Ordre de service d'action

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE
DE L'AGRICULTURE
DE L'AGROALIMENTAIRE
ET DE LA FORÊT

Direction générale de l'alimentation **Sous-direction de la santé et de protection animales** **BSA** **251 rue de Vaugirard** **75 732 PARIS CEDEX 15** **0149554955**	**Note de service** **DGAL/SDSPA/2014-108** **13/02/2014**

Date de mise en application : Immédiate
Diffusion : Tout public

Cette instruction n'abroge aucune instruction.
Cette instruction modifie :
DGAL/SDSPA/N2013-8202
Nombre d'annexes : 3

Objet : Modification de la note de service DGAL/SDSPA/N2013-8202 relative au diagnostic de laboratoire post-mortem de tuberculose bovine.

Destinataires d'exécution
DD(CS)PP Laboratoire national de référence Laboratoires agrées pour la tuberculose

Résumé : La présente note reprend les modalités techniques d'organisation des analyses de laboratoire à mettre en œuvre par les laboratoires agréés et les DDecPP dans le cadre de la lutte contre la tuberculose. Elle explicite le circuit d'information entre laboratoires et services déconcentrés et l'intervention du LNR. Cette note présente les logigrammes définissant les abattages diagnostiques favorables et défavorables auxquels il est fait référence dans les instructions destinées aux DDecPP pour la gestion des suspicions.

Des modifications et des précisions sont apportées à la note de service DGAL/SDSPA/N2013-8202 relative au diagnostic de laboratoire post-mortem de la tuberculose bovine: modalités de paiement des frais d'analyse et d'envois; modalités de présentation des résultats d'histologie; suppression de l'obligation de prélèvement d'un nœud lymphatique mésentérique en cas d'abattage diagnostique. Référence interne: BSA/1401057

Textes de référence :Règlement (CE) n°854/2004 du Parlement Européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine ;
- Directive 64/432/CEE relative à des problèmes de police sanitaire en matière d'échanges intracommunautaires d'animaux des espèces bovine et porcine ;
- Code rural et de la pêche maritime et notamment son livre II ;
- Arrêté modifié du 15 septembre 2003 fixant les mesures techniques et administratives relatives à la prophylaxie collective et à la police sanitaire de la tuberculose des bovinés et des caprins ;
- Arrêté du 19 octobre 1999 fixant les conditions d'agrément des laboratoires chargés d'effectuer les épreuves de diagnostic des tuberculoses animales ;
- Note de Service DGAL/SDPRAT/N2011-8120 du 23 mai 2011 relative aux laboratoires agréés pour le dépistage de la tuberculose animale par Bactériologie, histo-pathologie, PCR et dosage d'interféron Gamma par PPD.
- Note de Service DGAL/SDSPA/SDSSA/N2013-8123 du 23 juillet 2013 relative aux dispositions techniques à mettre en œuvre à l'abattoir, dans le cadre de la lutte contre la tuberculose bovine, en application de l'arrêté du 15 septembre 2003 modifié.
- Note de Service DGAL/SDSPA/N2012-8215 du 13 novembre 2012 relative aux modalités techniques de gestion des suspicions de tuberculose bovine
- Note de Service DGAL/SDSPA/N2013-8162 du 8 octobre 2013 relative au protocole expérimental d'évaluation de l'interféron gamma.
- Note de service DGAL/SDSPA/N2013-8202 relative au diagnostic de laboratoire post-mortem de la tuberculose bovine.

Cette note présente la démarche diagnostique post-mortem de la tuberculose bovine.

Elle a vocation à indiquer aux laboratoires agréés (LAg.) ce qui est attendu de leur part et d'informer les Directions Départementales en charge de la Protection des Populations (DDecPP) des procédures de laboratoire et du circuit d'information.

Cette note présente la conduite globale et l'interprétation des analyses, et non la gestion réglementaire du statut des troupeaux (suspect ou infecté) qui dépend de considérations dépassant l'unique rendu de résultats de laboratoire. La démarche diagnostique est complexe et fait appel à plusieurs types d'analyses.

En application de l'arrêté du 15 septembre 2003, les analyses décrites ci-après doivent être effectuées par un laboratoire agréé ou par le Laboratoire National de Référence (LNR). Les Services Vétérinaires d'Inspection (SVI) à l'abattoir réalisent les prélèvements et leur expédition conformément aux modalités définies dans une instruction spécifique.

Les frais d'envoi des prélèvements de l'abattoir vers le premier laboratoire sont à la charge de la Direction départementale en charge de la protection des populations (DDecPP). Tous les frais d'analyse sont à la charge de la DDecPP du département de l'élevage d'origine du ou des animaux, à laquelle les laboratoires adressent leurs factures.

Des détails sur les méthodes diagnostiques sont présentés en Annexe I.

I. Schémas diagnostiques

La conduite diagnostique post-mortem correspond à trois situations :

Cas A : abattage d'un animal provenant d'un troupeau officiellement indemne (OI) ;
Cas B : abattage diagnostique d'animaux provenant d'un troupeau suspect ou susceptible (au sens de l'article 21 de l'arrêté ministériel du 15/09/2003) ou abattage partiel dans un troupeau infecté en cours d'assainissement (pour les animaux abattus à la demande de la DDecPP) ;
Cas C : abattage total d'un troupeau infecté.

