

## DIX ANNEES D'EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DE LA TUBERCULOSE BOVINE EN BELGIQUE \*

**Karl Walravens<sup>1</sup>, Caroline Allix<sup>2</sup>, Philip Supply<sup>3</sup>, Leen Rigouts<sup>4</sup>,  
Jacques Godfroid<sup>1</sup>, Marc Govaerts<sup>1</sup>, Françoise Portaels<sup>4</sup>,  
Jacques Dufey<sup>5</sup>, Luc Vanholme<sup>5</sup>, Maryse Fauville-Dufaux<sup>2</sup>  
et Claude Saegerman<sup>6</sup>**

**RESUME :** Suite à des décennies de lutte, l'incidence de troupeaux atteints de tuberculose bovine a diminué progressivement pour finalement passer sous le seuil de 0,1% depuis 1997. Actuellement, la tuberculose bovine à *Mycobacterium bovis* sévit encore à l'état sporadique. Depuis que la Belgique est reconnue officiellement indemne de tuberculose bovine en 2003 (décision 2003/467/CE), cinq à dix foyers sont identifiés annuellement. Afin de mieux comprendre l'épidémiologie de l'infection dans notre pays, le typage moléculaire des souches de *M. bovis*, isolées depuis 1995, a été réalisé. Entre août 1995 et novembre 2005, l'isolement de *M. bovis* a été réalisé dans 233 foyers de tuberculose. Les souches de *M. bovis* provenant de 93% de ces foyers de tuberculose ont été typées à l'aide des techniques de restriction fragment length polymorphism (RFLP IS6110) et de spoligotypage. Chacune de ces techniques présente une capacité de discrimination différente en fonction des génotypes, mais les deux techniques sont complémentaires. Ensemble, elles distinguent plus de 40 génotypes. La technique de mycobacterial interspersed repetitive unit - variable-number tandem repeat analysis (MIRU-VNTR), évaluée sur un échantillonnage de 128 souches, discrimine, à elle seule, les souches de façon similaire aux techniques précédentes mises en œuvre conjointement. D'autre part, la stabilité des profils obtenus par la technique de MIRU-VNTR a été démontrée sur un échantillonnage de souches isolées dans les mêmes exploitations bovines et dans des exploitations présentant des liens épidémiologiques documentés. Cette technique de typage performante et facile à mettre en œuvre remplacera progressivement les deux autres techniques. Entre 1995 et 2005, 12 lignées aux génotypes distincts ont été observées en Belgique. Une lignée est clairement dominante puisqu'elle représente 48% des exploitations infectées. Cette lignée est celle qui était associée à la recrudescence de la tuberculose bovine observée en province de Liège entre 1995 et 1996. D'autres lignées sont plus rarement isolées (maximum 9% des exploitations). L'analyse rétrospective montre que certaines lignées peuvent réapparaître plusieurs années après avoir été observées et que des souches nouvelles apparaissent ponctuellement. Deux souches non encore identifiées depuis 1995 sont ainsi apparues en 2004. Ce résultat suggère qu'en plus de la circulation des souches de *M. bovis* entre exploitations belges, d'autres voies d'introduction de la tuberculose bovine doivent être suspectées dans certaines exploitations. Le typage moléculaire continu des souches de *M. bovis* constitue un précieux outil pour (ré-) orienter les enquêtes épidémiologiques amenant à prendre des mesures appropriées de gestion.

