



Procédure de l'OMSA pour l'enregistrement des kits de diagnostic Résumé des études de validation

Nom du kit de diagnostic : BOVIGAM® – Kit de test de l'interféron gamma de *Mycobacterium bovis* pour les bovins

Fabricant : Prionics Lelystad B.V.

Numéro d'approbation de l'OMSA : 20150110

Date d'enregistrement : mai 2015

Numéro de la nouvelle procédure/approbation : 051319

Date d'enregistrement de l'extension de son utilisation : mai 2023

Maladie : tuberculose bovine

Agent pathogène : *Mycobacterium bovis* et d'autres mycobactéries appartenant au complexe tuberculosis (par ex. *M. caprae*)

Type d'épreuve : ELISA indirecte

Objectifs du test : Pour la détection d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire à l'infection par *Mycobacterium bovis* et par d'autres mycobactéries appartenant au complexe tuberculosis par l'analyse d'échantillons de sang entier chez les bovins, le buffle (*Syncerus caffer*), les caprins, le buffle d'eau (*Bubalus bubalis*) et les ovins (usage assigné provisoire), pour les emplois suivants :

1. Absence historique d'infection
2. Recouvrement du statut indemne après la survenue d'un foyer
3. Certifier l'absence de l'infection ou de l'agent pathogène chez un animal ou une marchandise dans le cadre d'échanges ou de mouvements internationaux
4. Éradication de l'infection au sein de populations déterminées
5. Réaliser un diagnostic de confirmation des cas suspects ou cliniques (y compris la confirmation des résultats trouvés positifs lors d'un test de dépistage) ;
6. Estimer la prévalence de l'infection, afin de faciliter l'analyse du risque (enquêtes/programmes sanitaires à l'échelle des troupeaux/lutte contre les maladies) ;
7. Réaliser un test supplémentaire dans le cadre de l'éradication de la tuberculose.

Espèce et type d'échantillons : Bovins, buffle (*Syncerus caffer*), caprins, buffle d'eau (*Bubalus bubalis*) et ovins (usage assigné provisoire) – test sanguin *in vitro* effectué au laboratoire.

Le test a également été validé pour la détection de l'IFN γ dans le plasma obtenu à partir d'échantillons sanguins stimulés prélevés de buffles d'eau (*Bubalus bubalis*) suspects. Demande d'extension au buffle d'eau (*Bubalus bubalis*) de l'emploi du test BOVIGAM® - kit de dosage de l'interféron gamma pour la détection de *Mycobacterium bovis* chez les bovins, ci-après dénommé BOVIGAM, enregistrée auprès de l'OMSA (numéro d'agrément : 20150110) et présentée en 2021.

Ce résumé mis à jour présente les données pertinentes obtenues avec des échantillons prélevés du buffle d'eau (*Bubalus bubalis*) étayant les critères de performances diagnostiques du test pour valider l'emploi chez cette espèce, en conformité avec les lignes directrices de l'OMSA.

1. Informations sur le kit

Veillez consulter la notice du kit disponible sur la page Web du Registre de l'OMSA ou contactez le fabricant à l'adresse suivante :

Site Web : thermofisher.com

Courriel : info.nl.prionics@thermofisher.com

2. Résumé des études de validation

Critères de performance analytiques

Sensibilité analytique

Le test BOVIGAM est paramétré pour détecter 80 pg/ml d'IFN- γ recombinant bovin.

Stimulation du sang entier : La sensibilité analytique de l'étape de stimulation ne peut être évaluée car la limite de détection dépend du statut de l'animal testé au regard de la tuberculose bovine. Des échantillons de 1,5 ml à 250 μ l provenant du sang entier principal ont été testés et validés pour le diagnostic de la tuberculose bovine. L'effet du nombre de lymphocytes sur la fiabilité et la limite de détection n'est pas connu. Le nombre de lymphocytes peut varier d'un bovin à l'autre. Le nombre minimum requis pour un résultat fiable n'a pas été défini.

Spécificité analytique

Les IFN- γ , α et β bovins recombinants ont été analysés avec le test BOVIGAM à des concentrations actives de 1 ng/ml, 10 ng/ml et 1 000 ng/ml, respectivement. Le test BOVIGAM n'a pas détecté les échantillons d'IFN- α et β . Les réactions obtenues avec des échantillons de sang entier stimulés par la mise en présence des dérivés protéiques purifiés (PPD) de la tuberculine de *Mycobacterium bovis* (PPDB) et de la tuberculine de *Mycobacterium avium* (PPDA), issus de bovins infectés par *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. pinnipedi*, *M. caprae*, qui tous appartiennent au complexe tuberculosis, constituent des résultats vrais positifs en BOVIGAM et ne sont ni des réactions croisées ni des faux positifs.

