

PARTICULARITÉS DU DÉPISTAGE ET DU DIAGNOSTIC DE LA TUBERCULOSE BOVINE *

Nicolas Keck¹, Jean-Louis Moyen², Éric Gueneau³ et Maria-Laura Boschioli⁴

RÉSUMÉ

L'émergence de foyers de tuberculose dans certaines zones géographiques a rendu nécessaire le renforcement des mesures de surveillance et de gestion. Celles-ci doivent reposer sur des méthodes de dépistage dans les élevages et de diagnostic *post-mortem* adaptées. Certaines caractéristiques épidémiologiques, pathogéniques et immunologiques de la maladie limitent cependant les performances des tests disponibles. Une détection précoce de l'infection chez les animaux vivants est possible par des tests fondés sur la détection d'une immunité cellulaire (IMC). L'utilisation d'antigènes spécifiques des mycobactéries du complexe de *M. tuberculosis* a renforcé la spécificité de ces tests, qui reste néanmoins à améliorer. Le dosage des anticorps est généralement considéré comme peu sensible mais pourrait permettre d'améliorer la sensibilité du dépistage pour certaines catégories d'animaux non dépistées par les tests IMC, notamment ceux considérés comme anergiques. Le diagnostic de la maladie à partir d'échantillons prélevés à l'abattoir associe désormais des techniques moléculaires au diagnostic bactériologique et histologique pour améliorer la sensibilité du diagnostic et réduire le délai d'analyse. Le dépistage/diagnostic de la tuberculose bovine représente un challenge permanent et évolutif, du fait qu'aucun test n'est capable de détecter tous les cheptels infectés ou tous les animaux infectés d'un foyer, et que leurs performances varient notablement selon le contexte épidémiologique. Par ailleurs, les différents tests détectent l'infection à des stades évolutifs variés, ce qui peut entraîner des résultats contradictoires. Il est donc nécessaire d'associer les tests entre eux afin d'élaborer des schémas diagnostiques adaptés, soit pour améliorer la sensibilité de détection des animaux infectés (utilisation en parallèle), soit pour améliorer la spécificité (utilisation en série). Les conditions de cette association et la façon dont les résultats sont interprétés dans le cadre des mesures de gestion doivent être définies sur la base de données scientifiques, obtenues dans diverses situations épidémiologiques. L'évolution technologique et la diminution du coût d'accès à certaines techniques de pointe ou alternatives offrent des perspectives intéressantes pour le futur, qui seront évaluées par certaines actions de recherche. Ceci permettra de faire évoluer les schémas diagnostiques et d'adapter le réseau des laboratoires à ces évolutions.

Mots-clés : tuberculose, bovin, diagnostic, dépistage.

SUMMARY

The emergence of tuberculosis outbreaks in certain geographical areas of France has led to strengthening of surveillance and management methods. They have to rely on adapted herd screening methods and *post-mortem* diagnostic tests. However, certain epidemiological, immunological and pathogenic characteristics of the disease can constrain performance of the available tests.

.../..

* Texte de la conférence présentée au cours de la Journée scientifique AEEMA-RFSA, 18 mars 2014

¹ Laboratoire départemental vétérinaire de l'Hérault, 306 rue Croix de Las Cazes, CS 69013, 34967 Montpellier Cedex 02, France

² Laboratoire départemental d'analyses et de recherche, 161 avenue Winston Churchill, 24660 Coulounieix Chamiers, France

³ Laboratoire départemental de la Côte-d'Or, 2 ter rue Hoche, BP 71778, 21017 Dijon Cedex, France

⁴ Anses, Laboratoire de santé animale, 23, av. du Général-de-Gaulle, 94706 Maisons-Alfort Cedex, France

.../..

An early detection of the infection in live animals is possible with cellular mediated immunology (CMI) based tests, such as intradermotuberculation and the gamma interferon test. The use of specific antigens of *Mycobacterium tuberculosis* complex species has enhanced the specificity of the latter, which however still needs to be improved. The antibody-based assays are generally considered as poorly sensitive, although they can improve detection of animals with particular infectious status which are not recognized by CMI-based tests, such as anergic animals. Direct diagnosis with samples taken at the slaughterhouse combines nowadays molecular and bacteriological techniques, as well as histologic examination, in order to improve diagnostic sensitivity and reduce the infection confirmation delays. The diagnosis of bovine tuberculosis remains extremely challenging, as there is currently no single test able to identify all infected animals, and the performance estimates for the tests can be dependent upon local epidemiological patterns within the studied animal population. Consequently, a combination of approaches is needed to achieve an adequate level of diagnosis, in order to improve either the sensitivity (parallel testing) or the specificity (serial testing). The conditions in which screening and diagnostic tests can be associated and their results interpreted for the implementation of management measures should be defined according to scientific data coming from different epidemiological situations. The easier and less costly use of certain sophisticated techniques open interesting perspectives for the future, requiring being evaluated beforehand by research studies. They will lead to the development of diagnostic schemes and to the adaptation of the laboratory network to these evolutions.

Keywords: Tuberculosis, Bovine, Diagnosis, Screening.



I - INTRODUCTION

Bien qu'à l'échelle du pays la situation épidémiologique de la tuberculose bovine soit globalement favorable, elle reste contrastée par la présence de foyers difficiles à éradiquer dans certaines zones géographiques [Fedievsky *et al.*, 2013]. La maîtrise de l'infection sur le territoire national repose sur la détection et l'élimination des foyers, donc sur des méthodes de dépistage dans les élevages et de diagnostic post-mortem adaptées. La surveillance doit permettre la détection des cheptels infectés à un stade précoce de la maladie. Par ailleurs, le recours de plus en plus fréquent à l'assainissement par abattage partiel requiert des outils de dépistage sensibles et précoces pour éviter de requalifier à tort des élevages encore infectés. Ceci ne doit néanmoins pas s'effectuer au détriment trop marqué de la spécificité car un faible taux de confirmation des abattages diagnostiques est un facteur de découragement des acteurs de terrain. Cet article présente les principales difficultés posées par le dépistage et le diagnostic de la tuberculose, les caractéristiques des tests actuellement disponibles, et les besoins de recherche pour les

améliorer ou mieux les utiliser afin de définir des schémas diagnostiques adaptés.

