



ZOOLOGIE  
PARC  
PARIS

# Evolution dans le diagnostic de la tuberculose chez Les espèces sauvages

Dr Alexis Lécu  
Paris Zoo

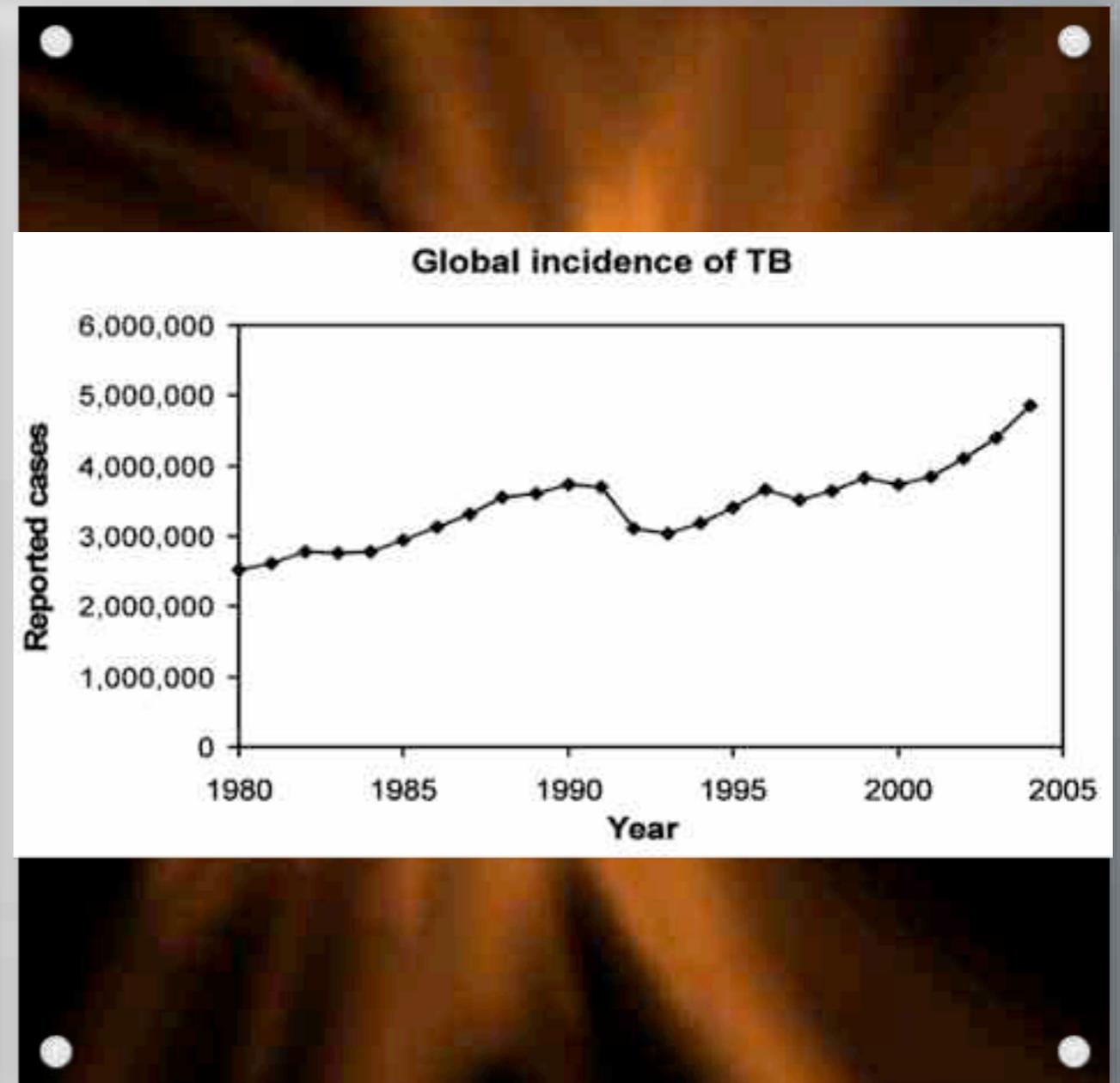




