

RÉACTIONS NON SPÉCIFIQUES AUX TESTS DE DÉPISTAGE ANTE MORTEM DE LA TUBERCULOSE BOVINE : INVESTIGATIONS DANS UN CENTRE DE BOVINS REPRODUCTEURS*

Michelet Lorraine¹, Solanas Sébastien², Tambosco Jennifer¹, Grecchi Marco³,
Gerard Olivier⁴, Hartmann Alain² et Boschioli Maria Laura¹



RÉSUMÉ

Le dépistage de la tuberculose bovine (bTB) repose sur la détection de la réponse immunitaire à médiation cellulaire par des tests d'intradermotuberculination simple (IDS) ou comparative (IDC) ainsi que par le test de dosage d'interféron gamma (IFN- γ). Une limite principale de ces méthodes est leur manque de spécificité qui peut conduire à des résultats faussement positifs. De nombreuses mycobactéries, dites non tuberculeuses, sont décrites comme des agents interférant avec ces méthodes.

Une puce à PCR haut débit (BioMark, Fluidigm) qui permet de réaliser simultanément 4 608 PCR (24 cibles génétiques pour 192 échantillons) et cible des espèces de mycobactéries ou actinomycétales (18 agents différents) connues pour interférer dans le dépistage de la tuberculose, a été développée. Des investigations ont été menées dans un centre de reproducteurs où plusieurs taureaux ont montré des réactions non négatives à l'IDC ou à l'IFN- γ lors du dépistage annuel de la bTB. Des prélèvements de fèces et de nourriture ont été investigués.

Plusieurs candidats potentiellement responsables des réactions non négatives aux tests *ante mortem* ont été détectés. Cette étude ouvre de nouvelles perspectives quant aux méthodes d'investigations innovantes sur des prélèvements environnementaux et des échantillons d'aliments qui peuvent exposer les animaux à des agents interférant avec le dépistage de la bTB.

Mots-clés : tuberculose bovine, dépistage, interférence.

ABSTRACT

Screening for bovine tuberculosis (bTB) is based on the detection of the cell-mediated immune response by simple (SCIT) or comparative (SCCIT) cervical intradermal tests for tuberculosis as well as the gamma interferon assay (IFN- γ). A main limitation of these methods is their lack of specificity, which can lead to false positive results. Several non-tuberculous mycobacteria are described as agents interfering with these methods. A high-throughput PCR chip (BioMark, Fluidigm) that simultaneously performs 4608 PCRs (24 genetic targets for 192 samples) and targets mycobacteria or actinomycetales species (18 different agents) known to interfere in the detection of tuberculosis, has been developed. Investigations were carried out in a breeding centre where several bulls showed non-negative reactions to SCCIT or IFN- γ during annual bTB screening. Samples of faeces and food were investigated. Candidates potentially responsible for non-negative reactions to ante-mortem tests have been detected. This study opens new perspectives on innovative methods for investigating environmental and food samples that may expose animals to agents interfering with bTB screening.

Keywords: Bovine tuberculosis, Screening, Interference.



Reçu le 2 juin 2021 ; accepté le 11 juillet 2021

* Texte de la communication présentée en distanciel lors de la Journée scientifique AEEMA, 21 mai 2021

¹ LNR Tuberculose, Laboratoire de santé animale, Anses, Maisons-Alfort

² UMR Agroécologie, INRAE, Dijon

³ LNCR, Maisons-Alfort

⁴ Aalice, Paris

I - INTRODUCTION

Le dépistage de la tuberculose bovine (bTB) repose sur la détection de la réponse immunitaire à médiation cellulaire par des tests d'intradermotuberculation simple (IDS) ou comparative (IDC) ainsi que par le test de dosage d'interféron gamma (IFN- γ) [de la Rua-Domenech *et al.*, 2006 ; Delavenne *et al.*, 2020]. Les tests d'intradermotuberculation ont démontré être un outil de dépistage adéquat au niveau du troupeau, et plusieurs pays ont réussi à éradiquer la maladie sur la base de ce test. L'inclusion du test IFN- γ en parallèle s'est avéré être une méthode adéquate pour maximiser la détection des bovins infectés [Bezoz *et al.*, 2014]. Une limite principale de ces méthodes est leur manque de spécificité qui peut conduire à des résultats faussement positifs [Praud *et al.*, 2019]. De nombreuses mycobactéries, dites non tuberculeuses (MNT), sont décrites comme des agents interférant avec ces méthodes [Biet et Boschioli, 2014 ; Thorel, 1975]. Des antigènes communs avec ces MNT sont depuis longtemps décrits comme responsables de réactions non spécifiques, notamment avec l'IDS. La mise en place de l'IDC a permis d'améliorer la spécificité de ce test en écartant notamment les réactions causées par les mycobactéries du complexe *M. avium* [Biet et Boschioli, 2014 ; Thorel, 1978].