1. DÉPISTAGE

1.1. CONTRAINTES BIOLOGIQUES ET ÉPIDÉMIOLOGIQUES

La tuberculose est une maladie d'évolution chronique, pouvant affecter des organes variés. Excepté pour les cas les plus avancés, l'infection est le plus souvent inapparente, ou les symptômes peu spécifiques. Cependant, les animaux infectés peuvent transmettre la maladie bien avant l'apparition des signes cliniques ou des lésions. Il est donc obligatoire de recourir à des tests biologiques de dépistage pour la surveillance, capables de détecter des animaux infectés à un stade précoce de la maladie. Les performances requises pour ces tests doivent répondre à quatre contraintes principales, inhérentes aux infections tuberculeuses :

- Faible prévalence (cheptels et intra-cheptel) : en situation épidémiologique favorable, cette

prévalence est le plus souvent inférieure à 1 %, ce qui affecte négativement la valeur prédictive positive (VPP) des tests de dépistage. Ainsi, dans des zones géographiques où la prévalence est inférieure à 1 %, il est difficile de discriminer un faux positif d'un vrai infecté, même avec des tests offrant une spécificité correcte, supérieure à 99 % ;

- Infections latentes : il s'agit d'un phénomène bien connu lors des infections humaines à *M. tuberculosis* (estimé à environ 1/3 de la population mondiale), et même à *M. bovis* [Parrish *et al.*, 1998 ; Larsen *et al.*, 2008]. Une partie des individus exposés aux mycobactéries peut développer une infection à l'état dormant pendant une longue période, susceptible de se réactiver, probablement du fait de la modification de la réponse immunitaire de l'hôte [Parrish *et al.*, 1998 ; Arriaga *et al.*, 2002]. Ce phénomène est moins bien connu chez l'animal, bien que des éléments concordants évoquent fortement cette possibilité [Pollock et Neill, 2002 ; Cassidy, 2006 ; Alvarez *et al.*, 2009], ce qui pourrait représenter une limite importante des programmes d'assainissement des cheptels ;
- Il existe un très grand nombre d'espèces de mycobactéries présentes dans l'environnement, et de façon inégale selon les milieux. Elles possèdent de nombreux antigènes communs avec les mycobactéries pathogènes et peuvent occasionner des réactions faussement positives en dépistage. Par ailleurs, des co-infections par *M. bovis* et des mycobactéries non tuberculeuses, notamment *M. paratuberculosis*, peuvent altérer la sensibilité des tests [Alvarez *et al.*, 2008] ;
- L'évolution lente de la maladie au sein des troupeaux entraîne la coexistence d'animaux aux statuts infectieux différents, correspondant à des processus pathologiques détectés par des tests ne ciblant pas les mêmes réactions biologiques.

Par ailleurs, la réaction immunitaire mise en œuvre par les bovins infectés implique principalement les réactions à médiation cellulaire (IMC), l'immunité humorale étant considérée comme très tardive [Pollock *et al.*, 2005]. Les tests de dépistage doivent donc reposer sur la mise en évidence de cette IMC, par des techniques plus complexes que la recherche d'anticorps spécifiques, largement

utilisée pour le dépistage des maladies infectieuses.

1.2. IMMUNOLOGIE DE LA TUBERCULOSE

L'infection par *M. bovis* induit des réactions immunitaires complexes, fondées sur un équilibre permanent entre immunité à médiation cellulaire (IMC) et humorale, s'orientant progressivement au détriment de l'IMC au fur et à mesure que la maladie s'installe [Vordermeier *et al.*, 2004].

L'immunité humorale est généralement considérée comme peu protectrice, bien que certaines études aient conduit à modérer ce jugement [Pollock et Neill, 2002]. Ces phénomènes sont schématisés selon le modèle théorique représenté figure 1, bien connu s'agissant des infections par les mycobactéries, mais qui ne représente néanmoins probablement pas tous les cas [Creignou-Mercier, 2009].

La virulence de la souche et la dose infectante ont un effet marqué sur l'évolution de l'infection et le développement de la maladie. Lors d'infections expérimentales, l'intensité de la réponse immunitaire serait proportionnelle à la concentration bactérienne utilisée pour l'épreuve virulente : une concentration élevée entraîne un développement rapide (en quelques semaines) d'une IMC élevée et d'anticorps, tandis qu'une dose plus faible entraînerait un développement plus progressif de l'IMC et une absence d'immunité humorale [Pollock et Neill, 2002]. Dans certaines circonstances, les animaux deviennent anergiques, sans IMC détectable, mais peuvent avoir un taux d'anticorps circulants élevé [Neill *et al.*, 1994]. L'exposition à une mycobactérie peut induire une réponse en anticorps transitoire pouvant être réactivée par une nouvelle exposition à des antigènes mycobactériens (tuberculines), y compris en l'absence de la mycobactérie à l'origine de l'infection [Waters *et al.*, 2010].

1.3. MISE EN ÉVIDENCE DE L'IMMUNITÉ CELLULAIRE

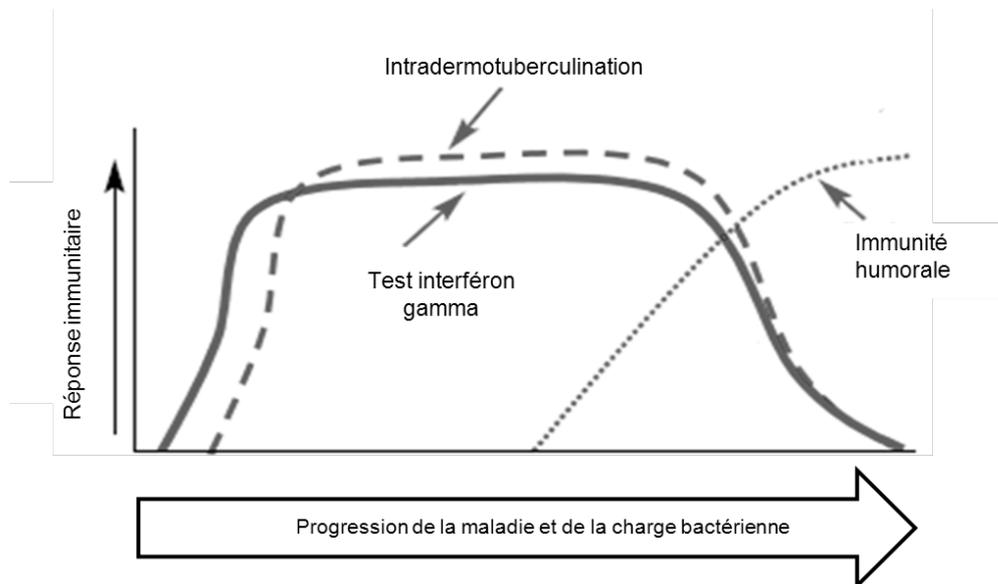
1.3.1. Intradermotuberculation

Les tests d'intradermotuberculation (ID), toujours considérés comme une référence dans le cadre des échanges internationaux [Anonyme, 2013a], ont permis à de nombreux pays européens, dont la France, d'obtenir le statut « officiellement indemne » de tuberculose [Good et Duignan, 2011].

Figure 1

**Représentation schématique de l'évolution au cours du temps de la réponse immunitaire
chez des animaux infectés par la tuberculose bovine**

d'après [Vordermeier *et al.*, 2004]



Les caractéristiques intrinsèques publiées pour l'intradermotuberculation simple (IDS) sont assez variables selon les études, avec des valeurs médianes de 83,9 % (58,6 à 91 %) pour la sensibilité et 96,8 % (75 à 99,7 %) pour la spécificité. La spécificité de l'intradermotuberculation comparative (IDC) est considérée comme très élevée (supérieure à 99 %), au détriment de la sensibilité (environ 50 %) [De la Rua-Domenech *et al.*, 2006 ; Strain *et al.*, 2011]. Compte tenu des caractéristiques de spécificité de l'IDS, le nombre de réactions non négatives déclarées devrait être bien supérieur aux valeurs publiées chaque année en France (0,4 % en 2012 d'après [Fediavesky *et al.*, 2013]). L'intensité de la réaction est corrélée à l'extension des lésions observées à l'abattoir [Clifton-Hadley et Goodchild, 2005]. Une limite de l'ID réside dans le caractère tardif de l'installation de l'hypersensibilité retardée, qui nécessite au minimum 3-6 semaines pour s'installer [De la Rua-Domenech *et al.*, 2006].