Cas A : Abattage d'un animal issu d'un troupeau OI

1. Circulation des prélèvements et des documents associés

Lors de découvertes par le service d'inspection à l'abattoir, de lésions évocatrices de tuberculose, pendant l'inspection post-mortem (IPM) d'un animal, sont prélevés le(s) organe(s) lésé(s) ainsi que le(s) nœud(s) lymphatique(s) (NL) associé(s) lésés ou non lésés.
Ces prélèvements sont accompagnés du DTA (Diagnostic de Tuberculose à l'Abattoir, cf. annexe II), ce dernier est également adressé au service de santé et de protection animale de la DDecPP du département d'origine de l'animal suspect. Une description des lésions observées est reportée dans ce DTA. Les modalités de réalisation et d'expédition des prélèvements par les SVI font l'objet d'une note spécifique (DGAL/SDSPA/SDSSA/N2013-8123).

Les prélèvements doivent être envoyés à un laboratoire d'analyse agréé pour la Culture/PCR (LAg. Culture/PCR).

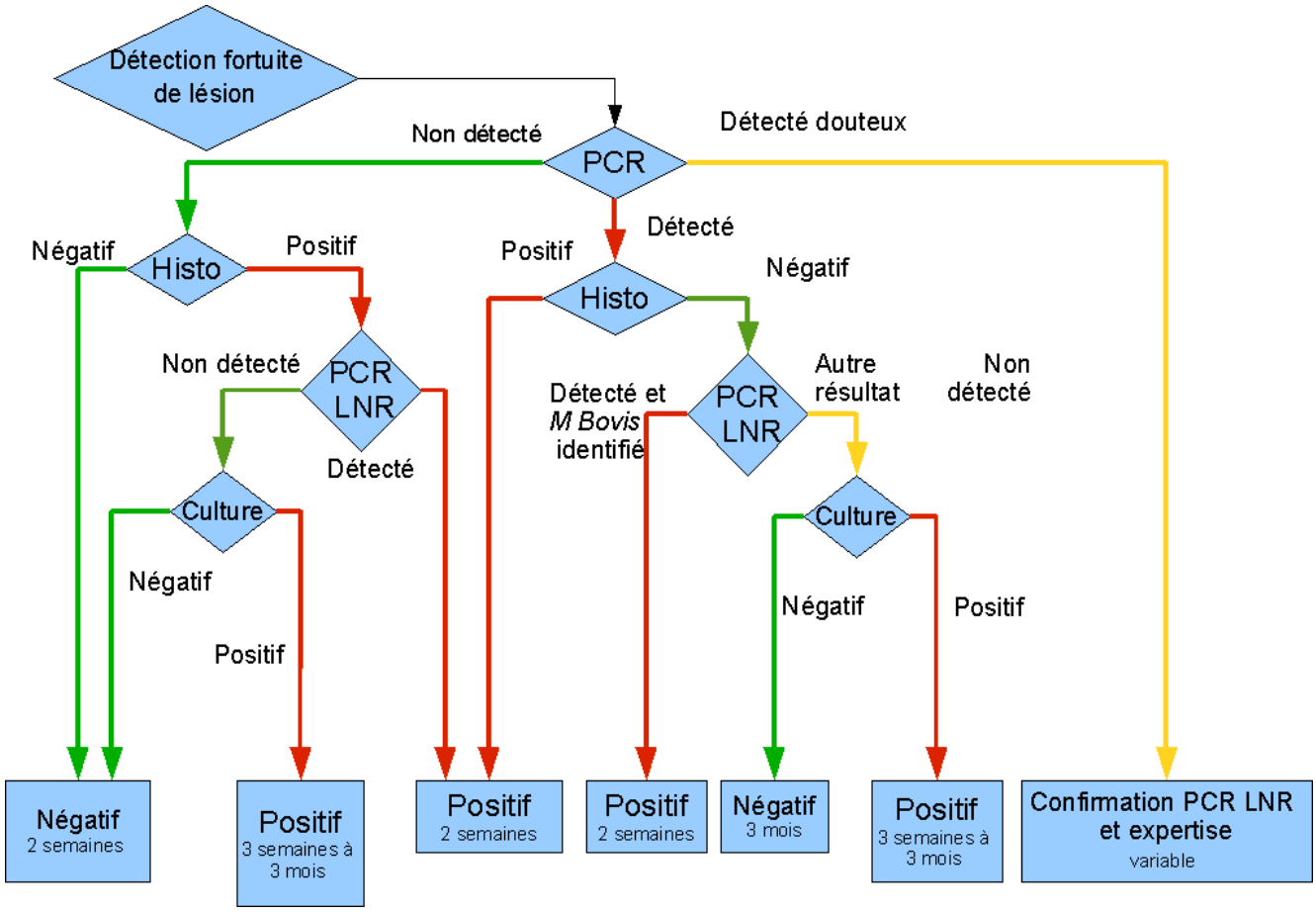
Il est possible néanmoins que le premier laboratoire de destination, choisi par l'abattoir, ne soit pas agrée pour la Culture/PCR. Dans ce cas il doit conditionner les prélèvements sans effectuer de dissection (afin d'éviter la détérioration et la contamination des prélèvements faisant suite à de nombreuses manipulations) et les expédier vers le LAg. Culture/PCR le plus proche. Ceci comprend le cas où le premier laboratoire de destination est lui-même laboratoire Agréé pour l'histologie (LAg. Histo). En effet dans le cas de micro-lésions, le matériel biologique sera plutôt valorisé dans les analyses Culture/PCR au détriment des analyses histologiques.