**Mots-clés :** Tuberculose, Belgique, bovins, épidémiologie moléculaire.

\* Texte de la communication orale présentée à la Journée AESA-AEEMA, 19 mai 2006

<sup>1</sup> Centre d'Etudes et de Recherches Vétérinaires et Agrochimiques, Groeselenberg 99, 1180 Uccle, Belgique

<sup>2</sup> Laboratoire Tuberculose et Mycobactéries, Institut Pasteur Bruxelles, rue Engeland 642, 1180 Bruxelles, Belgique

<sup>3</sup> INSERM U629, Laboratoire des Mécanismes Moléculaires de la Pathogenèse Bactérienne, Institut Pasteur de Lille, rue du Professeur Calmette 1, BP 245, 59019 Lille Cedex, France

<sup>4</sup> Institut de Médecine Tropicale, Nationalestraat 155, Anvers, Belgique

<sup>5</sup> Agence fédérale pour la Sécurité de la chaîne alimentaire, Avenue Simon Bolivar 30, 1000 Bruxelles, Belgique

<sup>6</sup> Epidémiologie et analyse de risques appliquées aux sciences vétérinaires, Département des maladies infectieuses et parasitaires, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Liège, 4000 Liège, Belgique.

Adresse de correspondance : CERVA, Section de Maladies Bactériennes et Immunologie, Département de Bactériologie et Immunologie, Groeselenberg 99, 1180 Uccle, Belgique. Téléphone : (32) 2 379 13 03, fax (32) 2 379 13 37, e-mail : [kawal@var.fgov.be](mailto:kawal@var.fgov.be)

**SUMMARY:** After decades of control and eradication programs, the herd incidence of bovine tuberculosis diminished progressively under the 0,1% threshold since 1997. Currently, bovine tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* is still sporadic. Since Belgium was recognised officially free of bovine tuberculosis in 2003 (decision 2003/467/CE), 5 to 10 infected herds are identified yearly. In order to better understand the epidemiology of the infection in our country, the molecular typing of the strains of *M. bovis*, isolated since 1995, was done. Between August 1995 and November 2005, the isolation of *M. bovis* was done in 233 cattle herds. The isolates of *M. bovis* originating of 93% of these infected herds were typed by restriction techniques fragment length polymorphism (RFLP IS6110) and spoligotyping. Each of these techniques presents a different discriminatory power according to the genotypes, but the two techniques are complementary. Together, they distinguish more than 40 genotypes. The technique of mycobacterial interspersed repetitive unites - variable number tandem repeat analysis (MIRU-VNTR), evaluated on a sample of 128 isolates, differentiate the *M. bovis* strains, similarly to the two other techniques implemented together. On the other hand, the stability of the profiles obtained by the MIRU-VNTR technique was shown on a sample of isolated strains originating from the same cattle flock and in herds presenting documented epidemiological links. This technique, easy to implement and highly performant, will replace progressively the two others typing techniques. Between 1995 and 2005, 12 lineages with distinct genotypes were observed in Belgium. A lineage is clearly dominating since it represents 48% of the infected herds. This lineage was associated with the new peak of incidence of bovine tuberculosis observed in the province of Liège between 1995 and 1996. Other lineages are more rarely observed (maximum 9% of the infected herds). A retrospective analysis shows that certain lineages can reappear several years after having been observed and that new type of strains appears punctually. Two type of strains that were never observed since 1995 appeared in 2004. This result suggests that in addition to the circulation of strains of *M. bovis* between Belgian flocks, other ways of introduction of bovine tuberculosis must be suspected in certain case. The continuous molecular typing of the isolated strains of *M. bovis* constitutes a precious tool for the re-orientation of the epidemiological investigations leading to take appropriate management measures.

**Keywords:** Tuberculosis, Belgium, bovine, molecular epidemiology.




---

## I - INTRODUCTION

---

La tuberculose bovine est une maladie dont l'agent est *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), une bactérie faisant partie d'un complexe dans lequel on retrouve *M. tuberculosis* (agent de la tuberculose humaine), *M. africanum* et *M. microti*. Contrairement à l'agent de la tuberculose humaine, *M. bovis* peut infecter de nombreuses espèces animale [Cousins et Florisson, 2005] et parfois l'homme [Thoen *et al.*, 2006]. C'est parce que *M. bovis* est un agent de zoonose que des programmes d'éradications ont été mis en œuvre, entre autres, dans les pays européens. La prévalence de l'infection est très variable d'une région à l'autre, mais d'une façon générale on distingue en Europe des pays biologiquement indemnes, des pays ou régions officiellement indemnes (pays ou région où, notamment, la prévalence annuelle de troupeaux infectés n'a pas dépassé 0,1% pendant les six dernières

années) et des pays où l'infection est enzootique, voire résurgente [European Food Safety Authority, 2005].

