées lors d'une opération de dépistage sur l'ensemble du cheptel malgache. Il faut remarquer toutefois que la technique subjective et objective arrivent à une sensibilité comparable pour un seuil de mesure proche des recommandations réglementaires et que dans ce cas particulier, la sensibilité est voisine de celles relatées dans d'autres études. Il pourrait être intéressant de compléter cette étude pour augmenter la puissance mais elle resterait toujours difficile à extrapoler dans les conditions courantes.

La conclusion à tirer de l'étude est qu'il est recommandé d'utiliser dans la pratique le test avec la lecture subjective et après avoir formé les gens à la reconnaissance des symptômes annexes qui sont primordiaux. Le cas « douteux » tel qu'il est défini dans la réglementation doit être considéré comme positif. En effet, cette attitude utilisée dans l'étude en raison de l'ancienneté des infections qui entraîne une hyporéactivité au test ID, n'a généré qu'un très faible nombre de faux positifs et une très bonne valeur de spécificité.

L'un des moyens d'augmenter la réactivité des animaux serait d'utiliser une tuberculine plus concentrée (tuberculine forte titrant 100.000 UI/ml, soit cinq fois plus que celle qui a été utilisée).

Cette tuberculine présente l'inconvénient de ne pas être produite sur place et de rendre les campagnes de dépistage beaucoup plus coûteuses. Elle pourrait aussi augmenter le nombre de réactions non spécifiques mais compte tenu des conditions de terrain et de leur implication en termes économiques, cette préoccupation n'est pas majeure. L'utilisation de cette tuberculine serait le seul moyen pratique d'augmenter la sensibilité du test.

Il faut cependant revenir sur les objectifs poursuivis par les Services Vétérinaires. La stratégie dans un premier temps ne sera pas de détecter tous les animaux infectés avec une bonne sensibilité mais elle sera plutôt d'établir une carte de l'infection par troupeaux avec une connaissance assez bonne de la prévalence d'infection des animaux au sein des troupeaux. Ce n'est qu'à partir de ces données que pourra être définie la stratégie de lutte à employer en fonction de critères épidémiologiques, économiques et surtout sociaux dans certaines régions où la pratique de l'élevage possède une importance dans la culture traditionnelle et coutumière qui dépasse largement les aspects purement économiques.

Aussi, la sensibilité du test ID, utilisé pour le dépistage de troupeaux infectés, peut être améliorée par la réalisation de tests sur plusieurs ou de préférence tous les animaux du troupeau. Il restera à définir quel seuil de nombre d'animaux réagissants sera retenu pour déclarer un troupeau infecté. Dans la pratique et compte tenu de la bonne spécificité du test, un seul animal réagissant serait suffisant pour déclarer un troupeau infecté dans les régions de forte enzootie. Dans le cas le plus courant où le nombre d'animaux par élevage est faible, et surtout dans les régions de prévalence d'infection faible, il est probable qu'un certain nombre d'élevages ne soient pas détectés ou détectés à tort. C'est cet argument qui nous empêche de corriger les valeurs estimées de la prévalence à l'échelle de l'élevage.

Comme dans un premier temps le dépistage à grande échelle par réalisation de tests ID n'est pas prévu ni par une enquête transversale exhaustive, ni en routine, les Services Vétérinaires disposent d'un autre outil bien plus performant et immédiatement opérationnel pour la déclaration d'infection dans un élevage : il s'agit de l'observation de lésions à l'abattoir. Cet examen qui a pu être testé par la même étude s'est révélé être très intéressant. Sa sensibilité et sa spécificité sont très bonnes et permettent à moindre coût de commencer à établir la cartographie de l'infection sur le territoire. Il faut cependant pour cela être certain de l'origine des animaux abattus et adopter un système d'identification des élevages, principalement lors de déplacements ou de commercialisation d'animaux. En l'absence de mesures de lutte appliquées dans les troupeaux contre la maladie, il est peu probable que les données accumulées au fil des mois ne changent et la carte de l'infection sera en partie établie par compilation des données d'abattoir.

L'étude a permis aussi de montrer que l'infection par les mycobactéries environnementales et atypiques ne semble pas être un facteur préoccupant à Madagascar. Dans la première étude, un nombre important de mycobactéries opportunistes a été mis en évidence mais tout indique qu'il s'agissait en

grande partie d'un faible nombre de cas qui aurait été amplifié soit à l'abattoir, soit au laboratoire par contaminations croisées. Ces cas n'étaient reliés ni à des lésions, ni même à des réactions au test ID.

Dans l'ensemble des études, y compris celles réalisées sur des animaux réagissant positivement au test, seuls 5 sur 145 lésions ont donné lieu à une identification de mycobactérie atypique et seules 4 d'entre elles ont été faites sur des animaux réagissant au test. Ce nombre est faible, d'autant plus que les bacilles isolés ne donnent pas une garantie absolue quant à l'absence de *M. bovis* dans le même prélèvement, en raison de sa croissance beaucoup plus lente.

La technique de l'IDC semble dénuée de tout intérêt dans un premier temps.