Le LAg. Culture/PCR réalise une dissection minutieuse des prélèvements et :
1) envoie une partie de prélèvement porteur de lésion, après fixation, à un LAg. Histo ;
2) effectue la prise d'essai nécessaire aux analyses de recherche par PCR et culture qu'il réalise.

2. Interprétation des résultats

Les détails des analyses à réaliser et la démarche d'interprétation du diagnostic de laboratoire figurent en Annexe I.

La démarche d'interprétation du diagnostic de laboratoire et les temps moyens d'obtention des résultats sont présentés dans le schéma ci-dessous :



Ces notions d'interprétations sont à distinguer de ceux transmis dans SIGAL en raison des résultats de culture, en cours pendant 3 mois en cas de résultat négatif.

Cas B : Abattage diagnostique

1. Circulation des prélèvements et des documents associées

La procédure d'abattage diagnostique concerne à la fois les animaux provenant de troupeaux **suspects**, de troupeaux **susceptibles d'être contaminés** (lien épidémiologique) et de **bovins réagissant ou à risque**, éliminés dans le cadre d'assainissement par **abattage partiel** de troupeaux infectés.

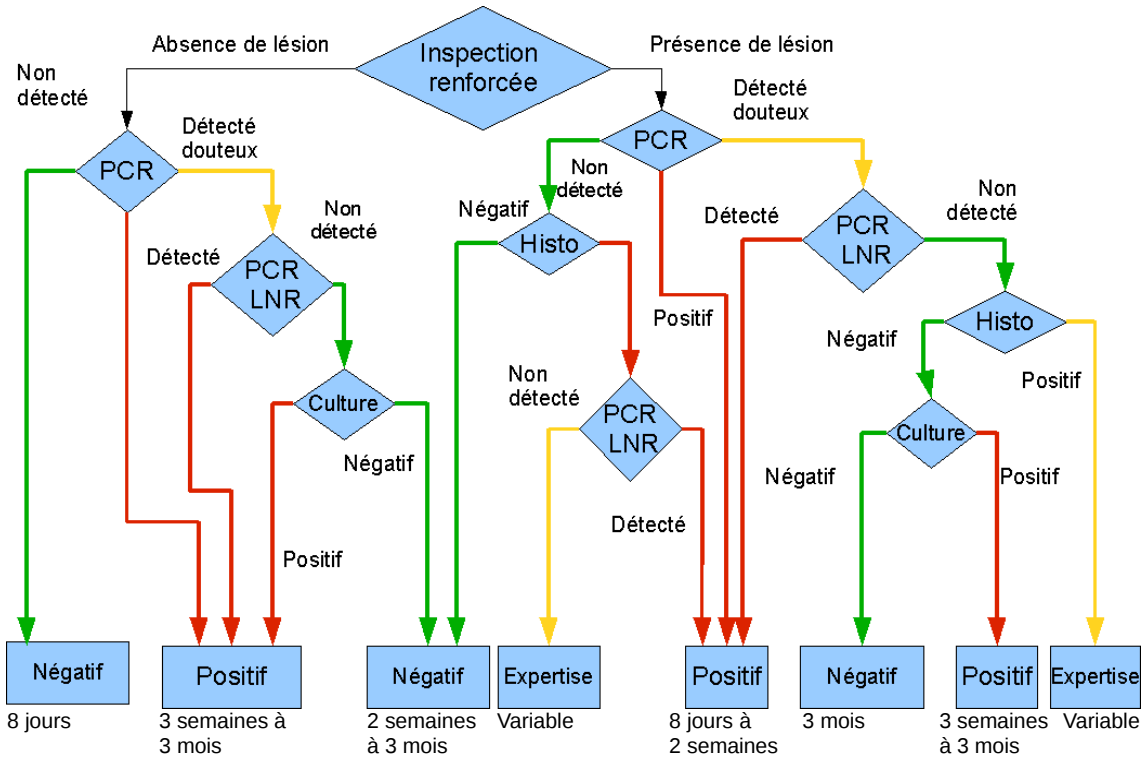
Les animaux en provenance d'élevage infecté en cours d'assainissement dans un processus d'abattage partiel mais qui ne sont pas éliminés à la demande de la DDcePP font l'objet d'une inspection renforcée mais pas d'un abattage diagnostique.

Le circuit d'acheminement des prélèvements est le même que dans le cas de découverte fortuite de lésion lors de l'abattage d'un animal issu d'un troupeau OI (Cas A). Le DTA, accompagnant les prélèvements, aura toutefois été préparé à l'avance par la DDecPP de l'élevage et les prélèvements seront étiquetés à l'aide d'un code barre reprenant le numéro IPG du bovin.

Des détails des analyses à réaliser et la démarche d'interprétation du diagnostic de laboratoire figurent en Annexe I.

2. Interprétation des résultats

La démarche d'interprétation du diagnostic de laboratoire et les temps moyens d'obtention des résultats sont présentés dans le schéma ci-dessous :



Cas C : Abattage total

1. Circulation des prélèvements et des documents associées

Dans le cas d'un abattage total, les prélèvements ne portent que sur les animaux présentant, pendant l'IPM, des lésions évocatrices de tuberculose. Ne sont prélevés que le(s) organe(s) lésé(s).

Le circuit d'acheminement des prélèvements et des documents associés est le même que dans le cas de découverte fortuite de lésion lors de l'abattage d'un animal issu d'un troupeau OI **(Cas A)**.

Seule la culture individuelle est à réaliser sur tous les prélèvements à lésions afin d'isoler la souche de *M. bovis*, *M. tuberculosis ou M. caprae* sur laquelle le LNR pourra effectuer une caractérisation moléculaire.