La présence de MNT dans le sol ou l'eau peut poser problème, car elles peuvent non seulement causer des lésions suspectes à l'abattoir mais également interférer avec les tests de dépistage. Ces mycobactéries environnementales entravent les campagnes d'éradication de la tuberculose bovine en générant des réactions faussement positives lors des tests de dépistage ou lors des inspections *post-mortem* [Biet et Boschioli, 2014]. Des mycobactéries responsables de ces interférences ont été décrites tant dans le milieu de l'élevage à partir de nœuds lymphatiques ou d'organes de bovins [Ghielmetti *et al.*, 2017] que dans la faune

sauvage [Ronai *et al.*, 2016; Varela-Castro *et al.*, 2020]. Cependant, peu de travaux ont été réalisés sur l'environnement des bovins afin d'identifier les sources potentielles de contaminations. La diversité des MNT à rechercher complique ce type d'analyse. Le développement d'outils haut débit permettant de rechercher plusieurs cibles sur un grand nombre d'échantillons ouvre de nouvelles perspectives. Les systèmes microfluidiques ont été appliqués dans des domaines variés : la recherche d'agents pathogènes chez les tiques [Michelet *et al.*, 2014] ou la détermination de la couleur des yeux et des cheveux à partir d'ADN ancien [Schmidt *et al.*, 2020] ou encore la détection de marqueurs discriminant certaines souches entérohémorragiques de l'espèce bactérienne *Escherichia coli* [Bugarel *et al.*, 2011].

Le blocage des cheptels indemnes de tuberculose à la suite de résultats de dépistage non négatifs est lourd de conséquences notamment dans le contexte particulier de centres de bovins reproducteurs. Ces animaux élevés dans des conditions sanitaires très strictes sont surveillés pour de nombreuses maladies, parmi lesquelles la tuberculose bovine et la paratuberculose.

Des investigations ont été menées dans un de ces centres où plusieurs taureaux ont montré des réactions non négatives à l'IDC ou à l'IFN- γ lors du dépistage annuel de la bTB. Afin d'identifier la source de ces réactions, un nouvel outil de PCR temps réel haut débit (Puce Fluidigm) a été utilisé. Cette méthode permet de réaliser simultanément 4 608 PCR (24 cibles génétiques pour 192 échantillons) et cible des espèces de mycobactéries ou actinomycétales (18 agents différents) connues pour interférer dans le dépistage de la tuberculose. Des analyses ont été réalisées sur des prélèvements de fèces de plusieurs animaux et des prélèvements d'aliments (foin et concentré).

II - MATÉRIEL ET MÉTHODE

1. TESTS ANTE MORTEM

Les tests IDC sont réalisés par les vétérinaires dans le cadre du programme de surveillance de la tuberculose bovine (en accord avec la directive européenne 64/432/EEC). Les protéines dérivées purifiées (PPD) bovine et aviaire (Zoetis, Louvain La Neuve, Belgique) ont été injectées par voie intradermique et séparément dans la région cervicale, après une mesure préalable de l'épaisseur

du pli de peau (épaisseur à J0 aux points d'injection de la tuberculine bovine, B0, et de la tuberculine aviaire, A0). En France, les tuberculines bovine et aviaire sont utilisées à la concentration de 25 000 unités internationales (IU)/ml. L'épaisseur du pli de peau aux points d'injection de la PPD bovine (B3) et aviaire (A3) est mesurée après 72h. Les différences d'épaisseur de pli de peau sont interprétées selon les règles du tableau 1.

Tableau 1

Interprétation des résultats de l'intradermotuberculation comparative (IDC)

Épaisseur du pli de peau au point d'injection de la PPD bovine (DB ¹ = B3-B0)	Différence d'épaisseur du pli de peau aux points d'injection de la PPD bovine (DB ¹ = B3-B0) et aviaire (DA ² = A3-A0)	Résultat de l'IDC
DB > 2mm	DB – DA > 4 mm	Positif
	1 mm ≤ DB – DA ≤ 4 mm	Douteux
	DB – DA < 1 mm	Négatif
DB ≤ 2 mm		Négatif

¹ DB : Différence d'épaisseur du pli de peau au point d'injection de la PPD bovine, ² DA : Différence d'épaisseur du pli de peau au point d'injection de la PPD aviaire

Pour réaliser le test IFN- γ , le sang total est incubé avec différents antigènes mycobactériens : PPD Lelystad bovine et aviaire (BOVIGAM Tuberculin PPDs, ThermoFisher) et un MIX d'antigènes spécifiques (Peptide Cocktail Prionics PC-EC, ThermoFisher). La libération d'IFN- γ est mesurée grâce à une méthode ELISA (BOVIGAM kit, ThermoFisher). Le test IFN- γ a été réalisé selon les

recommandations du fabricant. Les densités optiques (DOs) ont été transformées en pourcentage en comparant la DO de l'échantillon avec la DO du contrôle. L'interprétation des résultats se fait selon les critères établis dans le tableau 2, fondés sur des études précédentes [Faye *et al.*, 2011 ; Praud *et al.*, 2015].