En Belgique, suite à des décennies de lutte, l'incidence de troupeaux infectés de tuberculose bovine a diminué progressivement pour finalement passer sous le seuil de 0,1% depuis 1997. Par ailleurs, depuis 1993, le contrôle de la tuberculose est basé sur les tuberculinations à l'achat, l'examen *post mortem* systématique des carcasses des animaux abattus, l'examen des cadavres autopsiés dans les laboratoires de diagnostic vétérinaire et les contrôles par intradermo-tuberculination des animaux provenant des troupeaux soumis à un risque d'infection au départ des exploitations infectées. Lors de la mise en évidence de lésions suspectes de tuberculose, un échantillon de tissu lésionnel

est envoyé au laboratoire pour analyse. En outre, une tuberculination générale de tous les bovins et une enquête épidémiologique sont immédiatement réalisées dans l'exploitation d'origine.

La Belgique est reconnue officiellement indemne de tuberculose bovine depuis 2003 (décision 2003/467/CE) et, jusqu'à présent, aucun isolement de *M. bovis* n'a été réalisé d'un animal de la faune sauvage.

Actuellement, la tuberculose bovine à *Mycobacterium bovis* sévit à l'état sporadique et l'éradication « biologique » s'avère très difficile. Depuis que la Belgique est reconnue officiellement indemne de tuberculose bovine, cinq à dix foyers sont identifiés annuellement. Afin de mieux comprendre l'épidémiologie de l'infection dans notre pays, le typage moléculaire systématique des souches isolées depuis 1995 a été réalisé.

---

## II - TECHNIQUES DE TYPAGE DE *MYCOBACTERIUM BOVIS*

---

De nombreuses techniques de typage moléculaire des Mycobactéries du complexe tuberculosis ont été décrites. Trois se sont imposées pour le typage de *Mycobacterium tuberculosis* car elles présentaient un bon équilibre entre leur capacité de discrimination et leur stabilité et pouvaient être standardisées. Ces trois techniques sont la « RFLP IS6110 » (Restriction fragment length polymorphism, basée sur la séquence d'insertion IS6110), le spoligotypage et le typage sur base de VNTRs (Variable number tandem repeats).

### 1. LA TECHNIQUE RFLP

Cette technique consiste à digérer le chromosome bactérien à l'aide d'un enzyme de restriction. Les fragments produits après avoir été séparés sur un gel d'agarose sont transférés sur une membrane avant d'être mis en présence d'une sonde composée d'un fragment de la séquence du gène de l'IS6110 [van Soolingen *et al.*, 1991]. Un profil de bandes de différentes tailles est ainsi observé en fonction du nombre de copies et des positions de la séquence IS6110 dans le génome de la souche analysée. Deux désavantages sont associés à cette technique. Premièrement, la nécessité d'une grande

quantité d'ADN impose des cultures abondantes ce qui rallonge le temps d'analyse et pose des problèmes de biosécurité. D'autre part, il a été suggéré que la capacité de discrimination de la technique soit liée au nombre de séquences IS6110 et qu'en particulier, les souches en contenant un faible nombre (seuil généralement situé à < 6) sont mal distinguées. Cette technique a été la première utilisée couramment pour le typage des souches de *M. tuberculosis*, mais n'est pas parvenue à s'imposer comme un outil pour le typage de *M. bovis* [Cousins *et al.*, 1998 ; Haddad *et al.*, 2004]. La raison principale étant que *M. bovis* contient une seule ou peu de séquences d'insertion IS6110, ce qui rend cette méthode peu discriminante. En appliquant cette méthode sur les souches isolées en Belgique, il a toutefois été observé que s'il est vrai que de nombreuses souches présentaient une seule séquence et ne pouvaient donc pas être distinguées entre elles, d'autres lignées comportaient de nombreuses répétitions de l'IS6110. Il a pu ainsi être démontré que cet élément génétique qui n'avait pas la réputation d'être actif chez *M. bovis*, s'était dupliqué et inséré à divers endroits du génome chez certaines souches bactériennes circulant en Belgique (tableau 1).