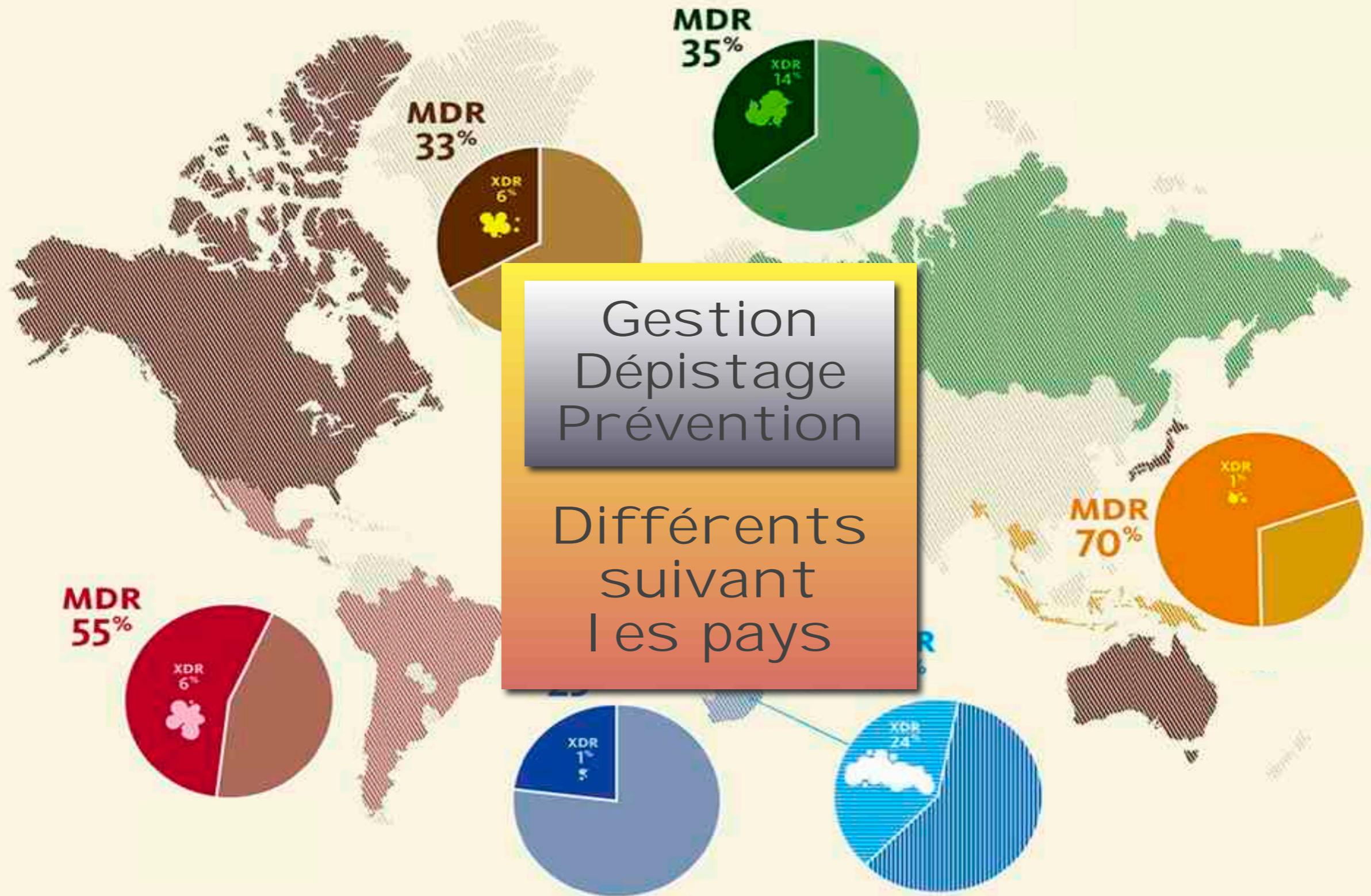
# Introduction



- OMS 2005 : 1 personne sur 3 contaminée dans le monde
- 2 millions de morts par an
- 14-16 millions Tb active, 6-8 millions nouveaux cas /an