2. Interprétation des résultats

Les résultats ne modifient pas le statut réglementaire des animaux issus d'un troupeau infecté.

- Si la culture est positive, l'interprétation du diagnostic est **Mycobactéries présomptives**. Le LAg. Culture/PCR **transmet la souche isolée au LNR** pour identification et détermination du type moléculaire. En parallèle, il transmet à la DDecPP sous forme de RAI via SIGAL (Système général d'Information de la DGAL).

II. Circulation de l'information

L'annexe III présente les schémas de circulation des informations entre les différents laboratoires et la DDecPP.

Les prélèvements doivent toujours être accompagnés du DTA original ou de sa copie.

Pour tous les laboratoires, les résultats positifs doivent toujours être transmis, sans délai, sous forme de rapports écrits à la DDecPP du site d'élevage, qui se chargera s'en informer les autres parties prenantes.

Les factures (analyses et envois) doivent être adressées à la DDecPP du site d'élevage.

Le retour de l'information au SVI de l'abattoir des résultats de laboratoire pourra se faire par consultation directe des résultats via SIGAL ou à l'occasion d'un bilan périodique organisé par la DDecPP du SVI de l'abattoir. Il importe en effet que la DDecPP chargée du suivi de l'élevage et le vétérinaire officiel de l'abattoir, qui a procédé aux prélèvements, puissent recevoir les résultats successifs des analyses effectuées, avec tous les éléments de traçabilité permettant de rattacher sans ambiguïté les résultats à un dossier.

Les Résultats d'Analyse Informatisés (RAI) seront transmis au fur et à mesure par les laboratoires agréés culture/PCR, dès validation, à la base SIGAl. L'ensemble des résultats est géré soit, préférentiellement sous forme d'Interventions Programmées (IP), soit lorsque les conditions logistiques ne le permettent pas, notamment lors de découverte fortuite à l'abattoir, sous forme d'Intervention Non Programmée (INP) qui seront rattachées postérieurement à des interventions comme pour les avortements chez les ruminants.

Lorsque l'intervention est programmée, une Demande d'Analyse Informatisée (DAI) est transmise au laboratoire d'analyse. Il est prévu à terme que le DTA reprenne le numéro de DAI. S'il s'avère que le laboratoire réalisant l'analyse n'est pas le laboratoire prévu, il convient de réaffecter la DAI au laboratoire destinataire des prélèvements.

Les résultats d'histologie et d'expertise du LNR sont transmis au LAg. Culture/PCR qui complète les RAI via SIGAL, au fur et à mesure que les résultats intermédiaires (PCR, histologie, PCR

LNR, culture, identification) complètent le plan d'analyse. Le remplacement des RAI successifs correspondant à un même animal doit être fait manuellement par la DDecPP dans le cas d'INP alors qu'il est fait automatiquement dans le cas d'IP.

La DDecPP de l'élevage informe le LAg. d'histologie des résultats Culture/PCR.

La DDecPP tient informé l'éleveur des résultats en tenant compte des échéances de leur rendu : ne pas attendre un résultat de culture pour communiquer des résultats de PCR et d'histologie mais éviter de communiquer des résultats intermédiaires si les résultats de confirmation doivent être disponibles en quelques jours.

Le Bureau de la Santé Animale, avec l'appui des personnes ressources, prépare une instruction spécifique sur l'utilisation de SIGAL pour la gestion de la tuberculose.

Vous voudrez bien me tenir informé des éventuelles difficultés rencontrées lors de l'exécution de la présente instruction.

Le Directeur Général de l'Alimentation

Patrick DEHAUMONT

Annexe I : Méthodes diagnostiques

I - Prélèvements

Les prélèvements utilisés dans ces méthodes doivent être conservés réfrigérés à froid positif, et ceux ne pouvant être expédiés dans les 48 h au laboratoire agrée doivent être congelés à une température ≤ -16 °C (mais dans ce cas l'analyse histologique ne pourra pas être effectuée).
Les conditions et durée de conservation des prélèvements reçus par les LAg. Culture/PCR sont ceux indiqués par la norme NF U47-104. Le délai de conservation du prélèvement d'origine est prolongé d'un mois en cas de résultat confirmé positif au LNR.

Le type de prélèvement à analyser est fonction du contexte d'abattage :

Cas A : abattage d'un animal provenant d'un troupeau officiellement indemne (OI)
Lors de découvertes de lésions à l'abattoir (macro lésions), seront prélevés le(s) organe(s) lésé(s) ainsi que le(s) nœud(s) lymphatique(s) (NL) associé(s) lésés ou non lésés.

Cas B : abattage diagnostique
Sont prélevés systématiquement les paires de nœuds lymphatiques rétropharyngiens, trachéobronchiques, médiastinaux ~~et, dans la mesure du possible, un nœud lymphatique mésentérique~~.
En cas de lésions découvertes à l'abattoir (macro lésions), sont également prélevés le(s) organe(s) lésé(s) ainsi que le(s) nœud(s) lymphatique(s) associé(s) lésés ou non lésés.

Cas C : abattage total d'un troupeau infecté.
Les prélèvements ne portent que sur les animaux présentant des lésions à l'abattoir et ne sont prélevés que le(s) organe(s) lésé(s).