La première utilisation de la détermination de la validité interne du test ID est le redressement des valeurs de prévalence observées lors de l'enquête transversale réalisée par sondage dans le pays. Il apparaît donc à la lumière de ce redressement que l'infection est beaucoup plus importante qu'elle ne paraissait au vu des premiers chiffres. Cependant, comme il a été utilisé une valeur de sensibilité considérée comme minimale, le redressement des valeurs de prévalence où la sensibilité intervient au dénominateur s'en trouve maximalisé. Les données obtenues après redressement peuvent donc être considérées comme les valeurs maximales auxquelles on peut s'attendre.

Dans tous les cas, l'infection est très importante dans certaines régions, particulièrement dans celles où l'élevage suit des règles coutumières. Il sera par conséquent difficile d'y entreprendre des mesures aussi draconiennes que le dépistage suivi de l'élimination pure et simple des animaux, qu'elle soit accompagnée d'indemnisation ou non. Comme de plus, il est peu probable qu'un fonds d'indemnisation puisse être créé et réalimenté, la stratégie classique de dépistage-élimination, qui a donné d'excellents résultats dans les pays industrialisés, ne pourra pas être mise en œuvre dans les régions où elle se justifie le plus. Aussi, des méthodes alternatives comme le recours à la vaccination³ se justifient dans l'objectif de réduire les taux d'infection à des valeurs compatibles avec une élimination des réagissants. Les valeurs de la prévalence réelle de l'infection pourront être utilisées avantageusement pour effectuer des calculs économiques et déterminer quelles sont les options à retenir en fonction du gain économique et social espéré.

La conclusion d'ensemble de l'étude fait appel à la modestie et souligne qu'après plus d'un siècle, le constat de Bang reste toujours d'actualité :

« The tuberculin test is no more perfect than most things in this world. Sometimes it fails, but it would be the greatest folly to reject this method because it is not able to give everything we desire. »

Bang (1892) [17]

³ La vaccination des bovins n'est pas utilisée en prophylaxie en raison de la sensibilisation aux tests ID ; elle est envisagée à titre expérimental

5. Références

1. Blancou J, Rakotoniaina P, Cheneau Y. Types de bacilles tuberculeux chez l'homme et l'animal à Madagascar. *Arch Inst Pasteur Madag*. 1974, **43** (1) : 31-8.
2. Rasolofo-Razanamparany V, Ménard D, Rasolonaivalona T, Ramarokoto H, Rakotomanana F, Aurégan G *et al*. Prevalence of *Mycobacterium bovis* in human pulmonary and extra pulmonary tuberculosis in Madagascar. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1999, **3** (7) : 632-4.
3. Blancou J, Rorhbach C, Perdrix A, Choquel P, Rosner G. La tuberculose bovine à Madagascar. *Revue Elev Med vet Pays trop*. 1971, **24** (4) : 507-17.
4. Francis J, Seiler RJ, Wilkie IW, O'Boyle D, Lumsden MJ, Frost AJ. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. *Vet Rec*. 1978, **103** (19) : 420-5.
5. Monaghan ML, Doherty ML, Collins JD, Kazda JF, Quinn PJ. The tuberculin test. *Vet Microbiol*. 1994, **40** (1-2) : 111-24.
6. Benet JJ. Qualité des tests, application à un exemple : la tuberculose bovine. *Epidémiol santé anim*. 1990, **17** : 41-56.
7. Kleeberg HH. The tuberculin test in cattle. *J S Afr Vet Med Assoc*. 1960, **31** (2) : 213-25.
8. Worthington RW. Mycobacterial PPD sensitins and the non-specific reactor problem. *Onderstepoort J Vet Res*. 1967, **34** (2) : 345-438.
9. Euzéby JP. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature. <http://www-sv.cict.fr/bacterio/m/mycobacterium.html>. Update July 01, 1999.
10. Francis J. *Tuberculosis in animals and man : a study in comparative pathology*. London : Cassell, 1958. 357p.
11. Lepper AWD, Pearson CW, Corner LA. Anergy to tuberculin in beef cattle. *Aust vet J*. 1977, **53** (5) : 214-6.

12. Journal officiel des Communautés européennes. Directive 80/219/EEC. Bruxelles : CEE, 1980. N° L 47/25-32.
13. Lepper AWD, Newton-Tabrett DA, Corner LA, Carpenter MT, Scanlan WA, Williams OJ *et al.* The use of bovine PPD tuberculin in the single caudal fold test to detect tuberculosis in beef cattle. *Aust vet J.* 1977, **53** (5) : 208-13.
14. Grange JM, Malcolm DY. Guidelines for speciation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Geneva : WHO, Veterinary Public Health Unit, 1994, (WHO/Zoon./94.174).
15. Rogan, Gladen. *In* : Jenicek M, Cléroux R. *Epidémiologie. Principes, techniques, applications.* Paris : Maloine, 1987. p 163.
16. Grenier B. *Evaluation de la décision médicale ; introduction à l'analyse médico-économique.* 2^e édition. Paris : Masson, 1996. pp 269-88.
17. Bang B. *In* : Francis J. *Bovine Tuberculosis, Including a Contrast with Human Tuberculosis.* London : Staples Press, 1978. 220 p.