Données de répétabilité :

Données sur la répétabilité au sein d'un même cycle d'essai, 1 (2015) :

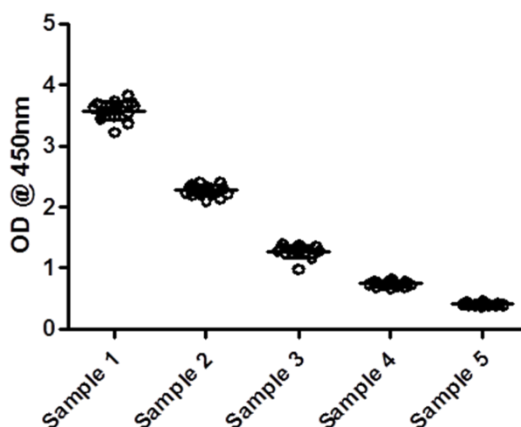
Objectif : Démontrer que les variations entre puits lors de la réalisation du test ELISA BOVIGAM sont minimales.

Méthodes : La répétabilité au sein d'un même cycle d'essai du test ELISA BOVIGAM a été estimée en analysant 5 concentrations différentes de l'IFN- γ recombinant bovin dans 16 copies, avec un seul lot du kit (lot numéro 633261701). La concentration de l'analyte dans chaque échantillon d'IFN- γ était comprise dans la plage de fonctionnement de l'essai.

Résultats : La Figure 1 montre la lecture des densités optiques obtenues sur les 16 réplicats, pour chacune des cinq concentrations de l'IFN- γ recombinant bovin. Les lignes horizontales et les barres d'erreur représentent respectivement la moyenne et l'écart-type. Comme le montre le Tableau 1, le coefficient de variation est inférieur à 10 % pour les cinq échantillons.

Conclusions : Le test ELISA BOVIGAM présente une excellente répétabilité d'un puits à l'autre pour la détection de l'IFN- γ bovin à différentes concentrations dans toute la plage de fonctionnement de l'essai.

Figure 1 :



Données sur la répétabilité au sein d'un même cycle d'essai . 2 (2021) :

Objectif : Démontrer que les variations entre puits lors de la réalisation du test ELISA BOVIGAM sont minimales avec des échantillons issus du buffle d'eau (*Bubalus bubalis*).

Méthodes : La répétabilité a été évaluée au moyen de 4 échantillons de plasma sélectionnés à partir d'un panel de 3 échantillons de terrain provenant d'animaux différents et couvrant la plage de fonctionnement de l'essai, classés respectivement comme fortement positif, moyennement positif et faiblement positif, puis un quatrième échantillon de terrain reconnu négatif ; chaque échantillon a été testé en triplicat ; la variation intra-cycle a été évaluée sur la base de l'analyse des trois copies de chaque échantillon lors d'un seul cycle d'essai, conduit par le même opérateur.

Résultats : L'expérience a été réalisée par stimulation des échantillons avec le PBS, les PPDA et les PPDB.

Stimulation avec le PBS :

Échantillon	Opérateur	Jour	Nombre d'observations	Moyenne des DO	% CV
Échantillon 1	Opérateur 1	J 1	4	0,051	2,773
		J 2	4	0,058	3,539
		J 3	4	0,057	5,165
	Opérateur 2	J 1	4	0,055	4,855
		J 2	4	0,053	1,541
		J 3	4	0,059	4,523
Échantillon 2	Opérateur 1	J 1	4	0,045	1,297
		J 2	4	0,049	3,844
		J 3	4	0,053	6,715
	Opérateur 2	J 1	4	0,044	4,402
		J 2	4	0,049	1,944
		J 3	4	0,052	1,850
Échantillon 3	Opérateur 1	J 1	4	0,069	3,225
		J 2	4	0,077	3,353
		J 3	4	0,084	3,972

Échantillon	Opérateur	Jour	Nombre d'observations	Moyenne des DO	% CV
	Opérateur 2	J 1	4	0,069	1,393
		J 2	4	0,074	8,049
		J 3	4	0,091	3,836
Échantillon 4	Opérateur 1	J 1	4	0,040	6,027
		J 2	4	0,041	7,180
		J 3	4	0,041	3,050
	Opérateur 2	J 1	4	0,039	5,252
		J 2	4	0,043	7,316
		J 3	4	0,044	8,089

Stimulation avec la PPD bovine

Échantillon	Opérateur	Jour	Nombre d'observations	Moyenne des DO	% CV
Échantillon 1	Opérateur 1	J 1	4	0,073	1,118
		J 2	4	0,092	3,733
		J 3	4	0,081	1,558
	Opérateur 2	J 1	4	0,073	0,687
		J 2	4	0,087	2,816
		J 3	4	0,095	1,328
Échantillon 2	Opérateur 1	J 1	4	0,239	0,714
		J 2	4	0,229	0,549
		J 3	4	0,231	0,903
	Opérateur 2	J 1	4	0,235	1,120
		J 2	4	0,231	0,740
		J 3	4	0,234	0,642
Échantillon 3	Opérateur 1	J 1	4	1,121	0,263
		J 2	4	1,122	0,223
		J 3	4	1,118	0,231
	Opérateur 2	J 1	4	1,109	0,725
		J 2	4	1,117	0,267
		J 3	4	1,107	0,585
Échantillon 4	Opérateur 1	J 1	4	3,210	0,256
		J 2	4	3,227	0,882
		J 3	4	3,228	0,399
	Opérateur 2	J 1	4	3,210	0,275
		J 2	4	3,228	0,456
		J 3	4	3,218	0,222