Tableau 2

Interprétation des résultats de l'interféron gamma (IFN- γ)

Mix : antigènes spécifiques	Ratio PPD		
	PPD < 0,5	0,05 ≤ PPD < 0,3	PPD ≥ 0,3
MIX < 0,03	Négatif	Non conclusif	Positif
0,03 ≤ MIX < 0,1	Non conclusif	Positif	Positif
MIX ≥ 0,1	Positif si PPD _b > 0,7	Positif	Positif

2. EXTRACTION D'ADN DES ÉCHANTILLONS (FÈCES/NOURRITURE)

Trois aliquotes (répétitions) de 250 mg de chaque fèces de taureau ont été pesées à réception puis congelées à -20°C jusqu'à l'extraction d'ADN.

Des prélèvements de nourritures (granulés et foin) ont été réalisés. Le foin issu de quatre parcelles différentes a été prélevé : parcelle 1 récoltée le 02/06/20, parcelle 2 récoltée le 25/06/20, parcelle 3 (date de récolte inconnue), parcelle 4 récoltée le 28/05/20. Concernant ces échantillons : 1) les granulés ont été réhydratés à hauteur de 30 mL d'eau permutée pour 20 g pour permettre l'extraction d'ADN et 2) pour les foins, des lavages ont été réalisés suivi d'une centrifugation pour récupérer les culots contenant les microorganismes. Plus précisément, trois répétitions de 30 g par échantillon de foin ont été malaxées avec 300 mL d'eau permutée dans des sacs-filtres pleine page de 400 mL avec filtre micro-performé de 280 μ m (Interscience, référence 122 025), à l'aide du BagMixer® 400 SW (Interscience, référence 025 100), pendant 10 min à vitesse 1 soit 4 coups/seconde. 200 mL des eaux de

lavage ont ensuite été centrifugés à l'aide de bouteille 500 ml à 7 000 g pendant 10 min, les culots obtenus repris dans 2 mL d'eau permutée et centrifugés dans des tubes Eppendorf de 2 mL à 7 000 g pendant 5 min. Les culots ont été congelés à -20°C en vue de l'extraction d'ADN.

L'extraction d'ADN a été effectuée sur des échantillons de fèces de 250 mg ou des culots issus des lavages avec le kit DNeasy® PowerSoil® de QIAGEN selon les recommandations du fournisseur. L'étape de lyse mécanique au vortex a été remplacée par l'utilisation d'un broyeur à bille FastPrep® 24 de MP Biomedicals, réglé à 5 m/s pendant 30 s. Les concentrations des ADN obtenus ont ensuite été évaluées par mesure d'absorbance à 260 nm à l'aide d'un spectromètre optique Nanodrop.

3. PUCE PCR HAUT DÉBIT

Les ADN extraits ont été pré-amplifiés avec le kit Fluidigm PreAmp Master Mix (Fluidigm 100-5580) selon les recommandations du fabricant. Un volume équivalent de chaque amorce utilisée dans la

Puce est mélangé pour obtenir une concentration finale de 200 nM chacun. Le volume final de la PCR est de 5 µl, contenant 1µl de PreAmp MasterMix, 1,25 µl du mélange d'amorces, 1,5 µl d'eau et 1,25 µl d'ADN. Le programme de PCR consiste en un cycle à 95°C pendant 10 min., suivi de 14 cycles à 95°C pendant 15 sec. et 4 min. à 60°C. À la fin du programme, les échantillons sont dilués au 1 :10 et conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

Le système de PCR en temps réel BioMark™ (Fluidigm, États-Unis) a été utilisé pour l'amplification par PCR microfluidique en temps réel à haut débit en utilisant les puces « dynamic array » 192.24 (Fluidigm). Ces puces permettent de détecter 24 cibles génétiques (tableau 3) sur 192 échantillons dans des chambres individuelles, soit 4 608 réactions.