# REPARTITION MONDIALE DES CAS RESISTANTS



Gestion  
Dépistage  
Prévention

Différents  
suivant  
les pays

# Mycobactéries

- 3 groupes de mycobactéries:
  - Complexe "tuberculosis"
  - *M. leprae*
  - Mycobactéries atypiques
- Mb & espèces sauvages
  - milieu sauvage
  - milieu captif
- Intérêt supplémentaire pour les mycobactéries atypiques en zoo :
  - Ex: *M. marinum*
  - Ex: *M. Szulgai* (éléphant, amphibiens)
  - Ex : *M. avium* (oiseaux, primates, herbivores)

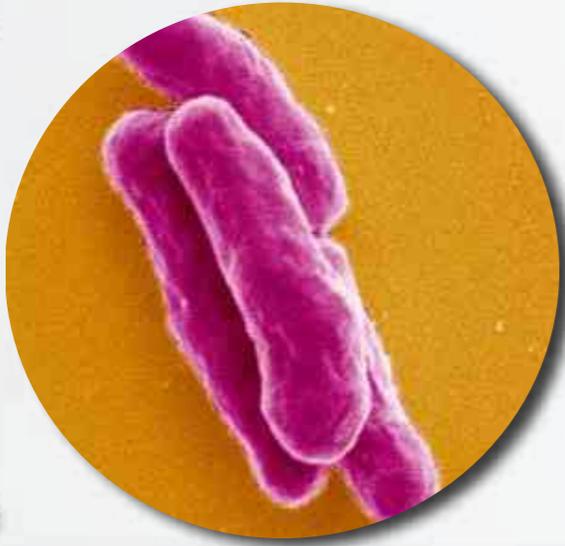
MYCOBACTERIE TUBERC. COMPL.	HÔTES PRINCIPAUX CONNUS
<i>M. tuberculosis</i>	PRIMATES, HOMME
<i>M. bovis</i>	RUMINANTS (DOMESTIQUES & SAUVAGES)
<i>M. africanum</i>	HOMME
<i>M. microti</i>	CAMPAGNOL, CAMELIDÉS
<i>M. pinnipedii</i>	PINNIPÈDES, TAPIRS
<i>M. caprae</i>	CHÈVRE, MOUTON, PORC
<i>M. canetti</i>	HOMME
" <i>Dassie bacillus</i> "	DAMANS



# Espèces sensibles en parc Zoologique

- Sensibilité théorique de tous les vertébrés
- Variabilité :
  - Prim. ancien monde >> nm
  - Eléphant Asie >> Afrique
  - cervidés
- Anciennes importations du milieu naturel
- Contact avec de nouvelles mycobactéries

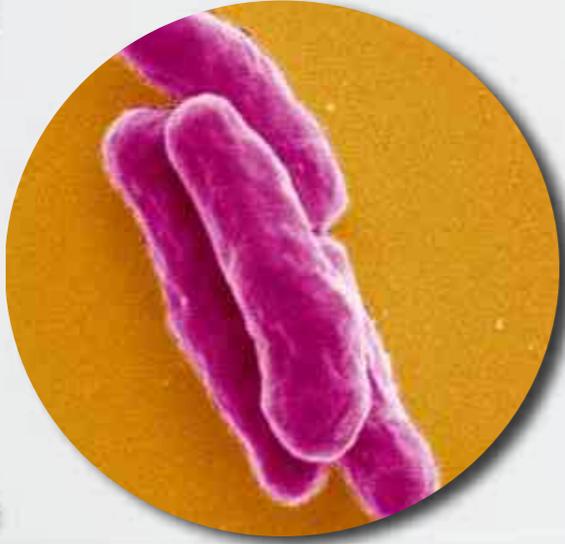




# Pathogénie & Immunologie

- <10 bacilles de M.tuberculosis peuvent infecter l'homme
- 1 seul bacille peut infecter un singe de l'ancien monde
- voie d'entrée et localisation des lésions :
  - Oral digestive
  - aérienne alvéolaire
  - transcutané tégument
  - lymphatique,...