Stimulation avec la PPD aviaire :

Échantillon	Opérateur	Jour	Nombre d'observations	Moyenne des DO	% CV
Échantillon 1	Opérateur 1	J 1	4	0,084	2,572
		J 2	4	0,084	2,632
		J 3	4	0,100	2,160
	Opérateur 2	J 1	4	0,098	2,961
		J 2	4	0,105	2,333
		J 3	4	0,121	2,338
Échantillon 2	Opérateur 1	J 1	4	0,102	2,531
		J 2	4	0,090	1,442
		J 3	4	0,091	2,374
	Opérateur 2	J 1	4	0,097	2,280
		J 2	4	0,091	1,427
		J 3	4	0,092	1,411
Échantillon 3	Opérateur 1	J 1	4	0,720	0,593
		J 2	4	0,708	0,960
		J 3	4	0,729	0,453
	Opérateur 2	J 1	4	0,718	0,927
		J 2	4	0,713	0,380
		J 3	4	0,719	0,309
Échantillon 4	Opérateur 1	J 1	4	0,999	1,193
		J 2	4	1,001	1,756
		J 3	4	0,988	0,486
	Opérateur 2	J 1	4	0,990	1,610
		J 2	4	1,002	1,019
		J 3	4	1,010	2,454

Tous les coefficients de variation observés après l'essai, exprimés en pourcentage (% CV) dans les tableaux ci-dessus étaient inférieurs à 10 %.

Conclusions : Le test ELISA BOVIGAM présente une excellente répétabilité d'un puits à l'autre pour la détection de l'IFN- γ bovin à différentes concentrations se situant dans la plage de fonctionnement de l'essai dans des échantillons de plasma stimulé issus de buffles d'eau (*Bubalus bubalis*).

Données sur la répétabilité inter-cycles de l'essai, 1 (2015) :

Objectif : Démontrer que les variations d'un cycle à l'autre sont minimales lors de la réalisation du test ELISA BOVIGAM.

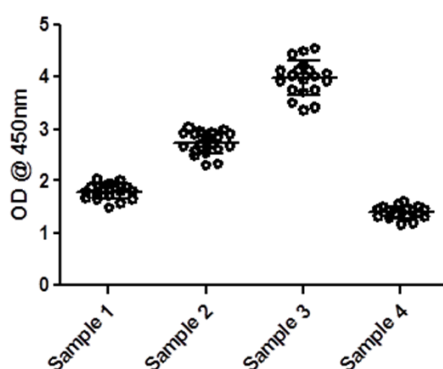
Méthodes : Quatre échantillons de fractions aliquotes du surnageant de culture de sang entier ont été stockés à -80 °C. La stimulation des échantillons 1, 2, 3 et 4 de sang entier bovin a été réalisée avec les antigènes suivants : dérivés protéiques purifiés de la tuberculine aviaire (PPD-A), entérotoxine staphylococcique B (SEB), cocktail peptidique : protéine cible antigénique à sécrétion précoce 6kD (ESAT-6)/filtrat de protéine de culture 10 kD (CFP-10), et cocktail peptidique Rv3615c, respectivement. Les échantillons ont ensuite servi à évaluer la répétabilité d'un cycle à l'autre de l'ELISA

BOVIGAM. Chaque échantillon a été testé en triplicat lors de 19 cycles au total, effectués à cinq dates différentes par deux opérateurs différents.

Résultats : La Figure 2 montre la lecture des densités optiques obtenues avec les quatre surnageants de culture de sang entier bovin analysés lors des 19 cycles. Les lignes horizontales et les barres d'erreur représentent respectivement la moyenne et l'écart-type. Comme le précise le Tableau 2, le coefficient de variation est inférieur à 10 % pour les quatre échantillons.

Conclusions : L'ELISA BOVIGAM présente une excellente répétabilité inter-cycles pour la détection de l'IFN-γ bovin dans les surnageants d'échantillons de sang entier bovin.

Figure 2. Les variations d'un cycle à l'autre sont minimales lors de la réalisation de l'ELISA BOVIGAM.



Variance de répétabilité de la stimulation du sang entier chez des bovins ayant réagi à la tuberculine : la variation des valeurs à des dates différentes est inférieure à 20 %.

Variance de répétabilité avec des échantillons de sang entier stimulé au pokeweed : La variation des valeurs entre dates différentes est inférieure à 6 %.

Données sur la répétabilité inter-cycles de l'essai, 2 (2021) :

Objectif : Démontrer que les variations inter-essais sont minimales lors de la réalisation du test ELISA BOVIGAM avec des échantillons issus de buffles d'eau (*Bubalus bubalis*).