Tableau 3
Liste des 24 cibles génétiques de la puce Fluidigm

Classification [Gupta <i>et al.</i> , 2018]	Espèce ou genre	Séquence cible
<i>Mycobacterium</i> (clade tuberculosis-simiae)	<i>M. tuberculosis</i> complex (MTBC)	IS6110
	<i>M. bovis</i>	IS1561
	<i>M. microti</i>	RD4
	<i>M. kansasii</i>	MKAN_25265
	<i>M. intermedium</i>	BST27_RS22315
	<i>M. bourgelatii</i>	sodA
	<i>M. avium</i> complex (MAC)	IS1245
	<i>M. avium avium</i>	IS901
	<i>M. avium paratuberculosis</i>	IS900
	<i>M. intracellulare</i> complex (MIC)	CKJ61_23970
	<i>M. shimoidei</i>	BHQ16_09970
	<i>M. xenopi</i>	rubB
<i>Mycolicibacter</i> (clade terrae)	<i>M. engbaekii</i>	lipB
	<i>M. arupense</i>	pacB
	<i>M. nonchromogenicum</i>	AWC18_13700
	<i>M. terrae</i> complex (MTC)	AWC18_05335
<i>Mycolicibacterium</i> (clade fortuitum-vaccae)	<i>M. porcinum</i>	BST41_30145
	<i>M. smegmatis</i>	phoA
	<i>M. monacense</i>	BST34_02370
	<i>M. thermoresistibile</i>	echA8
	<i>M. vaccae</i>	MYVA_5355
Actinomycétales	<i>Mycobacterium</i> sp + Actinomycétales	hsp65
	<i>Rhodococcus equi</i>	sugE
Contrôle d'inhibition	<i>Ehrlichia canis</i>	dsb

Les amplifications ont été réalisées à l'aide de sondes TaqMan marquées par le fluorochrome 6-carboxyfluorescéine (FAM) et l'extincteur (BHQ1) avec le TaqMan Gene expression master mix (Applied Biosystems, France) conformément aux instructions du fabricant. Un mélange de 4,5 µl a été préparé pour chaque échantillon, contenant 2,25 µl de Perfecta qPCR tough mix (2x) (Quantabio, Beverly, MA, USA), 0,25 µl de Sample Loading Reagent (20x) (Fluidigm PN 85000746) et 1,9 µl d'ADN pré-amplifié dilué. Un mix d'amorces-sonde a été préparé pour chaque cible, contenant 18 µM de chaque amorce et 4 µM de sonde. Trois microlitres de ces mix ont été mélangés avec un volume égal de 2x assay loading reagent (Fluidigm PN 85000736). Trois microlitres de mélanges d'échantillons,

préparés comme décrit, ont ensuite été chargés dans chaque puits de la puce et trois microlitres de mélanges d'amorces-sonde ont été chargés dans les puits dédiés. La puce a ensuite été placée sur le contrôleur IFC RX pour le chargement et le mélange. Après environ 45 minutes, la puce était prête pour le programme thermique et la détection des produits de réaction sur le Biomark. Le cycle de PCR comprend deux minutes à 50 °C, 10 minutes à 95 °C, suivis de 40 cycles d'amplification en deux étapes de 15 secondes à 95 °C, une minute à 60 °C. Les données ont été acquises sur le système de PCR en temps réel BioMark™ et analysées à l'aide du logiciel d'analyse de PCR en temps réel Fluidigm pour obtenir les valeurs des points de croisement (CP).

Pour les échantillons de terrain, les PCR sont réalisées en duplicats (soit 96 échantillons par puce en double). Un résultat est considéré comme certain (positif) quand les duplicats ont donné le même résultat et douteux si la cible est détectée une fois sur deux. Un témoin négatif avec de l'eau est inclus dans chaque puce. Un mélange d'ADN de souches de toutes les espèces ciblées est également inclus. Afin d'identifier une inhibition potentielle, un plasmide contenant une séquence d'*Ehrlichia canis* et un couple amorce-sonde correspondant sont ajoutés comme contrôle interne [Michelet *et al.*, 2014].

4. PCR DE CONFIRMATION

Afin de confirmer les résultats obtenus pour la paratuberculose (cible IS900) (tableau 4), des PCR de confirmation sont effectuées sur 5 µl d'ADN afin de maximiser les chances de détecter la séquence cible. Les PCR sont réalisées dans un volume final de 25 µl avec le Master Mix TaqMan® Fast Universal PCR (Roche Applied Science, Germany) à une concentration finale de 1X, 300 nM d'amorces et 250 nM de sonde. Le cycle de PCR comprend deux minutes à 50°C et 20 secondes à 95°C, suivi de 50 cycles composés de deux étapes de trois secondes à 95°C et 30 secondes à 60°C.

Tableau 4

Amorces et sondes utilisées pour la PCR temps réel de confirmation

Séquence cible	Amorces-Sondes	Séquence 5' – 3'
IS900	TR IS900 F TR IS900 R TR IS900 P	ACC GCT AAT TGA GAG ATG CGA TT TGC CAC AAC CAC CTC CGT AA (FAM)-GTC GGC GTG GTC GTC TGC TGG GT-(BHQ1)

III - RÉSULTATS

1. TESTS ANTE MORTEM

Lors du dépistage réalisé en octobre 2020, cinq taureaux ont présenté des résultats douteux au test IDC (tableau 5). Ces animaux ont par la suite été testés à quatre reprises par le test IFN-γ (tableau 6).