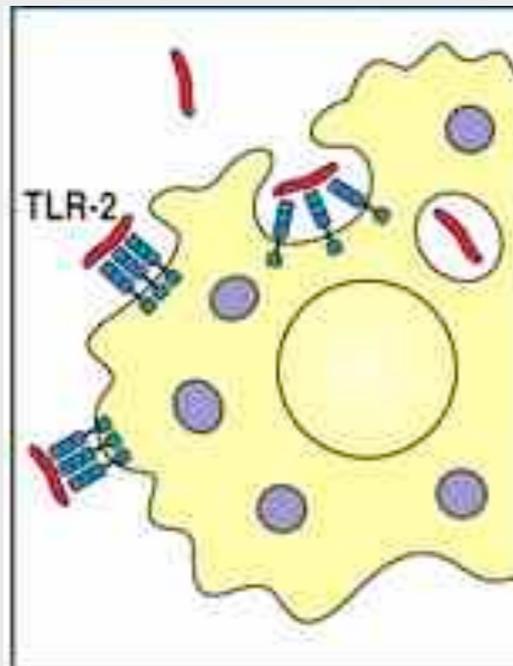


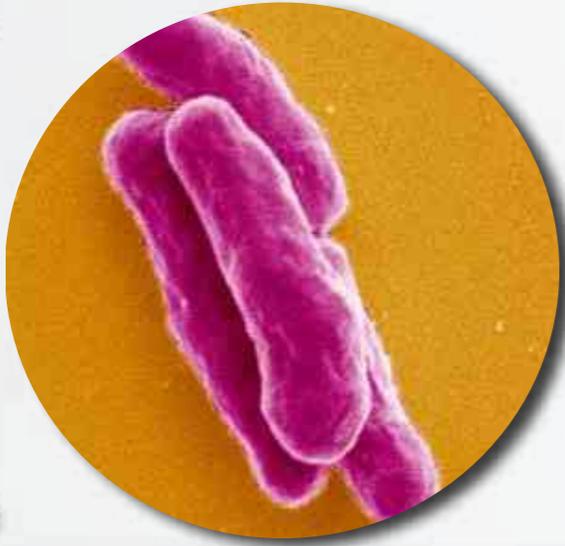


# Pathogénie & Immunologie

- Les mycobactéries sont phagocytées par les macrophages locaux, (mais peuvent aussi être traitées par les neutrophiles ou les mastocytes)