II - Analyses

A – Histologie

1. Techniques

Lorsque l'étendue de la lésion d'un prélèvement le permet et que les prélèvements n'ont pas été congelés, le LAg. Histo réceptionne un échantillon expédié par un LAg. Culture/PCR. Il réalise un examen anatomopathologique en mettant en œuvre des méthodes de coloration agréées (Ziehl-Neelsen ou hémalun-éosine-safran). Des méthodes d'immunohistochimie peuvent être mises en œuvre de façon complémentaire mais elles ne sont pas officielles.

Des photos des lésions macroscopiques sont, dans certains cas, disponibles auprès des SVI de l'abattoir.

2. Résultats

Les résultats possibles (avec leur sigle normalisé SIGAL) sont les suivants :

- **Positif fort (POS_FORT) :** Lésions fortement évocatrices de tuberculose, caractère très fortement évocateur des lésions observées et détection de mycobactéries par coloration à l'hémalun-éosine-safran ou coloration de Ziehl-Neelsen.

- **Positif (POS) :** Lésions évocatrices de tuberculose, caractère très fortement évocateur des lésions observées sans détection de mycobactéries par coloration à l'hémalun-éosine-safran ou coloration de Ziehl-Neelsen.

- **Négatif (NEG) :** Lésions non tuberculeuses ; lésions objectivement non tuberculeuses dans la mesure où une autre étiologie a pu être mise en évidence par le laboratoire.

- **Absence (ABS) :** Absence de résultat dans le cas d'un échantillon non analysable (exemple : erreur de prélèvement, putréfaction, détérioration…) ou absence de tout type de lésion. ~~La présomption d'absence de tuberculose est forte, si l'échantillonnage a été réalisé dans de bonnes conditions ; cet aspect devra être pris en compte par le laboratoire dans sa réponse.~~ Cette distinction est renvoyée sous forme de valeur de commentaire dans SIGAL.

~~Dans le cas d'un échantillon non analysable (exemple : erreur de prélèvement, putréfaction, détérioration…), l'information est renvoyée sous forme de valeur de commentaire dans SIGAL.~~

Ces résultats sont obtenus entre 7 et 10 jours.

Les résultats du LAg. Histo seront transmis à la DDecPP de l'élevage suspect et au LAg. Culture/PCR pour renseigner les RAI via SIGAL.

B – PCR

1. Techniques

L'objectif de l'analyse réalisée dans les LAg. Culture/PCR est de rechercher des mycobactéries appartenant au complexe de *M. tuberculosis* (dont *Mycobacterium bovis, Mycobacterium caprae* et *Mycobacterium tuberculosis)*.

Le LAg. Culture/PCR effectue cette analyse sur la phase liquide du broyat préparé selon la norme NF U47-104. La PCR est réalisée en suivant la méthode diffusée par le LNR : les analyses mises en œuvre sont des analyses qualitatives et non quantitatives.

Le LAg. Culture/PCR réalise une dissection minutieuse des échantillons. Cette étape peut permettre la détection de lésions discrètes (micro lésions) au niveau de certains NL.

Les analyses sont réalisées selon les prises d'essai suivantes :
Sur le(s) prélèvement(s) lésé(s) à macro lésions et les NL à micro lésions : Traitement individuel.
Sur le(s) prélèvement(s) non lésé(s) : Traitement par pool de chaque type de paires de NL.

2. Résultats

L'expression des résultats est faite selon les critères d'interprétation définis par le LNR en fonction de la méthode de détection utilisée (détecté, détecté en limite de détection, non détecté, douteux, ininterprétable).

Les résultats possibles (avec leur sigle normalisé SIGAL) sont les suivants :

- **Positif (POS) :** ADN bactérien détecté ou détecté en limite de détection.
- **Douteux (DTX) :** ADN bactérien détecté de façon douteuse.
- **Négatif (NEG) :** ADN bactérien non détecté.

- **Ininterprétable (IN_ITPBLE) :** Cette expression est utilisée lorsqu'un ou plusieurs critères d'analyse et d'interprétation du signal ne correspondent pas aux caractéristiques spécifiées attendues.

Dans le cas d'un échantillon non analysable (exemple : erreur de prélèvement, détérioration…), l'information est renvoyée sous forme de valeur de commentaire dans SIGAL.

Ces résultats de PCR sont obtenus en moyenne entre 2 et 5 jours.

Les résultats seront transmis à la DDecPP de l'élevage suspect et les RAI seront renseignés via SIGAL.

3. Expertise moléculaire par le LNR

Dans les cas décrit ci-dessous, le résultat de la PCR nécessite une expertise du LNR qui mettra en œuvre des analyses complémentaires. Celles-ci permettront, dans certains cas, l'identification directe de la mycobactérie concernée.
Le LAg. Culture/PCR transmet alors au LNR l'extrait d'ADN, de la phase liquide du broyat préparé selon la norme NF U47-104 et dans la mesure du possible, les prélèvements originaux congelés.

Les cas nécessitant cette expertise sont les suivants :

- **PCR positive** et **histologie négative** sur des prélèvements de bovins issus de cheptel officiellement indemne.
- **PCR négative** et **histologie positive.**
- **PCR douteuse** quel que soit le contexte.

Le LAg. Culture/PCR doit fournir au LNR les valeurs de Ct (Cycle treshold) trouvées pour la cible du complexe de *M. tuberculosis* ainsi que celui du contrôle interne d'inhibition (sans dilution et après dilution quand nécessaire).
Les résultats du LNR seront transmis au laboratoire agréé pour la PCR/culture et à la DDecPP.

Les résultats possibles (avec leur sigle normalisé SIGAL) sont les même que ceux présentés au paragraphe 2 précédent.