Un seul animal (taureau 3) a montré des résultats positifs au test IFN-γ. À deux reprises, le test a réagi fortement à la PPD et une fois un résultat doublement

positif pour la PPD et le mix d'antigène spécifique a été observé.

Afin d'investiguer les agents responsables de ces réactions non négatives, des prélèvements de fèces des cinq taureaux douteux à l'IDC et de cinq taureaux négatifs à l'IDC (tableau 5) ont été analysés avec la Puce PCR haut débit. Des prélèvements de nourriture ont également été réalisés.

Tableau 5

Résultats aux tests IDC

	Mensuration des plis de peaux (en mm)							Interprétation
	Tuberculine aviaire			Tuberculine bovine			Différence	
	A0	A1	DA = A1-A0	B0	B1	DB = B1-B0		
Taureau 1	13	16,2	3,2	9	13,7	4,7	1,5	Douteuse
Taureau 2	14,9	15	0,1	11,2	14	2,8	2,7	Douteuse
Taureau 3	11,5	11,9	0,4	8,5	10,7	2,2	1,8	Douteuse
Taureau 4	14,9	15,2	0,3	10,1	12,5	2,4	2,1	Douteuse
Taureau 5	15,9	16,8	0,9	9,2	12,2	3	2,1	Douteuse
Taureau 6	8,8	8,8	0	9	10,2	1,2	1,2	Négative
Taureau 7	11,9	13,2	1,3	9	9,6	0,6	-0,7	Négative
Taureau 8	14	14,2	0,2	9,2	9,2	0	-0,2	Négative
Taureau 9	18,3	18,8	0,5	11,9	11,6	-0,3	-0,8	Négative
Taureau 10	12,3	14,1	1,8	9	10,2	1,2	-0,6	Négative

Tableau 6
Résultats IFN- γ

	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4
Taureau 1	Négatif	Non conclusif PPD	Non conclusif PPD	Négatif
Taureau 2	Non conclusif PPD	Négatif	Non conclusif PPD	Non conclusif PPD
Taureau 3	Positif PPD fort	Positif PPD fort	Non conclusif PPD	Double positif PPD+mix
Taureau 4	Non conclusif PPD	Non conclusif PPD	Non conclusif PPD	Négatif
Taureau 5	Non conclusif PPD	Non conclusif PPD	Négatif	Négatif

2. PUCE

Les résultats obtenus sur le système microfluidique et la confirmation pour la paratuberculose sont présentés dans le tableau 7. Tous les essais réalisés ont pu être validés car aucune inhibition ou contamination n'a été identifiée.

La cible généraliste permettant de détecter les genres *Mycobacterium*, *Mycolicibacter*, *Mycolicibacterium* ainsi que les actinomycétales a été détectée dans tous les échantillons des parcelles et des granulés mais dans aucun des échantillons de fèces. Ce résultat confirme la présence ubiquitaire de ces bactéries dans l'environnement.

Pour les cibles du groupe *Mycobacterium tuberculosis-simiae* [Gupta *et al.*, 2018], aucun

échantillon testé n'a été détecté avec les cibles du complexe de *M. tuberculosis* (MTBC), les cibles de *M. intermedium* ou *M. bourgelatii* ni les cibles permettant de détecter les complexes de *M. avium* (MAC) et de *M. intracellulare* (MIC). La cible spécifique à *M. avium avium* (IS901), plus sensible que la cible du MAC (IS1245) car cette séquence est répétée dans le génome, a été détectée de façon certaine dans les fèces du taureau 8 ainsi que dans la parcelle 2 (tableau 7), et de façon douteuse dans la parcelle 3. La cible spécifique de la paratuberculose a été détectée de façon certaine dans les fèces du taureau 2 et dans les parcelles 1 et 2, ainsi que de façon douteuse dans les fèces du taureau 7 et de la parcelle 4. La cible spécifique de *M. kansasii* a été détectée dans les échantillons de la parcelle 1 et 2, respectivement de façon certaine et douteuse.