Méthodes : La répétabilité a été évaluée en utilisant 4 échantillons de plasma, dont un panel de 3 échantillons de terrain provenant d'animaux différents couvrant la plage de fonctionnement de l'essai, classés respectivement comme fortement positif, moyennement positif et faiblement positif, et un quatrième échantillon de terrain reconnu négatif ; chaque échantillon a été analysé trois fois ; la variation inter-essais a été évaluée en comparant les résultats obtenus par les deux opérateurs ayant analysé le panel d'échantillons (trois fois chacun) sur les trois jours.

Résultats : L'expérience a été réalisée par stimulation des échantillons avec le PBS, les PPDA et les PPDB.

Stimulation avec le PBS :

Échantillon	Nombre d'observations	Moyenne	% CV
Échantillon 1	24	0,055	6,229
Échantillon 2	24	0,049	8,127
Échantillon 3	24	0,077	11,428
Échantillon 4	24	0,041	7,013

Stimulation avec la PPD bovine, inter-essais

Échantillon	Nombre d'observations	Moyenne	% CV
Échantillon 1	24	0,083	10,648
Échantillon 2	24	0,233	1,638
Échantillon 3	24	1,116	0,641
Échantillon 4	24	3,220	0,486

Stimulation avec le PPD aviaire, inter-essais

Échantillon	Nombre d'observations	Moyenne	% CV
Échantillon 1	24	0,099	13,321
Échantillon 2	24	0,094	5,221
Échantillon 3	24	0,718	1,089
Échantillon 4	24	0,998	1,574

Tous les CV observés étaient inférieurs à 15 %.

Conclusion : Le test ELISA BOVIGAM présente une excellente répétabilité inter-essais pour la détection de l'IFN- γ bovin à différentes concentrations se situant dans la plage de fonctionnement de l'essai dans des échantillons de plasma stimulé provenant de buffles d'eau (*Bubalus bubalis*).

Caractéristiques diagnostiques

Détermination des seuils :

Chaque pays doit déterminer son propre seuil de détection unique en fonction de la situation de la tuberculose bovine dans la population bovine du pays.

Estimations de la sensibilité diagnostique (SeD) et de la spécificité diagnostique (SpD)

BOVIGAM		Espèces cibles				Buffle d'eau (<i>Bubalus bubalis</i>)
		Bovins	Buffle (<i>Syncerus caffer</i>)	Caprins	Ovins	
Sensibilité diagnostique*1 (méthodes statistiques classiques avec des PPD)	N SeD IC	8 879 84,6 % (IC à 95 % = 73,0-95,5 %)	2 514 81,6-91,9 %	472 58-100 %	4 100 %	458 94,7 % (IC à 95 % = 92,3- 96,5 %)
Spécificité diagnostique*2 (méthodes statistiques classiques avec des PPD)	N SpD IC	10 966 97,4 % (IC à 95 % = 87,5-99,6 %)	608 86,2-99,4 %	140 96-100 %	3 100 %	489 98,5 % (IC à 95 % = 98,5- 96,9 %)

BOVIGAM		Espèces cibles				Buffle d'eau (<i>Bubalus bubalis</i>)
		Bovins	Buffle (<i>Syncerus caffer</i>)	Caprins	Ovins	
Sensibilité diagnostique*3 (analyse bayésienne avec des PPD)	N SeD IC	4 937 33,9-68,8 % ⁺ n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Spécificité diagnostique*3 (analyse bayésienne avec des PPD)	N SpD IC	4 937 87,9-99,8 % ⁺ n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Sensibilité diagnostique*5 (Esat-6/CFP10)	N SeD IC	771 52,2 %-85 % n.a. [§]	n.a.	n.a.	4 100 % n.a.	n.a.
Spécificité diagnostique* (Esat-6/CFP10)	N SpD IC	2 039 94 %-98,9 % n.a. [§]	n.a.	n.a.	3 100 % n.a.	n.a.

* Plusieurs seuils peuvent s'appliquer ; § Les estimations de la spécificité et de la sensibilité provenant de plusieurs études, l'IC à 95 % ne peut être indiqué ici ; ⁺Suivant l'hypothèse du test

*1-2 bovins → Les valeurs seuils suivantes ont été appliquées pour ces estimations

Critère n°	Critère
Critère 1 :	BOD_COD > 0 et BOD_AOD > 0 ;
Critère 2 :	BOD/COD > 1,25 et BOD_AOD > 0 ;
Critère 3 :	BOD/COD > 1,5 et BOD_AOD > 0 ;
Critère 4 :	BOD_COD P0,05 et BOD_AOD > 0 ;
Critère 5 :	Si BOD = 0,1, alors BOD/COD > 1,5 et BOD_AOD > 0, Si BOD > 0,1, alors BOD_COD > 0,05 et BOD_AOD > 0 ;
Critère 6 :	BOD_AODP0,1 ;
Critère 7 :	BOD_COD P0,1 et BOD/AODP 1,8 ;
Critère 8 :	BOD_COD P0,1 et BOD/AODP 1,25 ;
Critère 9 :	BOD/AOD P1,8 ;
Critère 10 :	BOD_COD P0,05 et BOD/AOD P 1,8 ("critère 4 si BOD/AOD P1,0") ;
Critère 11 :	BOVIGAM : BOD_COD P0,1 et BOD_AOD > 0 ;
Critère 12 :	BOD_COD P2(COD) et BOD_AOD P0,05 ;
Critère 13 :	BOD_COD P0,1 et BOD_AOD P 0,1 ;
Critère 14 :	BOD_AOD P0,04.