Mécanismes  
de résistance





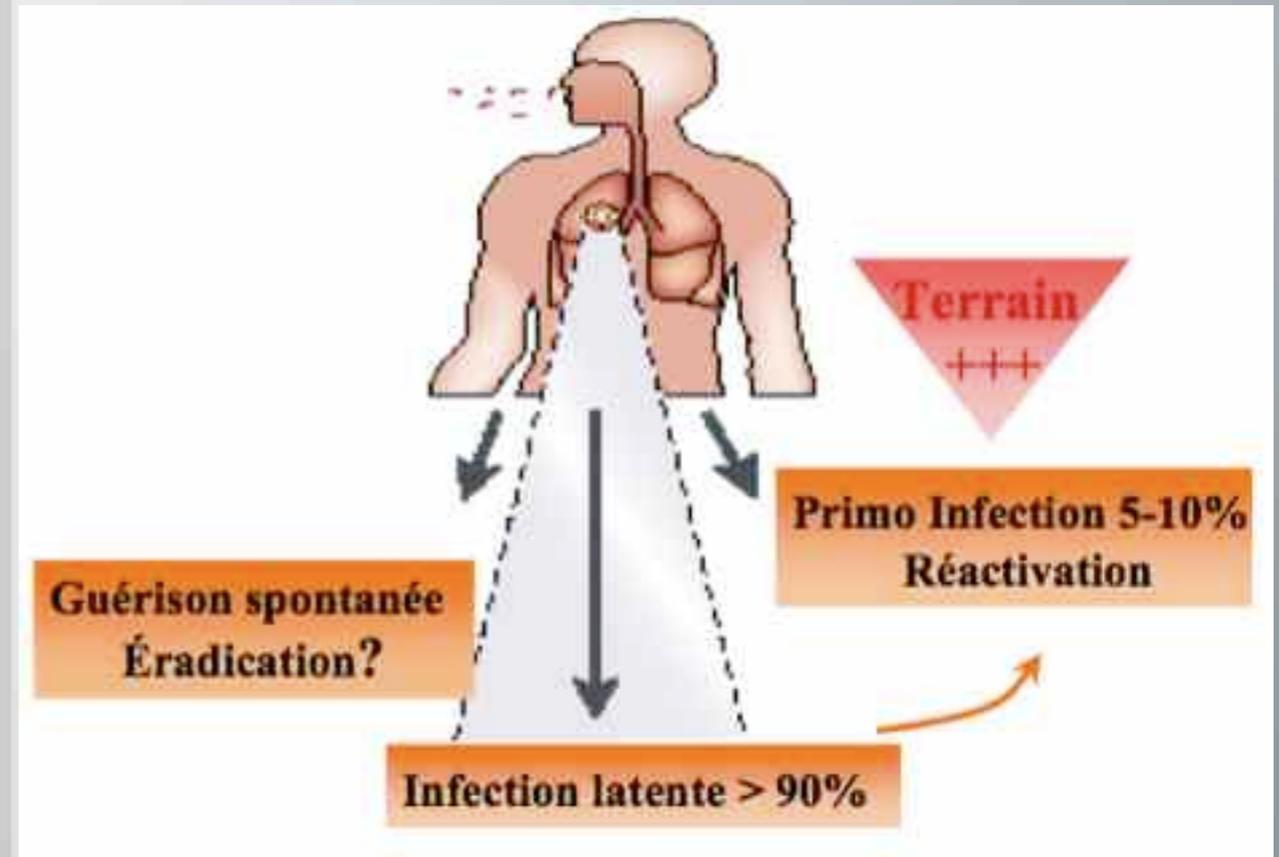
# Pathogénie & Immunologie

Equilibre  
entre les  
voies Th1-Th2

Particularités  
genotypiques  
spécifiques



Evolution infectieuse





# Méthodes diagnostiques disponibles en zoo

## Non Spécifique

- Examen clinique
- Hématologie
- Imagerie
  - Endoscopie
  - Rx
  - Scanner
- Colorations

## Immunité Cellulaire

- IDR
- T.T.L
- $\gamma$ -interféron

## Immunité Humorale

- ELISA
- MAPIA
- Rapid-Test®

## DIRECT

- Culture
- Pcr,...

non spécifique



# Examen Clinique

- Amaigrissement chronique
- Toux / Dyspnée
- Diarrhée
- Adénopathie
- Anorexie
- Abscès
- ...

**Peu fiable**



Non Spécifique



# Hématologie & Biochimie

- Neutrophilie transitoire Lors de la primo infection
- Lymphocytose possible (oiseaux), Pancytopenie dans Les formes pulmonaires actives
- Diminution possible des protéines totales et des  $\gamma$ - &  $\beta$ - globulines,  $\alpha_2$ -globuline peut augmenter



Non Spécifique

# Imagerie

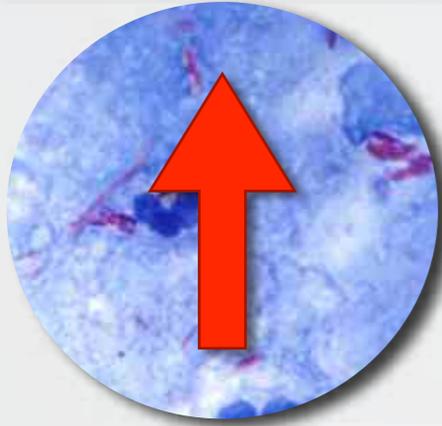


- Endoscopie et Laparoscopie pour voir et prélever Les Lésions
- RX: Intérêt Limité chez Les espèces sauvages
- Scanner
- Echographie,....