Ces résultats d'expertise du LNR sont obtenus en moyenne entre 2 et 5 jours après réception.

Les résultats du LNR seront transmis au LAg. Culture/PCR et à la DDecPP de l'élevage suspect pour renseigner les RAI via SIGAL.

C – Culture

1. Techniques

La culture des mycobactéries responsables de la tuberculose bovine doit être réalisée selon la norme NF U 47-104. Elle peut être réalisée à partir de prélèvements issus d'un traitement individuel ou en pool selon le résultat de la PCR (cf. III : Démarche diagnostique des analyses).

2. Résultats

Les résultats possibles (avec leur sigle normalisé SIGAL) sont les suivants :

- **Positif (POS)** : Isolement d'une souche de mycobactérie présomptive.

– **Négatif (NEG)** : Absence de culture visible de mycobactérie après 3 mois d'incubation.
– **Ininterprétable (IN_ITPBLE) :** les cultures sont contaminées.
Dans le cas d'un échantillon non analysable (exemple : erreur de prélèvement, putréfaction…), l'information est renvoyée sous forme de valeur de commentaire dans SIGAL.

Si le résultat est positif, le LAg. Culture/PCR transmet au LNR la souche isolée pour identification et détermination du type moléculaire.

Les résultats du LNR seront transmis au LAg. Culture/PCR et à la DDecPP de l'élevage suspect pour renseigner les RAI via SIGAL.

Un délai de 3 mois est nécessaire avant de pouvoir fournir un résultat de culture négatif.

D – Identification et détermination du type moléculaire (spoligotype et VNTR)

Le LNR dispose de techniques d'analyses de caractérisation moléculaire permettant l'identification et le typage des souches de mycobactéries isolées :

- PCR ciblées sur des gènes spécifiques permettant de différencier les membres du complexe de *M. tuberculosis*.

- PCR ciblées sur des gènes spécifiques et séquençage d'amplicons permettant d'identifier d'autres espèces de mycobactéries.
- Détermination du profil moléculaire par Spoligotypage et analyses des VNTR (Variable Number Tandem Repeat).

Ces différentes analyses peuvent être faites à partir des souches mais également à partir des ADN extraits lorsqu'ils sont en concentration suffisante. **Lors d'une PCR positive et** s**ur demande de la DDecPP,** la détermination de l'identité et du profil moléculaire de l'agent de la tuberculose peut être réalisée : le LAg. Culture/PCR transmet les extraits d'ADN au LNR.

Le LNR est susceptible d'identifier les différentes espèces de mycobactéries isolées :

- Dans le cas d'identification de souches de mycobactéries qui ne sont pas responsables de la tuberculose bovine les résultats d'analyse ne donneront pas lieu à des mesures de police sanitaire. La liste suivante (non exhaustive) regroupe les principales souches de mycobactéries isolées :
  - *Mycobacterium avium sp.*,
  - *Mycobacterium nonchromogenicum,*
  - *Mycobacterium terrae,*
  - *Mycobacterium fortuitum,*
  - *Mycobacterium avium sp. paratuberculosis*
  - …...

- Dans le cas d'identification de bactéries appartenant au complexe de *M. tuberculosis* responsables de la tuberculose bovine (*M. bovis, M. tuberculosis ou M. caprae)* les résultats d'analyse donneront lieu à des mesures de police sanitaire. Afin de déterminer l'origine de l'infection, le LNR détermine le profil moléculaire des souches par deux méthodes de génotypage : le spoligotypage et l'analyse des VNTR.

Le spoligotypage est basé sur la caractérisation d'une région génétique particulière assez stable ; les profils déduits par cette méthode font l'objet d'une nomenclature internationale codifiée en SB + numéro d'ordre. Une autre nomenclature a été utilisée par le passé avec différentes codifications (F + numéro d'ordre, GB + numéro d'ordre). Le tableau ci-dessous

(non exhaustif) indique la correspondance entre les deux nomenclatures pour les spoligotypes historiquement identifiés en France et pour lesquels une dénomination différente du système SB a été utilisée.

Ancienne nomenclature	Nouvelle nomenclature	Ancienne nomenclature	Nouvelle nomenclature	Ancienne nomenclature	Nouvelle nomenclature
A	SB0999	F50	SB0842	F93	SB0844
B	SB0119	F51	SB0838	F94	SB0892
BCG	SB0120	F52	SB0329	F95	SB0924
GB54	SB0121	F53	SB0946	F96	SB0833
GB35	SB 0134	F55	SB0863	F97	SB0858
F1	SB0840	F57	SB0878	F101	SB0921
F2	SB0162	F59	SB0848	F102	SB0941
F4	SB0818	F62	SB0856	F109	SB0944
F5	SB0826	F63	SB0877	F111	SB0950
F8	SB0836	F66	SB0850	F114	SB0938
F10	SB0829	F68	SB0040	F116	SB0913
F11	SB0828	F70	SB0295	F118	SB0881
F13	SB0820	F74	SB0930	F123	SB0869
F14	SB0831	F75	SB0591P	F128	SB0123
F18	SB0852	F79	SB0934	F129	SB0907
F24	SB0879	F80	SB0937	F130	SB0886
F25	SB0898	F81	SB0299	F135	SB0870
F28	SB0839	F84	SB0927	F138	SB0559
F29	SB0837	F85	SB0860	F140	SB0843
F41	SB0823	F86	SB0857	F143	SB0918
F44	SB0339	F89	SB0845	F144	SB0865
F46	SB0942	F90	SB0265	F148	SB0894

La méthode de typage VNTR présente un meilleur pouvoir de discrimination qui permet dans certains cas de différencier les souches ayant le même spoligotype. Ainsi, par exemple, les souches de spoligotype SB0120 (BCG), circulant en Côte d'Or et en Dordogne, ont des profils de VNTR distincts permettant de les différencier.