- **BOD** : Valeur moyenne de densité optique du plasma de sang stimulé par la PPD bovine.
- **AOD** : Valeur moyenne de densité optique du plasma de sang stimulé par la PPD aviaire.
- **COD** : Valeur moyenne de densité optique du plasma de sang incubé dans un tampon phosphate salin (témoin de contrôle sans antigène [« zéro »]).

*1-2 buffles → Les valeurs seuils suivantes ont été appliquées pour ces estimations

Critère n°	Critère
Critère C1 :	BOD-AOD P0,05 et BOD-AOD > 0 ;

Critère C4 :	Les valeurs de DObovin < 0,385 sont interprétées comme un test négatif ; les valeurs de DObovin ≥ 0,385 sont interprétées comme un test positif
Critère 5 :	Si ODbovin – ODaviaire > 0,20 et si ODfortuitum – ODzéro < 0,15, sous réserve que ODzéro < 0,25. Lorsque ODfortuitum – ODzéro > 0,15 le buffle est classé comme étant multiréacteur (MR)

*1-2 caprins → Les valeurs seuils suivantes ont été appliquées pour ces estimations

Critère n°	Critère
Critère C2 :	Essai IFN-γ. Interprétation standard : caprin positif si la DO PPD bovine moins la DO de l'échantillon sans antigène OD P0,1 et si la DO PPD bovine > DO PPD aviaire. Interprétation stricte : caprin positif si la DO PPD bovine moins la DO de l'échantillon sans antigène OD P0,05 et si la DO PPD bovine > DO PPD aviaire.

*1-2 bovins → Les valeurs seuils suivantes ont été appliquées pour ces estimations

Critère n°	Critère
Critère C3 :	Index de DO (IDO): ratio entre les DO mesurées dans les cultures stimulées et les DO mesurées dans les cultures de contrôle. Un IDO > 2 est considéré comme positif.

*3-4 bovins, analyse bayésienne → pas de valeur seuil car il s'agit d'une analyse bayésienne ; pour plus de détails, voir : Tracy A. Clegg, Anthony Duignan, Clare Whelan, Eamonn Gormley, Margaret Good, John Clarke, Nils Toft, Simon J. More. Using latent class analysis to estimate the test characteristics of the γ-interferon test, the single intradermal comparative tuberculin test and a multiplex immunoassay under Irish conditions. *Veterinary Microbiology*, 151 (2011) : 68–76.

*5-6 bovins, ESAT-6/CFP-10 → Les valeurs seuils suivantes ont été appliquées pour ces estimations

Critère n°	Critère
Critère 1 :	ESAT-6/CFP-10 > 0,1
Critère 2 :	PPDB-PPDA > 0,1 et PPDB – contrôle sans antigène > 0,1
Critère 3 :	PPDB-PPDA > 0,1 et ESAT-6/CFP-10 > 0,1 (étude de confirmation)
Critère 4 :	BPPD - PBS ≥ 0,05 et BPPD > APPD
Critère 5 :	Contrôle positif Prionics – contrôle d'extraction – contrôle sans antigène > 0,1 (étude de confirmation)

*5-6 ovins, ESAT-6/CFP-10 → Les valeurs seuils suivantes ont été appliquées pour ces estimations

Critère n°	Critère
Critère C3 :	Un IDO > 2 est considéré comme positif.

Performances comparatives, 1 (2015)

	Sensibilité diagnostique	Spécificité diagnostique
Test cutané – CCT	80 %*	96,8 %*
Test cutané CFT/SCT	84 %*	99,50 %*

Performances comparatives, 2 (2021), chez le buffle d'eau (*Bubalus bubalis*)

L'étude comparative a été effectuée à l'aide de 489 échantillons positifs au test intradermique comparatif simple de la tuberculine cervicale (SICCT) et au test BOVIGAM.