Tableau 7**Bilan des résultats obtenus sur la puce PCR haut débit et la confirmation de la paratuberculose**

	Puce PCR haut débit						Confirmation	
	<i>M. kansasii</i>	<i>M. avium avium</i>	<i>M. avium paratuberculosis</i>	Complexe de <i>M. terrae</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. vaccae</i>	Mycobacterium sp + Actinomycétales	<i>M. avium paratuberculosis</i>
Taureau 1	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	positif
Taureau 2	négatif	négatif	positif	négatif	négatif	négatif	négatif	positif
Taureau 3	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	positif
Taureau 4	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif
Taureau 5	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif
Taureau 6	négatif	négatif	négatif	positif	négatif	négatif	négatif	négatif
Taureau 7	négatif	négatif	douteux	positif	négatif	négatif	négatif	positif
Taureau 8	négatif	positif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif
Taureau 9	négatif	négatif	négatif	négatif	positif	négatif	négatif	négatif
Taureau 10	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	positif
Parcelle 1	positif	négatif	positif	positif	négatif	négatif	positif	positif
Parcelle 2	douteux	positif	positif	négatif	négatif	négatif	positif	douteux
Parcelle 3	négatif	douteux	négatif	douteux	négatif	négatif	positif	négatif
Parcelle 4	négatif	négatif	douteux	positif	négatif	positif	positif	positif
Granulés	négatif	négatif	négatif	positif	négatif	négatif	positif	négatif

En ce qui concerne le groupe *Mycolicibacter* (clade *terrae*), seule la cible générique du complexe *M. terrae* a été détectée dans les fèces de deux taureaux (6 et 7), dans les parcelles 1 et 4 ainsi que dans les granulés. Aucune cible spécifique d'une des espèces de ce groupe n'a pu être mise en évidence.

Pour le groupe *Mycolicibacterium* (clade *fortuitum-vaccae*), seules des cibles spécifiques de *M. smegmatis* et *M. vaccae* ont été détectées, respectivement dans les prélèvements de fèces du taureau 9 et dans la parcelle 4.

Afin d'investiguer en détail la présence de paratuberculose dans les échantillons, des PCR de confirmation sur un volume plus important d'ADN ont été réalisées afin d'augmenter la sensibilité. La présence d'ADN de *M. avium paratuberculosis*

(Map) a été mise en évidence dans les fèces des taureaux 1, 2 et 3, animaux ayant eu des réactions douteuses à l'IDC et également dans les fèces des taureaux 7 et 10, animaux de la population contrôle.

IV - DISCUSSION

La puce Fluidigm a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs mycobactéries. L'ADN de *Map* a été détecté à la fois dans les fèces des taureaux réagissant et non réagissant à l'IDC, ainsi que dans les aliments. Connue pour être une des sources principales des réactions non spécifiques aux tests *ante mortem* pour la tuberculose bovine, la paratuberculose pourrait être en partie à l'origine des réactions non négatives de cette étude. Cependant, d'une part, la détection de l'ADN ne signifie pas pour autant une infection active chez les animaux, qui par ailleurs sont également surveillés pour la paratuberculose par des dépistages sérologiques réguliers. D'autre part, dans le cadre d'un suivi strict vis-à-vis de l'infection à *Map*, les tests de dépistage/diagnostic pour la paratuberculose manquent de sensibilité. Un renforcement par le biais de tests réguliers de détection directe par PCR dans les fèces afin de confirmer l'infection des animaux serait plus pertinent pour détecter l'infection. En effet, l'excrétion de cette bactérie peut être intermittente et sa détection aléatoire, les animaux infectés pouvant excréter la bactérie sans pour autant être séropositifs [Navarro-Gonzalez *et al.*, 2019] : la sérologie ne serait pas adaptée à des contextes de très faible prévalence de la maladie et notamment sur des animaux dans un très bon état physiologique comme les taureaux reproducteurs.

Mycobacterium kansasii, connue pour ses interférences dans le diagnostic de la tuberculose, a également été détectée dans les aliments des animaux. Cette mycobactérie a été isolée à partir de milieux aquatiques naturels mais également dans de la terre et de l'humus [Biet et Boschioli, 2014]. La présence de cette mycobactérie peut provoquer des réactions positives avec le test IFN- γ notamment en ce qui concerne les antigènes spécifiques contenus dans le « MIX » (ESAT-6 (Early Secreted Antigen target 6) et CFP-10 (Culture Filtrate Protein 10)). En effet, la comparaison des séquences homologues d'ESAT-6 et CFP-10 de *M. kansasii* et de *M. bovis* a démontré une forte homologie (>95 %) au niveau de la séquence d'acides aminés [Arend *et al.*, 2005]. Des réactions croisées entre les homologues ESAT-6 et CFP-10 de *M. kansasii* et de *M. bovis* peuvent

gêner l'interprétation des tests d'immunodiagnostic de la tuberculose [Scherrer *et al.*, 2019 ; Vordermeier *et al.*, 2007]. Cependant, l'utilisation de ces antigènes spécifiques a permis d'augmenter la sensibilité et la spécificité du test IFN- γ [Nunez-Garcia *et al.*, 2018].