Un résultat d'identification et de génotypage à partir d'ADN est obtenu entre 3 et 7 jours en moyenne. Pour les souches, le résultat est obtenu entre 3 et 6 semaines en moyenne car un enrichissement bactériologique est nécessaire avant toute analyse de caractérisation moléculaire.

Le LNR transmet ces résultats au LAg. Culture/PCR et à la DDcePP de l'élevage suspect, pour renseigner les RAI via SIGAL.

III- Démarche diagnostique des analyses en fonction du contexte d'abattage

Cas A : abattage d'un animal provenant d'un troupeau OI

1. Analyses à réaliser

Les analyses à effectuer sont les suivantes :

- Histologie : Préparation et fixation d'une partie du(des) prélèvement(s) lésé(s) à macro lésions, puis envoi à un LAg. Histologie, lorsque l'étendue de la lésion le permet et que le(s) prélèvement(s) n'ont pas été congelé(s).
- PCR et culture individuelle sur chaque prélèvement reçu.

2. Interprétation des résultats

En fonction des résultats des différentes analyses effectuées, la démarche d'interprétation du diagnostic de laboratoire est la suivante :

- Si PCR négative (*Non détecté*) et histologie négative**,** l'interprétation diagnostique est **négative**. Toutefois, la culture est maintenue ; en cas (hautement improbable) de résultat de culture positif avec identification de *M. bovis*, *M. tuberculosis ou M. caprae*, l'interprétation du diagnostic est positive (infection confirmée).

- Si PCR négative et histologie positive, l'expertise du **LNR est sollicitée** :
  ➔Si expertise moléculaire LNR positive, l'infection sera confirmée, l'interprétation du diagnostic est **positive**.
  ➔Si expertise moléculaire LNR négative ou douteuse, le diagnostic **sera confirmé ou infirmé par la culture.**

- Si PCR positive (*Détecté*) et histologie négative, l'expertise du **LNR est sollicitée** :
  ➔ Si expertise moléculaire LNR positive à *M. bovis*, *M. tuberculosis ou M. caprae*, l'infection sera confirmée, l'interprétation du diagnostic est **positive**.
  ➔ Si expertise moléculaire LNR négative ou douteuse, le diagnostic sera **confirmé ou infirmé par la culture.**

- Si PCR positive et histologie positive, l'interprétation du diagnostic est **positive**.
  Dans ce cas, sur demande de la DDecPP, la détermination du profil moléculaire de l'agent de la tuberculose peut être réalisée par la LNR sur l'ADN extrait au LAg.

- Si PCR douteuse (*détecté douteuse*), quel que soit le résultat de l'histologie, l'expertise du **LNR est sollicitée** :
  ➔ Si expertise moléculaire LNR positive à *M. bovis*, *M. tuberculosis ou M. caprae*, l'interprétation du diagnostic est **positive**.
  ➔Si expertise moléculaire LNR négative ou douteuse, le diagnostic sera **confirmé ou infirmé par la culture.**

- Si PCR ininterprétable, quel que soit le résultat de l'histologie, le diagnostic sera **confirmé ou infirmé par la culture.**

Cas B : abattage diagnostique

1. Analyses à réaliser

Le LAg. Culture /PCR réalise une dissection minutieuse des échantillons. Cette étape peut

permettre la détection de lésions discrètes au niveau de certains ganglions.

Sur le(s) prélèvement(s) lésé(s)à macro lésions :

- Histologie : Préparation et fixation d'une partie de l'échantillon porteur de lésion, puis envoi à un LAg. Histologie, lorsque l'étendue de la lésion le permet et que le prélèvement n'a pas été congelé.
- PCR et culture individuelles systématiques.

Sur le(s) prélèvement(s) lésé(s) à micro lésions :

- PCR individuelle
- Et culture en fonction du résultat de la PCR :
  ➔Si **PCR négative**, la culture est réalisée à partir d'un pool des phases liquides du broyat des 4 paires de NL.
  ➔Si **PCR positive, douteuse** ou **ininterprétable**, la culture est réalisée individuellement à partir de la phase liquide du NL micro-lésé concerné(s) et non pas de sa paire de NL.

Sur le(s) prélèvement(s) non lésé(s) :

- PCR, individuelle sur phase liquide de broyat par pool de chaque type de paires de NL préparée selon la norme NF U47 104.
- Et culture en fonction du résultat de la PCR :
  ➔Si **PCR négative**, la culture est réalisée à partir d'un pool des phases liquides des 4 paires de NL.
  ➔Si **PCR positive**, **douteuse** et **ininterprétable**, la culture est réalisée individuellement à partir de chaque phase liquide des paires de broyats concerné(s).

2. Interprétation des résultats

a- **En présence de lésions :**

- Si PCR négative et histologie négative, l'interprétation du diagnostic est **négative.**
  Toutefois, la culture est maintenue ; en cas de résultat de culture positif avec identification de *M. bovis*, *M. tuberculosis ou M. caprae*, l'interprétation du diagnostic est **positive** (infection confirmée).

- Si PCR négative et histologie positive, l'expertise du **LNR est sollicitée** :
  ➔Si expertise moléculaire LNR positive à *M. bovis*, *M. tuberculosis ou M. caprae,*, l'interprétation du diagnostic est **positive**.
  ➔Si expertise moléculaire LNR négative ou douteuse le diagnostic sera **confirmé ou infirmé par la culture**.