**Tableau 1**  
**Liste des différents types de *M. bovis* identifiés en Belgique de 1995 à 2005**  
**et regroupement en lignées probables**

RFLP		Spoligotype		VNTR						Lignée probable	
Code CERVA	Profil type	Code CERVA	Code Standard (www.Mbovis.org)	MIRU 26	ETR B	VNTR 3232	ETR-A	QUB 11a	QUB11b		
A	[Image]	3	SB0134	4-5	2	4-5-6	1-3-4	6	4	I	
		10	SB0991	5	4	nd	6	10	nd	I	
		15	SB0824	5	3	6	3	10	4	I	
		21	SB0992	5	4	5	6	10	4	I	
		23	SB1086	5	3	4	6	10	3	I	
			SB1086	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	I
		5	SB0867	5	4	3	6	9-10	3	II	
		7	SB0128	4	3	6	3	10	3-4	III	
		8	SB0054	5	5	10	5	10	4	III	
		9	SB0990	5	5	12	7	9et10	3	III	
		4	SB0885	5	4	9	7	11	4	IV	
		11	SB0121	5	4	7-9	5-6	10	2	V	
		12	SB0265	5	4	4	5	7	2	V	
		14	SB0119	5	4	7	5	10	2	V	
20	SB0295	5	4	7	6	10	2	V			
F-1	[Image]	3	SB0134	5	8	6	6	10	4	VI	
G	[Image]	1	SB0162	6	5	4-7	4-5	10	3-4	VII	
H	[Image]	11	SB0121	4-5	3-7	3	5-6	9-10	2	VIII	
J	[Image]	2	SB0120	4	3	10	5	10	4	VIII	
		2	SB0120	4	2	6	5	7	4	VIII	
		2	SB0120	5	3et4	3	3	9et10	3et4	VIII	
L	[Image]	16	SB0924	4	3	5-6	9	8-9	2	IX	
K	[Image]	2	SB0120	5	5	6	5	10-11	4	X	
X	[Image]	22	SB1085	5	5	4	3	10	4	XI	
M	[Image]	13	SB0426	2	4	7	6	10	2	XII	

## 2. LE SPOLIGOTYPAGE

Dans le locus appelé Direct Repeat (DR), contenant par ailleurs le site d'insertion présumé primaire de la séquence IS6110, se trouvent de multiples copies de séquences répétées et identiques, entre chacune desquelles on retrouve des séquences uniques (appelées spacers). L'amplification par PCR des séquences spécifiques peut être réalisée à l'aide d'un seul couple d'oligonucléotide dirigé contre les séquences répétées. L'absence ou la présence de ces séquences uniques peut alors être révélée par hybridation sur des sondes de référence immobilisées sur une membrane [Kamerbeek *et al.*, 1997]. Cette technique s'appelle le spoligotypage (sp pour spacer et oligo pour oligonucléotide). Il se trouve que cette portion du génome est polymorphe et que des fragments

disparaissent chez certaines souches [Aranaz *et al.*, 1996 ; Cousins *et al.*, 1998]. Cette technique est facile à mettre en œuvre, c'est pourquoi elle est largement répandue. La standardisation est également aisée ce qui facilite les comparaisons entre publications. Cette technique permet de distinguer de nombreuses souches présentant un profil RFLP IS6110 identique à une seule bande. Cependant, parmi les souches à plusieurs bandes, cette technique est connue pour être moins discriminante que la RFLP. Il a été constaté que plusieurs souches aux profils RFLP distincts présentaient le même profil en spoligotypage. Ces deux techniques sont complémentaires et, utilisées conjointement, permettent d'avoir une meilleure capacité discriminante (tableau 2).