La qualité des tuberculines utilisées a des répercussions importantes sur les performances des tests ID, et certaines études remettent en cause la valeur des contrôles qualité pratiqués sur cobaye [Good *et al.*, 2011]. Le remplacement des tuberculines par des antigènes purifiés spécifiques de *M. bovis* pourrait représenter une solution aux problèmes posés par la gestion des réactions non

spécifiques [Pollock *et al.*, 2003] mais augmenterait notablement le coût et la complexité du dépistage.

1.3.2. Détection de l'interféron gamma

Le principe, fondé sur le dosage d'interféron (IFN) produit *in vitro* par les cellules sanguines stimulées par des tuberculines bovine et aviaire, peut être considéré comme assez similaire à une intradermoréaction comparative. Cependant, s'il s'agit dans les deux cas d'évaluer l'immunité cellulaire, les mécanismes impliqués sont différents : une hypersensibilité de type IV dans un cas et le dosage de cytokines produites par les cellules dans l'autre.

Ce test a fait l'objet de nombreuses études démontrant une sensibilité au moins égale ou supérieure à celle de l'ID, et surtout une meilleure capacité à détecter les formes d'infection récentes (entre une et cinq semaines) ou celles qui n'ont pas été mises en évidence par l'ID [Pollock *et al.*, 2005], y compris pour des animaux contaminés par de faibles doses de *M. bovis* [Dean *et al.*, 2005]. Il présente également les avantages de ne pas requérir de deuxième visite sanitaire et de pouvoir être répété à des intervalles rapprochés. En revanche, certaines publications ou expériences de

terrain ont relaté une faible spécificité de cette technique [Cagiola *et al.*, 2004], particulièrement chez les jeunes animaux (moins d'un an). Une étude récente a démontré un lien entre la proportion de réactions faussement positives et la zone d'élevage [Gormley *et al.*, 2013]. Le test présente également de gros inconvénients de coût et de mise en œuvre pratique (notamment pour l'analyse des échantillons dans les huit heures suivant le prélèvement).

Comme pour l'ID, les caractéristiques intrinsèques du test IFN (lors d'une utilisation avec les tuberculines) publiées sont assez variables selon les études, avec des valeurs médianes de 87,6 % pour la sensibilité (82 à 100 %) et 96,6 % (88 à 99 %) pour la spécificité [De la Rua-Domenech *et al.*, 2006]. L'utilisation de certains peptides spécifiques du complexe de *M. bovis* (notamment ESAT-6 et CFP-10) en complément des tuberculines pour la stimulation des cellules sanguines permet d'améliorer la spécificité sans trop détériorer la sensibilité [Aagaard *et al.*, 2010]. De nombreuses études portant sur l'effet d'une intradermotuberculation préalable au test interféron ont donné des résultats contradictoires [De la Rua-Domenech *et al.*, 2006]. Par ailleurs, les performances du test IFN ne seraient pas impactées par la répétition des injections de tuberculines aux animaux testés, à la différence de l'ID [Coad *et al.*, 2010]. Les performances du test peuvent également être modifiées selon la qualité des antigènes utilisés notamment les tuberculines, certaines étant plus sensibles ou plus robustes que d'autres [Schiller *et al.*, 2010]. Les causes potentielles de réactions faussement négatives ou positives aux tests ID et IFN sont présentées dans les tableaux 1 et 2.

En France, l'intérêt de ce test a été démontré en Camargue contribuant, en association avec l'ID, à une bien meilleure détection des foyers en élevage et une diminution progressive de la prévalence dans le cadre d'un protocole de lutte renforcé [Keck, 2010]. Son utilisation successive à l'ID dans des cheptels de Dordogne a également permis une amélioration du dépistage dans un contexte de prévalence plus faible [Faye *et al.*, 2011].

Cependant, s'il est désormais considéré comme un test officiel dans de nombreux pays, les conditions dans lesquels il doit être utilisé et pratiqué (nature

des antigènes utilisés, critères d'interprétation) méritent d'être clarifiées et harmonisées [Anonyme, 2012]. Compte tenu du coût et des contraintes logistiques liées à l'utilisation du test IFN, certaines études ont envisagé la possibilité d'augmenter le délai entre le prélèvement et la stimulation des cellules sanguines, voire de prévoir la stimulation dans le tube de prélèvement [Schiller *et al.*, 2011 ; Strain *et al.*, 2011]. Par ailleurs, certaines combinaisons d'antigènes pourraient permettre d'accroître la sensibilité du test, sans perdre en spécificité [Schiller *et al.*, 2011], voire de détecter certaines formes particulières d'infection [Jones *et al.*, 2011].

1.4. MISE EN ÉVIDENCE DE L'IMMUNITÉ HUMORALE

Les tests sérologiques souffrent en général d'un défaut de sensibilité comparativement aux tests IMC, notamment pour la détection des formes précoces de la maladie. Si l'utilisation de certains antigènes spécifiques de la réaction humorale (notamment MPB70 et MPB83) a permis d'élaborer des tests présentant une bonne spécificité et des résultats de sensibilité encourageants [Waters *et al.*, 2011], la sensibilité reste médiocre, particulièrement dans les zones géographiques où la prévalence est faible et les infections récentes [Moyen *et al.*, 2014]. Dans certains cas, ils pourraient permettre de détecter des animaux non détectés par ID [Whelan *et al.*, 2011], voire différencier les animaux infectés des animaux vaccinés [Whelan *et al.*, 2010].

Des perspectives d'amélioration de la sensibilité sont toutefois envisageables par l'utilisation de la réponse « anamnétique », induite par l'effet « rappel » d'une ID sur l'animal testé au cours des jours précédant le prélèvement pour analyse sérologique [Waters *et al.*, 2011 ; Casal *et al.*, 2014] mais aussi possiblement par l'utilisation d'antigènes capables de dépister des formes particulières de la maladie [Brust *et al.*, 2011].

L'utilisation des tests sérologiques pourrait donc s'envisager comme un complément aux tests IMC en vue du dépistage des animaux anergiques, notamment pour les opérations d'assainissement par abattage partiel, ou comme une alternative moins coûteuse que l'interféron gamma dans les zones de prévalence élevée.