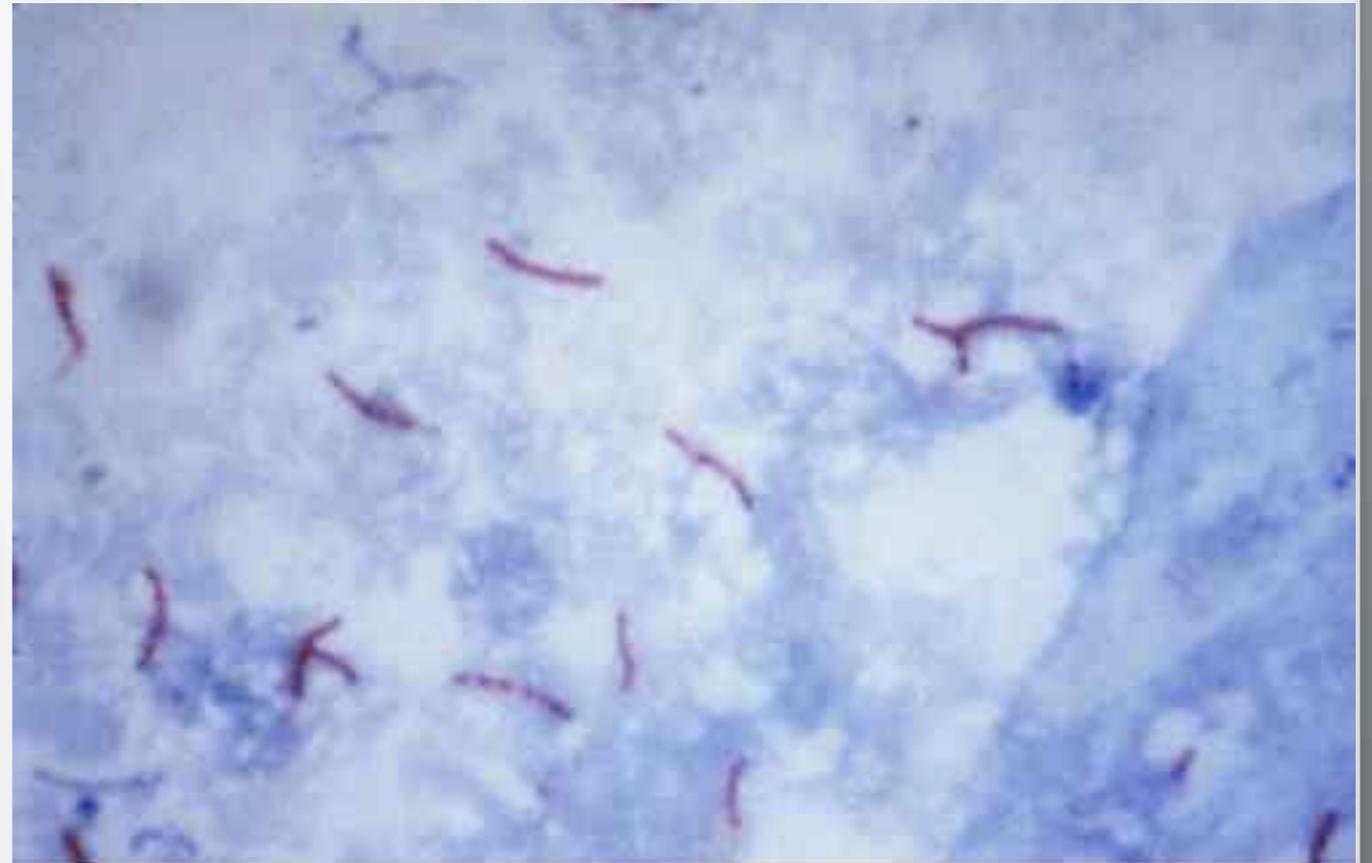
Non spécifique

Examen direct



# Colorations

- Bacille alcoolo acido résistant
- Coloration de Ziehl Neelsen
- sur prélèvements histologique, selles...  
prélèvements paucibacillaires
- Bactéries AAR :
  - Nocardia
  - Corynebacterium
- Limite de detection !