D'autres mycobactéries ont été détectées mais de manière plus anecdotique : *M. avium avium*, *M. smegmatis*, *M. vaccae* et des mycobactéries du complexe *M. terrae*. Il existe de nombreuses niches environnementales où ces MNT sont rencontrées mais les plus importantes sont l'eau et le sol ainsi que des invertébrés et des organismes protozoaires trouvés dans ces substrats [Biet et Boschioli, 2014]. Les MNT ont également la capacité naturelle de former des structures de type biofilm, principalement en raison de leur surface cellulaire très hydrophobe [Pereira *et al.*, 2020]. Ils peuvent ainsi résister pendant des périodes longues dans l'environnement et constituer une source d'exposition récurrente pour les animaux.

Cette étude dans un centre de reproducteurs permet une investigation dans un environnement très contrôlé. Les sources de contaminations potentielles sont moins nombreuses qu'en élevage classique où ce type d'interférence est également très courant lors du dépistage de la bTB. Dans le cadre du centre de reproducteurs, d'autres investigations pourraient être menées, avec des prélèvements plus réguliers des fèces et un contrôle de chaque lot de nourriture. Quant aux élevages classiques, des études similaires à celle-ci sont en cours à l'heure actuelle en Côte-d'Or afin d'identifier les sources environnementales des agents qui interfèrent avec les tests *ante-mortem* de la bTB. Il serait également opportun d'élargir nos investigations sur les sources d'exposition des animaux aux autres bactéries qui interfèrent avec le diagnostic, cette fois histologique. En particulier, *Rhodococcus equi* est l'agent causal de 90 % de réactions histologiques faussement positives [Michelet *et al.*, 2016] pour lequel il serait pertinent d'identifier les sources de contamination qui provoquent plus de 120 blocages inutiles de cheptels par an.

V - CONCLUSION

Cette étude a montré l'intérêt de la technologie de la puce à PCR haut débit pour expliquer des réactions non négatives aux tests de dépistage de la tuberculose de cheptels indemnes. Plusieurs candidats potentiellement responsables des réactions non négatives aux tests *ante mortem* ont été détectés. Cependant, la détection de ces bactéries ne prouve pas leur rôle dans les interférences observées. Des études ultérieures sont nécessaires afin d'établir le lien entre l'agent et les interférences dans le dépistage. Les traces de paratuberculose identifiées mettent en évidence le risque d'exposition, mais pas

forcément l'infection des animaux, qui pourraient néanmoins amener à des réactions non spécifiques mais suffisamment détectables au test de dépistage bTB. Des tests ultérieurs sur d'autres prélèvements permettraient de conforter ces résultats. Cette étude ouvre de nouvelles perspectives quant aux méthodes d'investigations innovantes sur des prélèvements environnementaux et des échantillons d'aliments. Les centres de reproducteurs sont des candidats intéressants pour mener de telles investigations du fait d'une maîtrise sanitaire pointue de ce type d'élevage.

BIBLIOGRAPHIE

- Arend S.M., de Haas P., Leyten E., Rosenkrands I., Rigouts L., Andersen P., Mijs W., van Dissel J.T., van Soelingen D. - ESAT-6 and CFP-10 in clinical versus environmental isolates of *Mycobacterium kansasii*. *J. Infect. Dis.*, 2005, **191**, 1301-1310.
- Bezoz J., Casal C., Romero B., Schroeder B., Hardegger R., Raeber A.J., Lopez L., Rueda P., Dominguez L. - Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.*, 2014, **97** Suppl, S44-52.
- Biet F., Boschioli M.L. - Non-tuberculous mycobacterial infections of veterinary relevance. *Res. Vet. Sci.*, 2014, **97** Suppl, S69-77.
- Bugarel M., Beutin L., Scheutz F., Loukiadis E., Fach P. - Identification of genetic markers for differentiation of Shiga toxin-producing, enteropathogenic, and avirulent strains of *Escherichia coli* O26. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, **77**, 2275-2281.
- 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, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.*, 2006, **81**, 190-210.
- Delavenne C., Pandolfi F., Girard S., Réveillaud E., Jabert P., Boschioli L., Dommergues L., Garapin F., Keck N., Martin F., Moussu M., Philizot S., Rivière J., Tourette I., Calavas D., *et al.* - Bovine tuberculosis: Results and analysis of the epidemiological status of metropolitan France between 2015 and 2017. *Bull. Epid. Santé Anim. Alim.*, 2020, **85**.
(https://be.anses.fr/sites/default/files/O-034_2019-10-29_Tub-Bilan_Delavenne_Maq2_0.pdf)
- Faye S., Moyen J.L., Gares H., Bénét 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-gamma assay (Bovigam(R)) in a low prevalence area in France. *Vet. Microbiol.*, 2011, **151**, 60-67.
- Ghielmetti G., Friedel U., Scherrer S., Sarno E., Landolt P., Dietz O., Hilbe M., Zweifel C., Stephan R. - Non-tuberculous Mycobacteria isolated from lymph nodes and faecal samples of healthy slaughtered cattle and the abattoir environment. *Transbound Emerg. Dis.*, 2017, **65**, 711-718.
- Gupta R.S., Lo B., Son J. - Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. *Front Microbiol.*, 2018, **9**, 67.
- Michelet L., Delannoy S., Devillers E., Umhang G., Aspan A., Juremalm M., Chirico J., van der Wal F.J., Sprong H., Boye Pihl T.P., Klitgaard K., Bodker R., Fach P., Moutailler S. - High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. *Front Cell. Infect. Microbiol.*, 2014, **4**, 103.