Tableau 1

Causes potentielles de réactions faussement négatives pour les tests intradermotuberculination et interféron

[adapté de De la Rua-Domenech *et al.*, 2006 ; Anonyme, 2013b]

	ID	IFN
Causes liées à l'animal testé		
• Désensibilisation à la tuberculine bovine (administrations rapprochées)	X	
• Test pratiqué en début d'infection	X	X
• Infection généralisée par la tuberculose, dépassant les capacités de la réponse immunitaire (anergie)	X	X
• Co-infection par des mycobactéries non tuberculeuses conduisant à une réponse excessive des tests pour la tuberculine aviaire	X	X
• Vaccination contre <i>M. avium susp. paratuberculosis</i>	X	X
• Co-infection par des maladies virales immunosuppressives (ex : BVD)	X	X
• Infestations parasitaires (<i>Fasciola</i>)	X	X
• Médicaments immunosuppresseurs (corticoïdes...)	X	X
• Immunosuppression <i>post-partum</i>	X	X
• Stress lié à l'alimentation, la race ou le transport	X	X
• Génotype de <i>M. bovis</i>	X ?	X ?
Causes liées aux réactifs utilisés		
• Produits périmés	X	X
• Produits mal conservés	X	X
• Erreur de fabrication des réactifs (tuberculines)	X	X
Causes liées à la mise en œuvre des tests		
• Injection d'une quantité trop faible de tuberculines	X	
• Injection sous-cutanée au lieu d'intradermique	X	
• Intersersion des lieux d'injection de la tuberculine bovine et aviaire	X (IDC)	
• Non-respect du délai de lecture des réactions	X	
• Erreur dans la lecture des résultats	X	X
• Erreur dans l'interprétation des résultats	X	X
• Erreur dans l'identification de l'animal	X	X
• Caractère subjectif de la lecture (sans cutimètre)	X	

Tableau 2

Causes potentielles de réactions faussement positives pour les tests intradermotuberculation et interféron[adapté de De la Rua-Domenech *et al.*, 2006 ; Anonyme, 2013]

	ID	IFN
Causes liées à l'animal testé		
• Co-infection par des mycobactéries non tuberculeuses (dont <i>M. avium susp. paratuberculosis</i>)	X	X*
• Infections par des agents infectieux autres que des mycobactéries (<i>Actinomyces, Nocardia sp.,...</i>)	X	X
• Infestations parasitaires (<i>Fasciola</i>)	X	X
• Vaccination contre <i>M. avium susp. paratuberculosis</i>	X	X*
Causes liées à la mise en œuvre des tests		
• Interverision des lieux d'injection de la tuberculine bovine et aviaire	X (IDC)	
• Erreur dans la lecture des résultats	X	X
• Erreur dans l'interprétation des résultats	X	X
• Erreur dans l'identification de l'animal	X	X

* Amélioré par l'utilisation d'antigènes spécifiques du complexe de *M. tuberculosis***II - DIAGNOSTIC****1. CONTRAINTES BIOLOGIQUES ET ÉPIDÉMIOLOGIQUES**

La sensibilité du diagnostic *post-mortem* repose en premier lieu sur la capacité des services d'inspection à l'abattoir à détecter des lésions suspectes, puis aux performances des tests de laboratoires entrepris.

Il faut parfois plusieurs années avant que des lésions détectables à l'inspection d'abattoir n'apparaissent. Les prélèvements peuvent être paucibacillaires [De la Rue-Domenech *et al.*, 2006], particulièrement pour les cas chroniques ou latents, limitant les possibilités de détection directe des mycobactéries. Par ailleurs, les bacilles sont le plus souvent regroupés au sein d'amas dans les organes lésés et les techniques de prélèvement mises en œuvre (ex : séparation d'un ganglion en deux parties pour des examens différents) peuvent biaiser les résultats des tests. Enfin, selon la voie d'infection ou la façon dont la bactérie s'est développée au sein de l'animal, les ganglions prélevés lors de l'inspection (souvent ceux du tractus respiratoire) peuvent ne pas être les meilleurs candidats pour la détection de certaines formes de la maladie. Ainsi, les ganglions

mésentériques, qui ne sont pas systématiquement prélevés, pourraient être dans certains cas les prélèvements les plus adaptés pour confirmer l'infection.

Les mycobactéries se cultivent sur des milieux spécifiques et de façon très lente, nécessitant parfois plusieurs semaines d'incubation. Elles peuvent par ailleurs subir la concurrence d'une flore saprophyte qui contamine des prélèvements (particulièrement de nœuds lymphatiques mésentériques ou de la faune sauvage), ce qui nécessite des phases de décontamination des échantillons avant ensemencement sur des milieux de culture adaptés. Différents protocoles de décontamination existent, plus ou moins intenses, pouvant tous avoir un effet bactéricide sur les mycobactéries et donc diminuer les performances du diagnostic pour des charges bactériennes faibles [Corner *et al.*, 1995]. Par ailleurs, les bovins peuvent être infectés par d'autres mycobactéries du complexe de *M. tuberculosis*, notamment *M. tuberculosis* mais aussi *M. caprae*, de plus en plus fréquemment identifiée dans certains pays européens comme à l'origine de cas en élevage mais aussi dans la faune sauvage [Rodriguez *et al.*,

2011]. Cette diversité de souches peut affecter les caractéristiques culturelles des mycobactéries.

Ainsi, une étude américaine a évalué le taux de sensibilité de la surveillance à l'abattoir entre 3,2 et 50,6 % pour la détection d'un cheptel infecté, selon la taille et le type d'élevage [Anonyme, 2009].

2. DIAGNOSTIC HISTOLOGIQUE

L'examen histopathologique fait partie des méthodes officielles reconnues par l'Union Européenne, permettant de confirmer rapidement une infection par *M. bovis*. Les lésions microscopiques granulomateuses recherchées peuvent toutefois être causées par d'autres mycobactéries ou d'autres espèces bactériennes (ex : *Rhodococcus equi*). La spécificité du diagnostic histologique est donc médiocre, estimée à 92,3 % dans une étude italienne utilisant la culture comme méthode de référence [Varello *et al.*, 2008]. Par contre, la sensibilité est élevée, de l'ordre de 93 %, dans des populations d'animaux présentant des lésions [Varello *et al.*, 2008 ; Courcoul *et al.*, 2014].

3. DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

Les mycobactéries cultivent sur des milieux spécifiques en atmosphère aérobie ou microaéroophile, mais présentent une croissance très lente : il faut attendre 14 à 21 jours avant de pouvoir mettre en évidence une culture de *M. bovis*. Plusieurs formulations de milieux de culture existent et doivent être associées pour augmenter la capacité de cultiver une grande variété de souches. Les techniques de culture présentent des sensibilités différentes selon les milieux utilisés, avec fréquemment un avantage pour les cultures en milieu liquide, mais susceptible de varier selon les espèces de mycobactéries recherchées [Williams-Bouyer *et al.*, 2000 ; Robbe-Austerman *et al.*, 2013]. La culture en milieu solide présente par ailleurs l'inconvénient d'un délai de réponse long (3 mois pour rendre un résultat négatif, 5 semaines en moyenne pour cultiver les mycobactéries), alors que la durée de croissance des mycobactéries sur milieu liquide est plus rapide (15 jours en moyenne, gain d'au minimum 10 jours), avec cependant l'inconvénient d'un coût plus élevé [Madigan, 2012 ; Robbe-Austerman *et al.*, 2013]. Au final, le taux de sensibilité du diagnostic bactériologique peut être évalué aux alentours de 80 %, avec un taux de spécificité proche de 100 %, à partir de prélèvements

sélectionnés sur la base de lésions évocatrices de tuberculose [Moyen *et al.*, 2011 ; Courcoul *et al.*, 2014].