Tableau 2

**Nombre de patterns différents et pouvoir discriminatoire calculé des trois techniques de typage prises séparément ou combinées<sup>b</sup>.**

Légende :

<sup>a</sup> 6 locus: VNTR 3232, ETR-B, ETR-A, MIRU-26, QUB11b, QUB11a.

<sup>b</sup> Cette analyse a été réalisée sur 127 isolats. La diversité génomique a été utilisée comme mesure de la capacité de discrimination. Celle-ci est définie par la formule :  $1 - \sum x_i^2 / [(n/n-1)]$  où n est le nombre total de génotypes et xi la fréquence du génotype i.

Techniques	Nombre de profils différents	Diversité génotypique
IS6110-RFLP	16	0.73
Spoligotyping	17	0.85
MIRU-VNTR 29 loci	32	0.91
IS6110-RFLP + Spoligotyping	28	0.92
Spoligotyping + VNTR 29 loci	32	0.91
IS6110-RFLP + VNTR 29 loci	37	0.95
IS6110-RFLP + Spoligotyping + VNTR 29 loci	37	0.95
Spoligotyping + VNTR 6 loci <sup>a</sup>	29	0.90
IS6110-RFLP + VNTR 6 loci <sup>a</sup>	35	0.94
IS6110-RFLP + Spoligotyping + VNTR 6 loci <sup>a</sup>	35	0.94

### 3. TECHNIQUE VNTR

Cette technique dirigée contre des séquences répétitives dispersées dans le génome aussi appelées MIRUs (Mycobacterial Interspersed repetitive units ; d'où le terme de MIRU-VNTR) est encore appelée MLVA (Multi Locus Variable number tandem repeat Analysis). Cette technique consiste à amplifier par PCR des locus génomiques qui contiennent des séquences répétées en tandem en nombre variable suivant les souches. Ces régions génomiques sont aussi appelées minisatellites par analogie à certaines séquences de génomes eucaryotes. La taille du produit d'amplification indiquera le nombre de répétitions de la région spécifique. Cette analyse, réalisée sur différents locus dispersés sur le génome de la bactérie, est à la fois simple, peu coûteuse et standardisable. Cette technique a d'abord été validée pour *M. tuberculosis* [Frothingham, 1998 ; Magdalena *et al.*, 1998a et b ; Supply *et al.*, 2001] et ensuite pour *M. bovis* [Roring *et al.*, 2002 ; Allix *et al.*, 2006]. Une partie du présent travail a consisté à évaluer sur différents panels de souches la capacité discriminante et la stabilité

de 29 locus à MIRU-VNTR. L'analyse d'un premier panel de 127 souches différenciées sur base des analyses RFLP et spoligotypage montre que cette technique est plus discriminante que les deux autres techniques prises séparément (tableau 2), et aussi discriminante que ces deux autres techniques prises de façon combinée. La capacité de discrimination de la technique MIRU-VNTR est telle que l'association des trois techniques ne permet pas d'augmenter sensiblement la discrimination des souches. L'excellente corrélation entre les résultats de typage obtenus par les trois techniques est compatible avec la théorie de l'expansion clonale. Ce premier travail a également permis de définir les meilleurs marqueurs candidats donnant une discrimination élevée, afin de limiter le nombre de locus à analyser. Ainsi, 88% de la résolution maximale de la technique MIRU-VNTR a été obtenue en utilisant seulement 6 locus sur 29 (VNTR 3232, ETR-A and B, MIRU 26, QUB 11a and 11b).