Test	Sensibilité diagnostique
SICCT	88,3 %
BOVIGAM	94,7 %

Concordance et divergences

Une concordance élevée a été observée entre le test BOVIGAM et les techniques biologiques classiques de dosage de l'IFN- γ bovin. Le test BOVIGAM présente une sensibilité plus élevée que les techniques biologiques. Tests intradermiques : comparatif de la tuberculine cervicale/de tuberculinisation au pli caudal/ comparatif simple de la tuberculine cervicale (SICCT) : les PPD de tuberculine bovine ou aviaire étant inoculés par voie intradermique, le diagnostic se fait *in vivo*. Chez les bovins atteints, l'injection de PPD de tuberculine bovine induit une réaction immunitaire sur le site de l'injection. Elle est désignée sous le terme de réaction d'hypersensibilité retardée et se présente comme une inflammation locale et un gonflement cutané (lésion). L'épaisseur du pli de peau est mesurée à l'aide d'un cutimètre 72 heures après l'injection. Le PPD de tuberculine aviaire est utilisé pour détecter les réactions non spécifiques. La stimulation peut être réalisée sur toute une série de lymphocytes T. Le test BOVIGAM est un test *in vitro* permettant la stimulation d'échantillons de sang entier avec des PPD ou d'autres antigènes spécifiques. La concentration d'IFN- γ , qui constitue le biomarqueur, est mesurée. Ce sont majoritairement les lymphocytes CD4+ qui sont stimulés. La concordance est d'environ 70 % car la réponse immunitaire sur laquelle repose le système d'essai est à chaque fois différente et chaque test peut reconnaître des sous-populations spécifiques d'animaux positifs à la tuberculose bovine. Le tableau ci-dessous présente plusieurs études résumant le degré de concordance entre les applications des tests cutanés et BOVIGAM.

Niveau de concordance entre différents tests cutanés et BOVIGAM.

Auteurs :	Espèce	Test cutané	BOVIGAM®	Niveau de concordance	Kappa (k)
Lopes <i>et al.</i> , 2012	Bovins N= 350	CCT	According PI [suivant critères d'interprétation]	79,4 % à 85,3 %	0,546 à 0,663
Antognoli <i>et al.</i> , 2010	Bovins N= 900	CCT	According PI [suivant critères d'interprétation]	Sans objet	0,45 (IC à 95 % 0,28 – 0,62)
Goosen <i>et al.</i> , 2013	Buffle N= 82	SCT	According PI [suivant critères d'interprétation] ou spécifique pour le buffle en Afrique du Sud	63 % 64 %	Sans objet Sans objet
Kalis <i>et al.</i> , 2003	Bovins N= 1631	SCT	According PI** [suivant critères d'interprétation]	85,7 %	0,41
Schroeder, 2014	Bovins N= 541	CCT	According PI [suivant critères d'interprétation]	95,1 %	0,501

Reproductibilité

Expérience 1 (2015)

Visant à examiner la reproductibilité de l'ELISA BOVIGAM réalisée dans différents laboratoires

Méthodes : Compte tenu des obstacles techniques à l'expédition à des laboratoires de pays différents des échantillons sanguins juste après leur prélèvement en vue de réaliser la stimulation du sang entier, nous avons limité l'analyse de la reproductibilité à la détection de l'IFN- γ par l'ELISA BOVIGAM. Des échantillons de sang entier prélevés de 21 animaux (16 animaux positifs de terrain ayant réagi au test comparatif intradermique SICCT, 3 animaux ayant reçu le BCG/infectés par *M. bovis* et 2 témoins non vaccinés et non infectés) ont été incubés avec la PPD-A, la PPD-B, un cocktail peptidique ESAT-6/CFP-10 et un cocktail peptidique Rv3615c. Ces stimulations ont été réalisées dans plusieurs puits afin de constituer les copies d'échantillons à l'origine du panel d'aliquotes identiques qui ont servi à réaliser le test ELISA BOVIGAM dans les laboratoires mentionnés ci-dessus. Chaque laboratoire a utilisé un lot différent du test ELISA BOVIGAM (VISAVET kit# 6632600201, Luddington kit# 6332601801, Weybridge kit# 6332601701). Chaque animal a ensuite été classé comme positif ou négatif suivant trois systèmes de lecture différents : (i) la lecture comparative standard de la PPD bovine moins la PPD aviaire (B-A), (ii) les réponses au cocktail peptidique ESAT-6/CFP-10 (E/C), ou (iii) les réponses au cocktail peptidique ESAT-6/CFP-10 et/ou au cocktail peptidique Rv3615c (E/C \pm Rv).

Résultats : Le Tableau 18 présente les résultats de tests obtenus par trois laboratoires indépendants chez 21 animaux suivant le système de lecture (i) B-A, (ii) E/C ou (iii) E/C \pm Rv3615c.

Tableau 18 : Concordance des résultats du test dans trois laboratoires indépendants.

I.D.	B-A			E/C			E/C and/or Rv3615c		
	VISAVET	Luddington	Weybridge	VISAVET	Luddington	Weybridge	VISAVET	Luddington	Weybridge
S1	N	N	N	N	N	N	N	N	N
S2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
S3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
S4	Y	Y	Y	N	N	N	N	N	N
S5	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
S6	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
S8	Y	Y	Y	N	N	N	Y	N	Y
S9	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
S10	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
S11	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
S12	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
S13	Y	Y	Y	N	N	N	Y	Y	Y
S14	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
S15	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
S16	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
S17	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
S20	N	N	N	N	N	N	N	N	N
S21	N	N	N	N	N	N	N	N	N
S23	N	N	N	N	N	N	N	N	N
S24	Y	Y	Y	N	N	N	N	N	N
S25	Y	Y	Y	N	N	N	N	N	N

Tableau 18 : Y = réponse positive au test ; N = réponse négative au test ; B-A = lecture comparative standard de la PPD bovine moins la PPD aviaire ; E/C = réponses au cocktail peptidique ESAT-6/CFP-10 : E/C et/ou Rv3615c = réponses au cocktail peptidique ESAT-6/CFP-10 et/ou au cocktail peptidique Rv3615c.