L'identification des souches de mycobactéries s'effectue désormais par des techniques de biologie moléculaire variées mais certaines techniques d'identification par spectrométrie de masse (Maldi-tof), pourraient permettre également de cibler rapidement et de manière peu coûteuse les bactéries du complexe de *M. tuberculosis* [Saleeb *et al.*, 2011].

4. DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE

4.1. MISE EN ÉVIDENCE D'ADN MYCOBACTÉRIEN

Par le passé, la PCR a pu être considérée comme peu adaptée au diagnostic de la tuberculose bovine, essentiellement pour des raisons de qualité de l'échantillonnage : faible charge bactérienne dans les lésions, présence d'inhibiteurs, difficultés à extraire l'ADN des mycobactéries du fait de la robustesse de leur paroi cellulaire [Wilsmore et Taylor, 2008]. Néanmoins, il a été démontré en France que l'utilisation de la PCR conjointement au diagnostic par culture bactérienne permettait d'augmenter la sensibilité de diagnostic d'environ 10 % [Moyen *et al.*, 2011] pour une sensibilité moyenne de 87,7 % [Courcoul *et al.*, 2014].

Cette PCR, fondée sur la détection de la séquence d'insertion *IS 6110*, ne permet pas d'identifier l'espèce du complexe de *M. tuberculosis* causant l'infection ni son génotype. Des méthodes moléculaires sont donc en cours de développement pour répondre à ces besoins, fondées sur la caractérisation de l'ADN extrait directement à partir d'organes [Hénault *et al.*, 2014].

4.2. ÉPIDÉMIOLOGIE MOLÉCULAIRE

D'une façon générale, le génome des mycobactéries est peu polymorphe par rapport à sa taille. Les structures polymorphes correspondent à des séquences d'insertion (ex : *IS 6110*) ou des séquences répétitives (notamment la région DR, les PGRs et les VNTR). Les méthodes utilisées doivent prendre en compte le polymorphisme et la stabilité de ces marqueurs [Haddad et Durand, 2001].

Le spoligotypage (spacer oligotypage) est désormais couramment mis en œuvre sur les souches isolées dans les foyers. Il représente un

premier niveau de typage simple et fiable pour étudier la répartition des souches de façon globale sur le territoire. Cependant, le polymorphisme étudié est très souvent insuffisant pour caractériser finement les souches et investiguer l'origine des foyers, les résurgences ou double infections et les cas de transmissions interspécifiques.

Le recours à des techniques complémentaires telles que le typage VNTR (Variable Number Tandem Repeats) est donc de plus en plus fréquent. En effet, trois spoligotypes (SB0120-BCG, SB0134-GB35, SB0121-GB54) représentent plus des 50 % des souches isolées en France, tandis que la combinaison du spoligotype avec le typage VNTR a permis de caractériser plus de 540 souches différentes [Hauer *et al.*, 2014].

III - CONTRAINTES GLOBALES ET PISTES D'AMÉLIORATION ET DE RECHERCHE

Les enjeux en matière de dépistage et de diagnostic sont doubles :

- Garantir une bonne sensibilité de détection au niveau du cheptel dans un contexte de prévalence faible sans trop dégrader la spécificité, notamment dans des zones géographiques où des réactions non spécifiques sont observées ;
- Améliorer la sensibilité de détection au niveau individuel dans certains contextes : que ce soit pour la surveillance de la maladie dans des zones de faible prévalence, le maintien des garanties sanitaires lors des échanges d'animaux ou l'assainissement des cheptels par abattage partiel, les exigences concernant le dépistage au niveau individuel ont en effet considérablement augmenté.

1. PROBLÉMATIQUES GÉNÉRALES

1.1. IL N'EXISTE PAS DE TEST PARFAIT POUR LE DÉPISTAGE DE LA TUBERCULOSE BOVINE

Si cet adage s'applique à toutes les maladies infectieuses, il s'avère particulièrement adapté au diagnostic de la tuberculose bovine, pour laquelle il est admis qu'aucun test de dépistage n'est capable de détecter tous les cheptels infectés ni tous les animaux infectés d'un foyer [De la Rua-Domenech *et al.*, 2006]. Le tableau 3 résume les caractéristiques des tests dans différents contextes de prévalence, démontrant la diminution rapide de la valeur prédictive négative (VPN) et l'augmentation de la valeur prédictive positive (VPP) avec l'augmentation de la prévalence.

Tableau 3

Performances des tests dans différentes situations épidémiologiques (Taux de prévalence 0,1 à 20%)
d'après [Schiller *et al.*, 2011] modifié et 1 : [De la Rua-Domenech *et al.*, 2006], 2 : [Anonyme, 2009]

Test	Se (%)	Sp (%)	Référence	VPP (%)				VPN (%)			
				0,1 %	1 %	10 %	20 %	0,1 %	1 %	10 %	20 %
IDS	83,9	96,8	1	2,6	20,9	74,4	86,8	100	99,8	98,2	96
IDC	80	99,5	1	13,8	61,8	94,7	97,6	100	99,8	97,8	95,2
IFN PPD	87,6	96,6	1	2,5	20,7	74,1	86,6	100	99,9	98,6	96,9
Diagnostic abattoir	28,5	100	2	100	100	100	100	99,9	99,3	92,6	84,8

Les tests de dépistage complémentaires à l'ID ont donc été développés avec deux objectifs différents :

- Améliorer la sensibilité de détection des animaux infectés dans des régions ou cheptels où la prévalence de la maladie est élevée, pour l'élimination des animaux positifs à l'un des tests (utilisation en parallèle). En effet, des animaux à réponse positive au test IFN et négative en ID peuvent correspondre à des animaux récemment infectés (détection précoce) mais aussi à des formes plus anciennes et non détectées par l'ID [Pollock et Neill, 2001], de même que certains animaux infectés ne sont pas détectés par IFN mais par ID [Pollock *et al.*, 2005] ;
- Améliorer la spécificité lors des dernières phases d'une campagne d'éradication, dans les zones où la prévalence est faible et dans celles où l'on observe une fréquence élevée de réactions croisées dues à des mycobactéries de l'environnement, par une élimination des seuls animaux présentant un résultat positif pour tous les tests pratiqués (utilisation en série).

Sur ce point, les pistes d'amélioration concernent :

- L'amélioration des performances des tests pratiqués,
- Une meilleure connaissance de la complémentarité des tests pour définir des schémas diagnostiques adaptés.

Par ailleurs, l'utilisation ou l'association des tests entre eux pourrait utilement être mise à profit pour le dépistage de la tuberculose bovine chez d'autres espèces que les bovins, telles que des ovins et caprins. Cependant, les nouveaux tests de dépistage ont essentiellement été évalués chez les bovins et à des rares occasions pour d'autres espèces [Liebana *et al.*, 1998 ; Cousins et Florisson, 2005 ; Pesciaroli *et al.*, 2012].

1.2. LES PERFORMANCES DES TESTS DE DÉPISTAGE VARIANT SELON LE CONTEXTE ÉPIDÉMIOLOGIQUE

En matière de dépistage de la tuberculose, les caractéristiques intrinsèques des tests de dépistage, supposées être constantes quelle que soit la prévalence de la maladie, s'avèrent être assez variables selon les zones d'élevage [Norby *et al.*, 2004 ; De la Rue-Domenech *et al.*, 2006].