Un deuxième panel d'isolats a permis d'analyser la stabilité clonale des profils VNTR observés. Ces isolats provenaient d'une seule

ferme, et donc supposés *a priori* résulter d'un seul événement d'infection par une même souche d'origine (hypothèse la plus probable vu la faible incidence de tuberculose bovine dans le pays), et de fermes ayant un lien épidémiologique établi entre elles. Les isolats

ont trait à des périodes s'étalant de deux à quatre ans. L'analyse montre que les génotypes définis sur les 29 marqueurs MIRU-VNTR étaient très stables chez des souches isolées sur cette période de temps [voir Allix *et al.*, 2006].

---

### III - ANALYSE DESCRIPTIVE DES TYPES DE *M. BOVIS* CIRCULANT EN BELGIQUE

---

L'étude longitudinale des souches de *M. bovis* isolées en Belgique a permis l'analyse de 94.5% des foyers de tuberculose sur la période située entre août 1995 et décembre 2005. Au total, 451 isolats provenant de 204 foyers ont été typés par les techniques RFLP et de spoligotypage. Un total de 127 souches isolées entre 1995 et 2002 représentant tous les profils RFLP et spoligotypes observés sur cette période a également été analysé par la technique MIRU-VNTR. Depuis 2004, l'ensemble des souches isolées ont été analysées par MIRU-VNTR. Cette analyse a permis d'identifier 42 profils distincts. Ces profils peuvent être regroupés en un minimum de 12 lignées sur base des différences claires et marquées de leurs profils RFLP, spoligotype et VNTR respectifs (tableau 1). Les critères actuellement établis pour regrouper les souches dans une même lignée sont : pour la RFLP, un maximum de deux séquences IS6110 de différence, les autres bandes étant de même taille ; pour le spoligotypage, deux spots de différences et pour le VNTR une différence observé sur un maximum de quatre locus. La définition de lignée devra être approfondie sur base d'analyses moléculaires complémentaires et d'un suivi longitudinal de souches isolées de foyers ayant des liens épidémiologiques établis entre eux. Une lignée est constituée de plusieurs variants dont il n'est pas possible actuellement d'exclure un quelconque lien entre eux sur une échelle de temps de plusieurs années. Dans quelques rares cas, des variants proches entre eux sont parfois associés dans les mêmes exploitations ce qui renforce la définition de liens objectifs entre ceux-ci.

Une lignée (lignée VII) est clairement dominante puisqu'elle est identifiée dans 48% des troupeaux foyers de tuberculose sur la période considérée. Cette lignée est caractérisée par des profils avec de huit à 11 séquences IS6110, un profil spoligotype

unique et six profils VNTR ne différant que dans trois locus. Cette lignée de souches est associée au premier pic de prévalence observé dans la région de Huy – Hannut – Waremme lors des hivers 1995-1996 (figure 1). Un deuxième pic de prévalence observé en 2002 est aussi caractérisé par l'isolement subséquent de cette lignée dans de nombreux foyers. L'ensemble de ces foyers sont épidémiologiquement liés à un foyer non détecté de 1996 où une souche similaire a été isolée en 2002. Il est intéressant de noter que la distribution géographique de cette lignée de souche reste majoritairement concentrée dans la région de Huy – Hannut - Waremme. Au cours du temps, une diversité des profils RFLP a été observée au sein de cette lignée. Neuf variants ont ainsi pu être identifiés par cette technique. Cette observation montre que la technique RFLP est très sensible, mais vu le nombre important d'exploitations où deux variants ont été observés, des critères d'interprétation rigoureux doivent donc être mis en œuvre et, dans le cas présent, il a été considéré que tous les variants comportant de huit à 11 séquences IS6110 font partie d'une même lignée. Une certaine variabilité de cette lignée dominante est également observée au travers l'analyse VNTR puisque six variants ont été détectés par cette technique.