## Examen Direct

# CULTURE

- Examen de référence
- Seuil de détection par culture :  $10-10^2/\text{ml}$  (>à certaines doses infectieuses !)
- Délai de 2 à 8 semaines
- Antibiogramme



## Examen Direct

# Techniques moléculaires

- PCR
  - Nombreuses sondes permettant une spéciation précoce
  - sensibilité souvent  $< 80\%$  décroissante avec le nombre de bacilles (seuil vers  $10^4$  bacilles/ml) → mauvaises VP.
  - contamination des prélèvements
- Autres techniques
  - VTNR-MIRU
  - Spoligotyping (Locus DR)
  - → suivi des souches



# Immunité Cellulaire

## IDR

- Réaction d'hypersensibilité IV
- recrutement local de cellules inflammatoires
- Lecture en 72-96h
- Variations :
  - Site anatomique
    - pli queue, cervical, oreille
    - paupière, abdomen ventral-
  - Antigène - tuberculine
    - MOT, PPD, Ag purifié
    - IDR comparative
    - Sensibilité :  
MOT > BvPPD > HuPPD
  - Volumes et concentration
  - Fréquences / Intervalles



# Immunité Cellulaire

## IDR

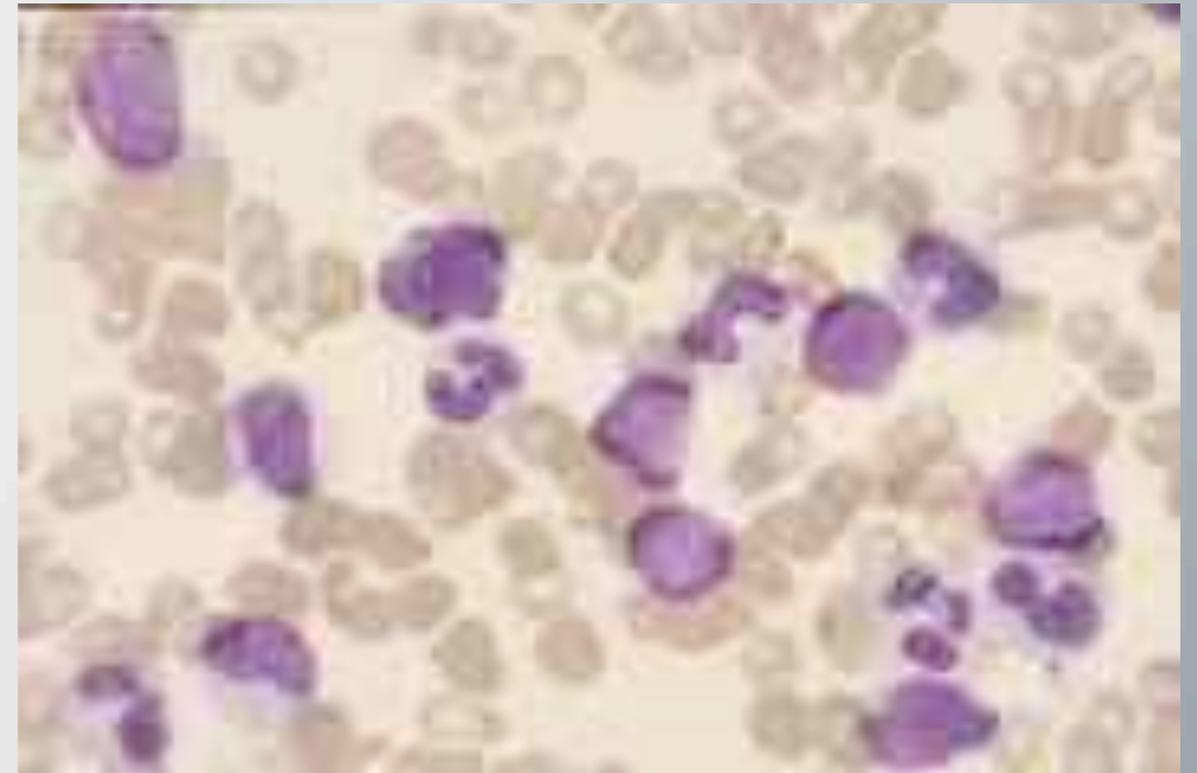
- Lecture : Critères positifs : œdème, érythème, ptôse...
- Réaction de Koch !
- Faux négatifs :
  - pachyderme
  - Température,...
  - Infection avancée, Anergie
  - immunosuppression
  - Autres maladies,...
- Faux positifs :
  - Mb Atypiques
  - Inflammations locales
  - Part. d'espèces.