Il est ainsi possible d'observer des flambées de réactions faussement positives dans certains cheptels ou dans certaines zones géographiques.

Une étude récente a d'ailleurs démontré un lien entre la proportion de réactions faussement positives en interféron et la zone d'élevage [Gormley *et al.*, 2013].

Ceci est en partie dû à l'absence de test de référence, qui complique la catégorisation des populations et explique certaines discordances entre études. Par ailleurs, la détermination de la sensibilité des tests de dépistage de la tuberculose est assez souvent biaisée car elle nécessiterait l'abattage de tous les animaux testés lors de l'évaluation, quels que soient les résultats obtenus pour les tests évalués. Le recours aux méthodes bayésiennes, applicables en l'absence de test de référence, permet désormais d'évaluer de façon plus pertinente les performances des tests.

Il est également possible que le génotype des souches ait une influence sur les performances des tests IMC, un phénomène déjà décrit pour différents génotypes de *M. tuberculosis* [Lopez *et al.*, 2003]. Une étude récente en Irlande du Nord a démontré que les performances de l'ID n'étaient pas modifiées par le génotype des souches impliquées [Wright *et al.*, 2013] mais ces travaux seraient à compléter dans d'autres zones géographiques et pour d'autres tests de dépistage. Les techniques de typage de plus en plus accessibles permettront sans doute de mieux identifier et comprendre les différences de virulence, transmissibilité, pathogénie et immunogénicité des souches de *M. bovis*.

1.3. SIGNIFICATION DES ANIMAUX RÉAGISSANTS, NON CONFIRMÉS INFECTÉS

En France comme dans d'autres pays, une grande proportion des animaux réagissant aux tests de dépistage ne présentent pas de lésions visibles à l'abattoir et ne sont pas confirmés infectés par le diagnostic *post-mortem*. Ainsi, en 2012 seuls 6,4 % des 1 355 animaux soumis à abattage diagnostique ont été confirmés infectés [Fedievsky *et al.*, 2013].

Ces résultats contradictoires peuvent être dus à un défaut de spécificité des tests de dépistage, mais aussi à un défaut de sensibilité du diagnostic direct. En effet, certaines études ont évoqué la plus faible sensibilité du diagnostic bactériologique (qui détecte la maladie) comparé à celle des tests immunologiques, détectant l'infection, parfois subclinique [De la Rue-Domenech *et al.*, 2006].

Une meilleure investigation de ces cas passe donc par :

- L'amélioration de la spécificité des tests de dépistage,
- L'amélioration de la sensibilité du diagnostic.

2. PISTES D'AMÉLIORATION ET DE RECHERCHE

Plusieurs sujets devraient être étudiés dans le cadre du Réseau français de santé animale (RFSA), et peuvent être présentés selon deux axes de travail.

2.1. AMÉLIORER LES PERFORMANCES DES TESTS

2.1.1. Dépistage

Les tests évalués devraient être capable de dépister la totalité du spectre des infections tuberculeuses, des formes latentes aux formes actives [Barry *et al.*, 2009]. Cependant, la priorité des actions d'amélioration des tests de dépistage devrait concerner l'identification des animaux les plus infectés/malades qui sont la source principale d'infection au sein des cheptels, et leur différenciation des animaux qui ont été exposés sans développer la maladie mais pour lesquels une réactivation est possible.

A cette fin, les projets de recherche pour le dépistage pourront explorer les pistes suivantes :

- L'évaluation du gain de sensibilité lié à la réponse « anamnétique » due à l'ID sur la sensibilité de dépistage par les tests sérologiques,
- L'intérêt de l'utilisation de certaines tuberculines ou de peptides spécifiques, voire de dosage de cytokines plus pertinentes pour le dépistage de certaines formes d'infection.

En complément de ce travail, les liens entre l'intensité de la réponse aux tests de dépistage et les formes de l'infection pourraient être étudiés, ainsi que l'impact des infections par les mycobactéries non tuberculeuses (confirmées par culture) sur les résultats des tests de dépistage.

Enfin, des protocoles d'évaluation des performances des tuberculines et des peptides utilisés pour les tests *in vitro* devraient être évalués.

2.1.2. Diagnostic

Un projet de recherche va étudier :

- La comparaison de la sensibilité et du délai de

réponse des méthodes de culture en milieu liquide et solide,

- L'effet du mélange de ganglions de bovins sur les performances de ces méthodes,
- Les performances de l'identification des mycobactéries du complexe de *M. tuberculosis* par spectrométrie de masse Maldi-Tof directement à partir du produit des cultures liquides.

2.2. AMÉLIORER LES SCHÉMAS DIAGNOSTIQUES PAR L'ASSOCIATION DES TESTS

Le protocole d'étude en cours devrait permettre d'évaluer les performances du test IFN dans le cadre d'une utilisation en série. Par ailleurs, l'intérêt d'une utilisation en parallèle des tests ID et IFN doit également être étudiée. Dans certaines conditions, ces tests pourraient utilement être associés à la sérologie pour détecter certains animaux anciennement infectés.

Un projet de recherche va également évaluer l'intérêt des tests *in vitro* comme alternative aux ID difficiles à réaliser sur les populations de petits ruminants.

3. MISE EN ŒUVRE ET UTILISATION DES DONNÉES DE LA RECHERCHE

Une dernière contrainte concernant l'étude de la tuberculose bovine est le faible nombre de foyers pour lesquels il est possible de collecter des échantillons et des informations épidémiologiques adaptées en vue d'un travail de recherche. Par ailleurs, pour appréhender la diversité des situations, ces études doivent être effectuées dans des zones représentatives de la diversité de la situation nationale.

Malgré des contraintes d'organisation souvent importantes au niveau local, la participation active des acteurs de terrain est indispensable, à la fois comme pourvoyeurs d'échantillons (collecte et conservation), mais aussi grâce à leur indispensable expérience locale pour prendre en compte certaines caractéristiques épidémiologiques. Les difficultés des acteurs de terrain doivent donc être prises en compte pour l'organisation de ces études.

Le choix des tests à évaluer doit également prendre en considération leur coût et applicabilité sur le terrain. Par ailleurs, si des tests semblent complémentaires, certains peuvent apporter des

informations comparables, ce qui rend leur association moins justifiée d'un point de vue économique. Ces réflexions doivent également prendre en compte les coûts d'investissement

nécessaires au développement de certaines techniques et la dimension que l'on veut donner au réseau des laboratoires agréés.

IV - CONCLUSION

Le diagnostic de la tuberculose bovine est un challenge permanent et l'association des tests entre eux offre le plus de chances de détecter les animaux les plus contaminants au sein d'un cheptel. Les projets de recherche en cours ou à venir devraient permettre de compléter ces schémas diagnostiques. Dans l'optique d'une utilisation appliquée des outils de diagnostic, il est

important que les projets de recherche prennent en compte les évolutions scientifiques mais aussi les besoins des autorités sanitaires, les contraintes des acteurs de terrain et les possibilités des laboratoires. L'intérêt d'une structure comme le RFSA est de rassembler autour d'une même table des représentants de ces différents acteurs du réseau sanitaire.