D'autres lignées apparaissent également de façon régulière (figure 1). Ces lignées présentent des types RFLP et spoligotypes plus classiques (profils RFLP à une, voire quelques bandes, et profils spoligotype déjà décrits dans la littérature). Outre ces lignées pour lesquelles des isolements plus ou moins fréquents sont observés, quatre exploitations étaient infectées par un type de souche de *M. bovis* unique à chaque exploitation. Deux de ces souches furent isolées de bovins importés. Les deux autres foyers restent actuellement sans origine connue. Ce résultat démontre qu'en plus de la circulation des souches de *M.*

*bovis* entre exploitations belges, d'autres voies d'introduction de la tuberculose bovine doivent être suspectées dans certaines fermes. Certaines souches similaires sont également détectées dans différentes exploitations où l'isolement est séparé de six voire neuf années. Cette observation suggère que soit ces exploitations ont été infectées par une seule et même source, soit que le foyer identifié récemment est lié au plus ancien (recrudescence). Dans cette dernière

hypothèse, la problématique d'un plan d'assainissement approprié est posée.

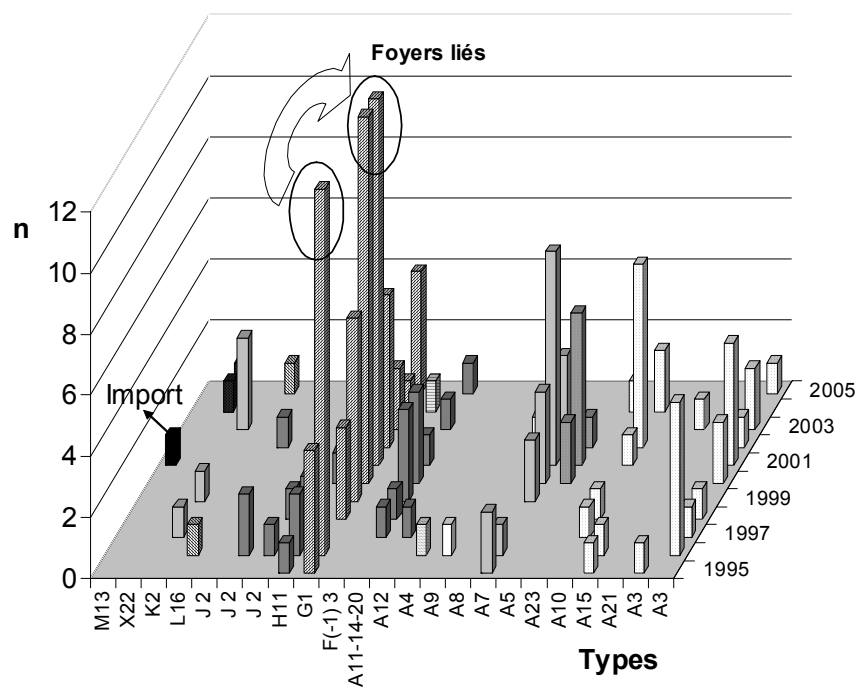
Dans seulement deux exploitations, deux types très distincts ont été retrouvés simultanément, signant, très vraisemblablement, une double contamination du cheptel par deux origines différentes. Cette observation rare confirme notre hypothèse d'origine de contamination unique pour la plupart des foyers de tuberculose en Belgique.

Figure 1

**Distribution temporelle des lignées et variants principaux d'isolats<sup>a</sup> de *M. bovis* identifiés en Belgique entre 1995 et 2005.**

Légende :

<sup>a</sup> La traduction des types est décrite dans le tableau 1, la lettre correspondant au code CERVA pour définir le type RFLP-*IS6110* et le chiffre équivaut au code CERVA pour le spoligotype. Chaque pattern réfère à une lignée telle que décrite dans le tableau 1.



#### IV - DISCUSSION

Suite à des décennies de lutte, l'incidence de troupeaux infectés de tuberculose bovine en Belgique est progressivement passée sous le seuil de 0,1% en 1997. Depuis que la Belgique a été reconnue officiellement indemne de tuberculose bovine en 2003, la maladie sévit à l'état sporadique (cinq à dix foyers sont

identifiés chaque année). La persistance de cette infection, à bas bruit, conduit régulièrement les autorités vétérinaires à envisager de réorienter le réseau d'épidémiologie de la tuberculose bovine.