- Si PCR positive, l'interprétation du diagnostic est **positive**. L'expertise du LNR n'est pas sollicitée. Toutefois, comme évoqué précédemment, la détermination du profil moléculaire de l'agent de la tuberculose peut être réalisée par la LNR sur l'ADN extrait au LAg.

- Si PCR douteuse ou ininterprétable, l'expertise du **LNR est sollicitée :**
  ➔Si expertise moléculaire LNR positive à *M. bovis, M. tuberculosis ou M. caprae,* l'interprétation du diagnostic est **positive.**
  ➔Si expertise moléculaire LNR négative ou douteuse le diagnostic **sera confirmé ou infirmé par la culture**.

b- **En l'absence de lésion :**

- Si PCR négative et culture négative, l'interprétation du diagnostic est négative.

- Si PCR négative et culture positive avec identification de *M. bovis*, *M. tuberculosis ou M. caprae*, l'interprétation du diagnostic est **positive**.

- Si PCR positive, l'interprétation du diagnostic est **positive**. L'expertise du LNR n'est pas sollicitée. Toutefois, comme évoqué précédemment, la détermination du profil moléculaire de l'agent de la tuberculose peut être réalisée par la LNR sur l'ADN extrait au LAg.

- Si PCR douteuse, l'expertise du **LNR est sollicitée :**
  ➔ Si expertise moléculaire LNR positive à *M. bovis*, l'interprétation du diagnostic est **positive**.
  ➔ Si expertise moléculaire LNR négative ou douteuse, le diagnostic sera confirmé ou infirmé par la culture.

- Si PCR ininterprétable, le diagnostic sera confirmé ou infirmée par la culture.

Cas C : abattage total

1. Analyses à réaliser

Afin d'isoler la souche de *M. bovis*, *M. tuberculosis ou M. caprae* sur laquelle le LNR pourra effectuer une caractérisation moléculaire, seule la culture individuelle est à réaliser sur tous les prélèvements à lésions.

2. Interprétation des résultats

- Si culture négative, l'interprétation du diagnostic est **négative.**

- Si culture positive, le LAg. Culture/PCR transmet au LNR la souche isolée pour identification et détermination du type moléculaire : Si le LNR identifie la souche comme étant *M. bovis*, *M. tuberculosis* ou *M. caprae*, l'interprétation du diagnostic est positive (infection confirmée). Autrement l'interprétation du diagnostic est négative ou ininterprétable.

- Si culture ininterprétable, il n'est pas possible de conclure.

Annexe II : Modèle de DTA (Diagnostic de tuberculose à l'abattoir)

DTA - Diagnostic de tuberculose à l'abattoir	30/10/2012

DDCSPP de l'Allier
Téléphone : 04 70 48 35 00
Mél : ddcspp@allier.gouv.fr (boîte urgence dd(cs)pp-urgence@dep.gouv.fr)

EDE :
EDE-

Bovin	Né le	Sexe	Race
		Femelle	38

Instruction : En cas d'abattage diagnostique, l'animal doit être abattu en fin de chaîne et doit faire l'objet d'une inspection renforcée (cf instruction nationale) et de prélèvements systématiques :

- En présence de lésion, prélever largement l'organe lésé.
- En l'absence ou présence de lésion, prélever au minimum un ganglion rétropharyngien, un ganglion médiastinal et un ganglion trachéobronchique et dans la mesure du possible un ganglion mésentérique.

Quelque soit le type d'abattage (diagnostique, total ou partiel), les prélèvements doivent être placés séparément dans des boîtes identifiées à l'aide des étiquettes ci-jointes, sans milieu de conservation.

La présente fiche doit être renseignée et copiée en trois exemplaires :

- Un exemplaire est destiné pour archive à l'abattoir
- Un exemplaire est transmis à la DDecPP du site d'origine
- Un exemplaire est remis au laboratoire avec les prélèvements

Partie à remplir par les services d'inspection à l'abattoir

Nom de l'abattoir	Numéro DEPADM Numéro d'agrément
Téléphone	Télécopie
Mél	
Nom du laboratoire	Département
Téléphone	Télécopie

Bilan de l'abattage diagnostique

Date d'abattage
Numéro de tuerie

O Présence de lésion — O Saisie totale
O Absence de lésion — O Saisie partielle

O Pas de lésion visible (ABS)

O Lésions localisées à un ou plusieurs noeuds lymphatiques d'une même région anatomique (NOEUD_LYMP)

O Lésions affectant un organe avec ou sans lésions visibles sur les noeuds lymphatiques de la même région anatomique (ORGANE)

O Lésions d'infiltration diffuses (lésions étendues, à bords flous), atteignant particulièrement le péritoine, la plèvre ou de multiples organes (DIFFUS)

(1) Code lésion

0 : Pas de lésions visibles (ABS)
1 : Lésions miliaires ou caséeuses (RECENT)
2 : Lésions caséo-calcaires, fibreuses ou calcifiées (ANCIEN)
3 : Caséum liquéfié restant sur place (abcès froid tuberculeux) ou s'évacuant (caverne tuberculeuse) (RAMOLISSEMENT)

Lésions et prélèvements

N°	Nature de l'organe	Code lésion (1)	Etiquettes
1			
2			
3			
4			
5			
6			

Annexe II¡: schémas de circulation des prélèvements et des résultats