BIBLIOGRAPHIE

- Aagaard C., Govaerts M., Meikle V., Gutiérrez-Pabello J.A., McNair J., Andersen P., Suárez-Güemes F., Pollock J., Espitia C., Cataldi A. - Detection of bovine tuberculosis in herds with different disease prevalence and influence of paratuberculosis infection on PPDB and ESAT-6/CFP10 specificity. *Prev. Vet. Med.*, 2010, **96**, 161-169.
- Alvarez A.H., Estrada-Chávez C., Flores-Valdez M.A. - Molecular findings and approaches spotlighting *Mycobacterium bovis* persistence in cattle. *Vet. Res.*, 2009, **40**, 22.
- Alvarez J., de Juan L., Bezos J., Romero B., Sáez J.L., Reviriego Gordejo F.J., Briones V., Moreno M.A., Mateos A., Domínguez L., Aranaz A. - Interference of paratuberculosis with the diagnosis of tuberculosis in a goat flock with a natural mixed infection. *Vet. Microbiol.*, 2008, **128**, 72-80.
- Anonyme - Analysis of bovine tuberculosis surveillance in accredited free states. Ed. USDA-APHIS, Veterinary Services, 2009, 33 pages.
- Anonyme - Scientific Opinion on the use of a gamma interferon test for the diagnosis of bovine tuberculosis, Ed. EFSA, Parme, 2012, 63 pages.
- Anonyme - Tuberculose bovine. In : Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres 2013, chapitre 2.4.7., Ed. OIE, Paris, 2013a, 16 pages.
- Anonyme - Avis relatif aux agents interférant avec le dépistage de la tuberculose bovine, Ed. ANSES, Paris, 2013b, 40 pages.
- Arriaga A.K., Orozco E.H., Aguilar L.D., Rook G.A., Hernández Pando R. - Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.*, 2002, **128**, 229-237.
- Barry C.E., Boshoff H.I., Dartois V., Dick T., Ehrt S., Flynn J., Schnappinger D., Wilkinson R.J., Young D. - The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2009, **7**, 845-855.
- Brust B., Lecoufle M., Tuailon E., Dedieu L., Canaan S., Valverde V., Kremer L. - *Mycobacterium tuberculosis* lipolytic enzymes as potential biomarkers for the diagnosis of active tuberculosis. *PLoS One*, 2011, **6**, e25078.
- Cagiola M., Feliziani F., Severi G., Pasquali P., Rutili D. - Analysis of the possible factors affecting the specificity of the gamma interferon test in tuberculosis-free cattle herds. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2004, **11**, 952-956.

- Casal C., Díez-Guerrier A., Alvarez J., Rodriguez-Campos S., Mateos A., Linscott R., Martel E., Lawrence J.C., Whelan C., Clarke J., O'Brien A., Domínguez L., Aranaz A. - Strategic use of serology for the diagnosis of bovine tuberculosis after intradermal skin testing. *Vet Microbiol.*, 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.036>
- Cassidy J.P. - The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. *Vet. Microbiol.*, 2006, **112**, 151-161.
- Coad M., Clifford D., Rhodes S.G., Hewinson R.G., Vordermeier H.M., Whelan A.O. - Repeat tuberculin skin testing leads to desensitisation in naturally infected tuberculous cattle which is associated with elevated interleukin-10 and decreased interleukin-1 beta responses. *Vet. Res.*, 2010, **41**, 14.
- Corner L.A., Trajstman A.C., Lund K. - Determination of the optimum concentration of decontaminants for the primary isolation of *Mycobacterium bovis*. *N. Z. Vet. J.*, 1995, **43**, 129-133.
- Courcoul A., Moyen J.L., Brugère L., Faye S., Hénault S., Gares H., Boschioli M.L. - Estimation of sensitivity and specificity of bacteriology, histopathology and PCR for the confirmatory diagnosis of bovine tuberculosis using latent class analysis. *PLoS One*, 2014, **9**, e90334.
- Cousins D.V., Florisson N. - A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species. *Rev. Sci. Tech.*, 2005, **24**, 1039-1059.
- Creignou-Mercier P. - Bases épidémiologiques pour la maîtrise de la paratuberculose caprine, Ed. Université de Rennes 1, Rennes, 2009, 175 pages.
- De la Rua-Domenech R., Goodchild A.T., Vordermeier H.M., Hewinson R.G., Christiansen K.H., Clifton-Hadley R.S. - Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Science*, 2006, **81**, 190-210.
- Dean G.S., Rhodes S.G., Coad M., Whelan A.O., Cockle P.J., Clifford D.J., Hewinson R.G., Vordermeier H.M. - Minimum infective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infect. Immun.*, 2005, **73**, 6467-6471.
- Faye S., Moyen J.L., Gares H., Benet J.J., Garin-Bastuji B., Boschioli M.L. - Determination of decisional cut-off values for the optimal diagnosis of bovine tuberculosis with a modified IFN γ assay (Bovigam®) in a low prevalence area in France. *Vet. Microbiol.*, 2011, **151**, 60-67.
- Fediaevsky A., Courcoul A., Boschioli M.L., Reveillaud E. - Tuberculose bovine en 2012 : des signaux favorables mais une situation toujours complexe dans certaines zones. *Bull. Épidémiol. Santé Anim. et Alim.*, 2013, **59**, 4-10.
- Good M., Clegg T.A., Murphy F., More S.J. - The comparative performance of the single intradermal comparative tuberculin test in Irish cattle, using tuberculin PPD combinations from different manufacturers. *Vet. Microbiol.*, 2011, **151**, 77-84.
- Good M., Duignan A. - Perspectives on the History of Bovine TB and the Role of Tuberculin in Bovine TB Eradication. *Vet. Med. Inter.*, 2011, ID 410470, 11 pages.
- Gormley E., Doyle M., Duignan A., Good M., More S.J., Clegg T.A. - Identification of risk factors associated with disclosure of false positive bovine tuberculosis reactors using the gamma-interferon (IFN γ) assay. *Vet. Res.*, 2013, **44**, 117.
- Haddad N., Durand B. - Intérêt et limites des différentes techniques de caractérisation des isolats. Exemple de la tuberculose. *Épidémiol. et santé anim.*, **39**, 43-57.
- Hauer A., Cochard T., De Cruz K., Karaoui C., Hénault S., Biet F., Boschioli M.L. - Comparaison des souches isolées en élevage et celles isolées dans la faune sauvage grâce aux techniques d'identification moléculaires. *Épidémiol. et santé anim.*, 2014, **65**, 77-86.
- Hénault S., De Cruz K., Bulach T., Karoui C., Brugère L., Gares H., Moyen J.L., Gueneau E., Keck N., Courcoul A., Fediaevsky A., Boschioli M.L. - First line molecular diagnosis of bovine tuberculosis: the french experience. VIth International *M. bovis* conference. Cardiff, Great Britain- 16th - 19th 2014.
- Jones G.J., Pirson C., Gideon H.P., Wilkinson K.A., Sherman D.R., Wilkinson R.J., Hewinson R.G., Vordermeier H.M. - Immune responses to the enduring hypoxic response antigen Rv0188 are preferentially detected in *Mycobacterium bovis* infected cattle with low pathology. *PLoS One*, 2011, **6**, e21371.