Une concordance parfaite des résultats des tests (100 %) a été observée entre les trois laboratoires en utilisant B-A ou E/C comme grilles de lectures. En outre, une concordance de 100 % a également été observée entre les laboratoires de Weybridge et VISAVET en utilisant E/C \pm Rv3615c comme grille de lecture. La seule divergence entre les résultats des tests concerne les résultats E/C \pm Rv3615c du laboratoire de Luddington comparés à ceux du laboratoire de Weybridge ou du laboratoire VISAVET (en rouge), l'échantillon S8 ayant été testé négatif dans le premier laboratoire mais positif dans les deux autres. La concordance des tests est donc passée à 95,24 % (valeur du kappa 0,8966, interprétée comme une

très bonne concordance) entre le laboratoire de Luddington, d'une part, et les laboratoires de Weybridge ou VISAVET, d'autre part, lors de la comparaison des résultats E/C \pm Rv3615c.

Conclusions :

Ces résultats démontrent la grande reproductibilité du test ELISA BOVIGAM utilisé dans différents laboratoires, avec différents lots du kit et en faisant appel à des systèmes de lecture différents.

Expérience 2 (2015) :

Étudier la variabilité des résultats obtenus dans différents laboratoires avec des tubes d'échantillons provenant du même animal et prélevés en même temps.

Méthodes : 316 échantillons de sang ont été soumis en même temps au laboratoire de l'AHVLA à Luddington et à un deuxième laboratoire (laboratoire de l'AHVLA à Weybridge ou laboratoire de l'AHVLA à Sutton Bonnington) en vue d'y effectuer la stimulation du sang suivie du dosage de l'IFN- γ par ELISA. Il s'agissait de 285 échantillons issus de l'essai de spécificité pour l'IFN- γ et de 31 échantillons issus d'animaux ayant réagi au test cutané SICCT. Le test a consisté à détecter dans chaque échantillon la production d'IFN- γ en présence d'un témoin (négatif) en milieu, de la PPD-A, de la PPD-B et de la SEB (témoin positif) conformément aux PON pertinentes.

Résultats : Tous les contrôles se situaient dans les fourchettes spécifiées dans les PON. Pour la lecture B-A, la détermination des résultats positifs s'est faite en soustrayant la réponse à la tuberculine aviaire de celle à la tuberculine bovine ; les valeurs de 0,1 ou plus ont été considérées comme un résultat positif. L'accord entre les deux sites est de 96,52% (résultats résumés dans le tableau ci-dessous).

Synthèse de l'accord des tests avec la grille de lecture B-A.

		Deuxième laboratoire		
		Tests négatifs	Tests positifs	Total
Luddington	Tests négatifs	275	5	280
	Tests positifs	6	30	36
	Total	281	35	316

Une analyse similaire a été effectuée pour les réponses au cocktail de peptides ESAT-6/CFP-10 obtenues avec 287 échantillons de sang soumis en même temps au laboratoire de l'AHVLA à Luddington et au laboratoire de l'AHVLA à Weybridge. Il s'agissait de 284 échantillons issus de l'essai de spécificité pour l'IFN- γ et de 3 échantillons issus d'animaux ayant réagi au test cutané SICCT. Les résultats positifs ont été déterminés en soustrayant la réponse au témoin négatif de la réponse au cocktail peptidique ; les valeurs de 0,1 ou plus ont été considérées comme un résultat positif. L'accord entre les deux sites est de 94,43% (résultats résumés dans le tableau ci-dessous).

Synthèse de l'accord des tests pour les réponses ESAT-6/CFP-10.

		Weybridge		
		Tests négatifs	Tests positifs	Total
Luddington	Tests négatifs	268	6	274
	Tests positifs	10	3	13
	Total	278	9	287

Expérience 3 (2015) :

Un autre essai a été conduit en France pour évaluer la reproductibilité inter-laboratoires (tableau ci-dessous).

	Laboratoire départemental de l'Hérault, Montpellier, Camargue		Laboratoire départemental d'analyses et de recherche, Coulounieix-Chamiers, Dordogne	Laboratoire départemental de la Côte-d'Or, Dijon	
Numéro de lot	6332603001	6332604201	6332603701	6332602701	6332603401
Moyenne matériels de réf.	19,65 %	19 %	20,43 %	22,56 %	20,05 %
Écart-type	1,82	2,71	2,69	1,97	1,47
% CV	9,23 %	14,56 %	13,17 %	9,0 %	7,0 %

Ces résultats démontrent la grande reproductibilité du test ELISA BOVIGAM utilisé dans des laboratoires différents, avec des lots différents du kit, à des dates différentes et en faisant appel à des systèmes de lecture différents.