Le suivi des animaux en amont et en aval des

foyers a pour but de tarir le plus rapidement possible la source de l'infection et les foyers secondaires qui en résultent. Le système belge d'identification et d'enregistrement des animaux (Sanitel) constitue le support de cette traçabilité. Le typage moléculaire à haute résolution et en temps réel (sur base de technique PCR) des souches de *M. bovis*, est un outil complémentaire. Si ce typage est continu et complet (tous les foyers doivent être analysés), il permettra en premier lieu d'infirmier ou de confirmer des hypothèses concernant les sources d'infection (déterminées lors des enquêtes épidémiologiques). Dans certains cas, il

permettra également de poser des questions complémentaires dont la résolution nécessitera la mise en œuvre d'enquêtes épidémiologiques complémentaires. Lorsque les résultats des enquêtes épidémiologiques, de typage moléculaire et des requêtes de suivi seront associés de façon dynamique, ils formeront un ensemble cohérent permettant de (ré-)orienter les enquêtes épidémiologiques amenant à prendre des mesures appropriées de gestion. Le but ultime de ce travail étant de contribuer à l'analyse de risque qui permettra à l'avenir de définir des axes pour améliorer la stratégie de contrôle.

---

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Allix C., Walravens K., Saegerman C., Godfroid J., Supply P., Fauville-Dufaux M. - Variable Number of Tandem Repeat genotyping of *Mycobacterium bovis*: evaluation of the epidemiological relevance and comparison with IS6110 RFLP and spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, **44**(6), 1951-1962.
- Aranaz A., Liebana E., Mateos A., Dominguez L., Vidal D., Domingo M., Gonzolez O., Rodriguez-Ferri E.F., Bunschoten A.E., Van Embden J.D., Cousins D. - Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, **34**(11), 2734-2740.
- Cousins D., Williams S., Liebana E., Aranaz A., Bunschoten A., Van Embden J., Ellis T. - Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, **36**(1), 168-178.
- Cousins D.V., Florisson N. - A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species. *Rev. sci. tech. OIE*, 2005, **24**(3), 1039-1059.
- European Food Safety Authority. - Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*. In Trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European union in 2004. *The EFSA Journal*, 2005, **310**, 136-142.
- Frothingham R., Meeker-O'Connell W.A. - Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology*, 1998, **144**(5), 1189-1196.
- Gutacker M.M., Mathema B., Soini H., Shashkina E., Kreiswirth B.N., Graviss E.A., Musser J.M. - Single-nucleotide polymorphism-based population genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from 4 geographic sites. *J. Infect. Dis.*, 2006, **193**(1), 121-128.
- Haddad N, Masselot M, Durand B. - Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. *Res Vet Sci*. 2004, **76**(1), 1-18.
- Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., van Agterveld M., van Soolingen D., Kuijper S., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M., van Embden J. - Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, **35**(4), 907-914.
- Magdalena J., Supply P., Locht C. A Specific differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.*, 1998a, **36**(9), 2471-2476.
- Magdalena J., Vachee A., Supply P., Locht C.- Identification of a new DNA region specific for members of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.*, 1998b, **36**(4), 937-943.



- Roring S., Scott A., Brittain D., Walker I., Hewinson G., Neill S., Skuce R. - Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, **40**(6), 2126-2133.
- Supply P., Lesjean S., Savine E., Kremer K., van Soolingen D., Locht C. - Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, **39**(10), 3563-3571.
- Thoen C., Lobue P., de Kantor I. - The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet. Microbiol.*, 2006, **112**(2-4), 339-345.
- van Soolingen D., Hermans P.W., de Haas P.E., Soll D.R., van Embden J.D. - Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, 1991, **29**(11), 2578-2586.