- Michelet L., Phalente Y., Karoui C., De Cruz K., Henault S., Boschioli M. - Amélioration dans le diagnostic direct de la tuberculose bovine : la biologie moléculaire à la rescousse de l'histopathologie. *Épidémiol. Santé Anim.*, 2016, **70**, 51-58.
- Navarro-Gonzalez N., Fourichon C., Blanquefort P., Delafosse A., Joly A., Ngwa-Mbot D., Biet F., Boichard D., Schibler L., Journaux L., Meens E., Guatteo R. - Longitudinal study of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* fecal shedding patterns and concurrent serological patterns in naturally infected dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 2019, **102**, 9117-9137.
- Nunez-Garcia J., Downs S.H., Parry J.E., Abernethy D.A., Broughan J.M., Cameron A.R., Cook A.J., de la Rua-Domenech R., Goodchild A.V., Gunn J., More S.J., Rhodes L., Rolfe S., Sharp M., Upton P.A. *et al.* - Meta-analyses of the sensitivity and specificity of ante-mortem and post-mortem diagnostic tests for bovine tuberculosis in the UK and Ireland. *Prev. Vet. Med.*, 2018, **153**, 94-107.
- Pereira A.C., Ramos B., Reis A.C., Cunha M.V. - Non-Tuberculous Mycobacteria: Molecular and Physiological Bases of Virulence and Adaptation to Ecological Niches. *Microorganisms*, 2020, **8**, 1380.
- Praud A., Boschioli M.L., Meyer L., Garin-Bastuji B., Dufour B. - Assessment of the sensitivity of the gamma-interferon test and the single intradermal comparative cervical test for the diagnosis of bovine tuberculosis under field conditions. *Epidemiol. Infect.*, 2015, **143**, 157-166.
- Praud A., Bourelly C., Boschioli M.L., Dufour B. - Assessment of the specificity of a gamma-interferon test performed with specific antigens to detect bovine tuberculosis, after non-negative results to intradermal tuberculin testing. *Vet. Rec. Open*, 2019, **6**, e000335.
- Ronai Z., Eszterbauer E., Cservincsik A., Guti C.F., Dencso L., Janosi S., Dan A. - Detection of wide genetic diversity and several novel strains among non-*avium* nontuberculous mycobacteria isolated from farmed and wild animals in Hungary. *J. Appl. Microbiol.*, 2016, **121**, 41-54.
- Scherrer S., Landolt P., Friedel U., Stephan R. - Distribution and expression of *esat-6* and *cfp-10* in non-tuberculous mycobacteria isolated from lymph nodes of slaughtered cattle in Switzerland. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2019, **31**, 217-221.
- Schmidt N., Schucker K., Krause I., Dork T., Klintschar M., Hummel S. - Genome-wide SNP typing of ancient DNA: Determination of hair and eye color of Bronze Age humans from their skeletal remains. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 2020, **172**, 99-109.
- Thorel M.-F. - Les mycobactéries chez l'animal. *Cah. Méd. Vét.*, 1975, **44**, 71-80.
- Thorel M.-F. - A propos de l'incidence de *Mycobacterium avium* dans la tuberculose bovine. *Bulletin de la société vétérinaire pratique de France*, 1978, **62**, 3-7.
- Varela-Castro L., Torrontegi O., Sevilla I.A., Barral M. - Detection of Wood Mice (*Apodemus sylvaticus*) Carrying Non-Tuberculous Mycobacteria Able to Infect Cattle and Interfere with the Diagnosis of Bovine Tuberculosis. *Microorganisms*, 2020, **8**, 374.
- Vordermeier H.M., Brown J., Cockle P.J., Franken W.P., Drijfhout J.W., Arend S.M., Ottenhoff T.H., Jahans K., Hewinson R.G. - Assessment of cross-reactivity between *Mycobacterium bovis* and *M. kansasii* ESAT-6 and CFP-10 at the T-cell epitope level. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2007, **14**, 1203-1209.



Les auteurs attestent n'avoir aucun conflit d'intérêt.