Expérience 4 [2021], sur le buffle d'eau (*Bubalus bubalis*)

Méthodes

Afin d'estimer la reproductibilité, 32 échantillons de sérum provenant de 32 buffles d'eau ont été utilisés, dont 16 étaient positifs et 16 négatifs. Les tests ont été réalisés par deux laboratoires (IZSME-Salerno, IZSUM-Perugia).

Lorsque les résultats sont exprimés sur une échelle nominale (négatif, positif), l'indice statistique kappa peut être utilisé pour quantifier le degré d'accord, au-delà du cas, entre les résultats d'un test. Le kappa varie de 0 (absence d'accord) à 1 (accord parfait) (Fleiss, 1981 ; Landis & Koch, 1977). Pour l'évaluation qualitative, la reproductibilité a été définie comme le degré d'accord entre différents laboratoires sur le même échantillon. Il a été calculé sur 32 échantillons provenant de deux laboratoires différents à l'aide du kappa de Fleiss.

Résultats

	Critère Bovigam		
N° échantillon	Attendu	Lab. 1	Lab. 2
1	NEG	NEG	NEG
2	NEG	NEG	NEG
3	NEG	NEG	NEG
4	NEG	NEG	NEG
5	NEG	NEG	NEG
6	NEG	NEG	NEG
7	NEG	NEG	NEG
8	NEG	NEG	NEG
9	NEG	NEG	NEG
10	NEG	NEG	NEG
11	NEG	NEG	NEG

12	NEG	NEG	NEG
13	NEG	NEG	NEG
14	NEG	NEG	NEG
15	NEG	NEG	NEG
16	NEG	NEG	NEG
17	POS	POS	POS
18	POS	POS	POS
19	POS	POS	POS
20	POS	POS	POS
21	POS	POS	POS
22	POS	POS	POS
23	POS	NEG	POS
24	POS	POS	POS
25	POS	NEG	POS
26	POS	POS	POS
27	POS	NEG	POS
28	POS	POS	POS
29	POS	POS	POS
30	POS	POS	POS
31	POS	POS	POS
32	POS	POS	POS

Pour le critère Bovigam, le kappa était égal à 0,81 (IC à 95 % : 0,61-1,00), indiquant une concordance presque parfaite entre les laboratoires ; trois divergences ont été observées sur 32 échantillons. Le taux de concordance était de 90 %. L'hypothèse nulle que cette valeur soit égale à 0 (non-corrélation) a donné une valeur de $p < 0,001$, indiquant que la valeur du kappa diffère significativement de 0.

Conclusion : Le test ELISA BOVIGAM présente une excellente reproductibilité inter-laboratoires avec des échantillons de plasma stimulés issus du buffle d'eau (*Bubalus bubalis*).

Application :

Certains laboratoires de référence utilisent le kit BOVIGAM en tant que test auxiliaire chez des animaux dont le test cutané s'est révélé négatif au sein d'un troupeau ayant présenté quelques cas positifs au test cutané (par exemple, en Irlande et au Royaume-Uni). Certains laboratoires de référence utilisent le BOVIGAM comme test de confirmation chez des animaux dont le test cutané s'est révélé positif (par exemple en Bavière). Le Mexique et un laboratoire français (pour les troupeaux de taureaux de combat) utilisent le BOVIGAM en tant que test principal pour le diagnostic de la tuberculose chez les bovins.

Le test BOVIGAM a été utilisé plusieurs millions de fois depuis son introduction en 1988, principalement dans des laboratoires d'analyse de routine. Des laboratoires utilisent ce test pour analyser plusieurs centaines d'échantillons par jour. Le délai minimum d'exécution du test est de 4 heures pour l'épreuve ELISA et de 16 à 24 heures pour la stimulation des échantillons de sang total.

Références

Wood, P. R., Corner, L.A., Rothel, J.S., Baldock, C., Jones, S.L., Cousins, D.B., McCormick, B.S., Francis, B.R., Creeper, J., Tweddle, N.E. (1991) Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Aust Vet J*, 68: 286-90.

R. de la Rua-Domenech , A.T. Goodchild , H.M. Vordermeier , R.G. Hewinson ,K.H. Christiansen , R.S. Clifton-Hadley Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, c-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science*, 81 (2006): 190–210.

Vordermeier; M. and Ewer, K; Specificity Trial of the BOVIGAM® IFN-Gamma Test in GB Cattle; TB Research Group, Veterinary Laboratories Agency, New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB. Funded by Defra under surveillance project SB4021. Avril 2006.

Using latent class analysis to estimate the test characteristics of the γ -interferon test, the single intradermal comparative tuberculin test and a multiplex immunoassay under Irish conditions Tracy A. Clegg, Anthony Duignan, Clare Whelan, Eamonn Gormley, Margaret Good, John Clarke, Nils Toft, Simon J. More *Veterinary Microbiology*, 151 (2011): 68–76.