- Keck N. - Tuberculose bovine en Camargue : apports du test interféron gamma. *Point Vét.*, 2010, **309**, 54-57.
- Larsen M.V., Sørensen I.J., Thomsen V.Ø., Ravn P. - Re-activation of bovine tuberculosis in a patient treated with infliximab. *Eur. Respir. J.*, 2008, **32**, 229-231.
- Liébana E., Aranaz A., Urquía J.J., Mateos A., Domínguez L. - Evaluation of the gamma-interferon assay for eradication of tuberculosis in a goat herd. *Aust. Vet. J.*, 1998, **76**, 50-53.
- López B., Aguilar D., Orozco H., Burger M., Espitia C., Ritacco V., Barrera L., Kremer K., Hernandez-Pando R., Huygen K., van Soelingen D. - A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin. Exp. Immunol.*, 2003, **133**, 30-37.
- Madigan G. - Evaluation of different methods for the detection of *Mycobacterium bovis* in lymph node tissue, Ed. National University of Ireland Maynooth, 2012, 147 pages.
- Moyen J.L., Brugère L., Faye S., Boschioli M.L. - Utilisation de la PCR pour le diagnostic de la tuberculose bovine. *Point Vét.*, 2011, **312**, 68-72.
- Moyen J.L., Gueneau E., Keck N., Gares H., Boschioli M.L. - Premières évaluations de l'intérêt de la sérologie pour le diagnostic de la tuberculose bovine en France. *Épidémiol. et santé anim.*, 2014, **65**, 41-51.
- Neill S.D., Pollock J.M., Bryson D.B., Hanna J. - Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Microbiol.*, 1994, **40**, 41-52.
- Norby B., Bartlett P.C., Fitzgerald S.D., Granger L.M., Bruning-Fann C.S., Whipple D.L., Payeur J.B. - The sensitivity of gross necropsy, caudal fold and comparative cervical tests for the diagnosis of bovine tuberculosis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2004, **16**, 126-131.
- Parrish N.M., Dick J.D., Bishai W.R. - Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.*, 1998, **6**, 107-112.
- Pesciaroli M., Russo M., Mazzone P., Aronica V., Fiasconaro M., Boniotti M.B., Corneli S., Cagiola M., Pacciarini M., Di Marco V., Pasquali P. - Evaluation of the interferon-gamma (IFN- γ) assay to diagnose *Mycobacterium bovis* infection in pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2012, **148**, 369-372.
- Pollock J.M., McNair J., Bassett H., Cassidy J.P., Costello E., Aggerbeck H., Rosenkrands I., Andersen P. - Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identify tuberculosis-infected cattle. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, **41**, 1856-1860.
- Pollock J.M., Neill S.D. - *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet. J.*, 2002, **163**, 115-127.
- Pollock J.M., Welsh M.D., McNair J. - Immune responses in bovine tuberculosis: towards new strategies for the diagnosis and control of disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2005, **108**, 37-43.
- Robbe-Austerman S., Bravo D.M., Harris B. - Comparison of the MGIT 960, BACTEC 460 TB and solid media for isolation of *Mycobacterium bovis* in United States veterinary specimens. *BMC Vet. Res.*, 2013, **9**, 74.
- Rodríguez S., Bezos J., Romero B., de Juan L., Álvarez J., Castellanos E., Moya N., Lozano F., Javed M.T., Sáez-Llorente J.L., Liébana E., Mateos A., Domínguez L., Aranaz A., Spanish Network on Surveillance and Monitoring of Animal Tuberculosis - *Mycobacterium caprae* infection in livestock and wildlife, Spain. *Emerg. Infect. Dis.*, 2011, **17**, 532-535.
- Saleeb P.G., Drake S.K., Murray P.R., Zelazny A.M. - Identification of mycobacteria in solid-culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*, 2011, **49**, 1790-1794.
- Schiller I., RayWaters W., Martin Vordermeier H.M., Jemmi T., Welsh M., Keck N., Whelan A., Gormley E., Boschioli M.L., Moyen J.L., Vela C., Cagiola M., Buddle B.M., Palmer M., Thacker T., Oesch B. - Bovine tuberculosis in Europe from the perspective of an officially tuberculosis free country: Trade, surveillance and diagnostics. *Vet. Microbiol.*, 2011, **151**, 153-159.
- Schiller I., Vordermeier H.M., Waters W.R., Kyburz A., Cagiola M., Whelan A., Palmer M.V., Thacker T.C., Meijlis J., Carter C., Gordon S., Egnuni T., Hardegger R., Marg-Haufe B., Raeber A., Oesch B. - Comparison of tuberculin activity using the interferon-gamma assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Vet. Rec.*, 2010, **167**, 322-326.
- Strain S.A., Mc Nair J., Mc Dowell S.W.J. - Bovine tuberculosis: A review of diagnostic tests for *M. bovis* infection in cattle, Ed. Agri-Food and Biosciences Institute, Belfast, 2011, 45 pages.

- Varello K., Pezzolato M., Mascarino D., Ingravalle F., Caramelli M., Bozzetta E. - Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2008, **20**, 164-169.
- Vordermeier M., Goodchild A., Clifton-Hadley R., de la Rua R. - The interferon-gamma field trial: background, principles and progress. *Vet. Rec.*, 2004, **155**, 37-38.
- Waters W.R., Buddle B.M., Vordermeier H.M., Gormley E., Palmer M.V., Thacker T.C., Bannantine J.P., Stabel J.R., Linscott R., Martel E., Milian F., Foshaug W., Lawrence J.C. - Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2011, **18**, 1882-1888.
- Waters W.R., Whelan A.O., Lyashchenko K.P., Greenwald R., Palmer M.V., Harris B.N., Hewinson R.G., Vordermeier H.M. - Immune responses in cattle inoculated with *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, or *Mycobacterium kansasii*. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2010, **17**, 247-252.
- Whelan C., Shuralev E., Kwok H.F., Kenny K., Daignan A., Good M., Davis W.C., Clarke J. - Use of a multiplex enzyme-linked immunosorbent assay to detect a subpopulation of *Mycobacterium bovis*-infected animals deemed negative or inconclusive by the single intradermal comparative tuberculin skin test. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2011, **23**, 499-503.
- Whelan C., Whelan A.O., Shuralev E., Kwok H.F., Hewinson G., Clarke J., Vordermeier H.M. - Performance of the Enferplex TB assay with cattle in Great Britain and assessment of its suitability as a test to distinguish infected and vaccinated animals. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2010, **17**, 813-817.
- Williams-Bouyer N., Yorke R., Lee H.I., Woods G.L. - Comparison of the BACTEC MGIT 960 and ESP culture system II for growth and detection of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, **38**, 4167-4170.
- Wilsmore A., Taylor N. - Bovine tuberculosis: An update, Ed. University of Reading, 2008, 132 pages.
- Wright D.M., Allen A.R., Mallon T.R., McDowell S.W., Bishop S.C., Glass E.J., Bermingham M.L., Woolliams J.A., Skuce R.A. - Detectability of bovine TB using the tuberculin skin test does not vary significantly according to pathogen genotype within Northern Ireland. *Infect. Genet. Evol.*, 2013, **19**, 15-22.