## Immunité cellulaire

# Stimulation Lymphoblastique

- Stimulation des Lymphocytes in vitro par des antigènes mycobactériens
- nécessite la manipulation de marqueurs radioactifs
- mauvaise reproductibilité sur le terrain.

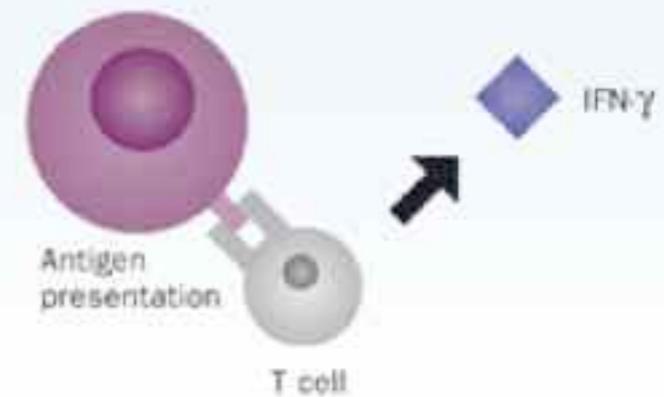


## Immunité cellulaire

# Tests au !-Interferon

- En présence d'antigène mycobactérien, les Lymphocytes déjà sensibilisés produisent de l'interféron, dosé ensuite par un ELISA
- Nécessite des Lymphocytes vivants
- Bonne reproductibilité sur certaines espèces sauvages
- Essais de pré-validation depuis 2005

1



## Immunité cellulaire

# Tests au !-Interferon

- Meilleure sensibilité que l'IDR (cervidés, primates)
- Aspect qualitatifs des résultats en fonction de l'antigène choisi
  - PPD Bovine, PPD Aviaire
  - filtrats M.tuberculosis
  - Ag purifiés (! BCG)
  - ~ variation de la spécificité
- Réponse cinétique et semi-qualitative.
- ELISPOT >> ELISA

DTH/skin test	PRIMAGAM (WBC)	PBMC	
0/6	0/6	0/6	<u>cynomolgus</u>
2/6	6/6	6/6	pre-infection
			post-infection
0/8	0/8	0/8	<u>rhesus</u>
7/8	8/8	8/8	pre-infection
			post-infection

## Immunité cellulaire

# Tests au !-Interferon

- Qualité des réactifs variable entre les lots
- Le contrôle mitogène n'est pas inclus dans le primagam
- Le contrôle mitogène est spécifique (PHT, conA, SEB,...)
- Lymphocytes :
  - doivent être présents
  - doivent rester vivants
- SPECIFICITE de L'ELISA
  - Etude Paris Zoo
  - création d'ELISA

## Mycobacterium tuberculosis Gamma Interferon Test Kit for Non-Human Primates

CONDITIONALLY LICENSED BY USDA FOR SALE IN THE USA.  
Field data collection in additional species of primates is underway.  
Final potency test requires further validation.

An *in vitro* diagnostic test kit for detection

Cloning, sequencing and expression of white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) and the production of rhinoceros IFN- $\gamma$  specific antibodies

D. Morar<sup>a,\*</sup>, E. Tijhaar<sup>b</sup>, A. Negrea<sup>b</sup>, J. Hendriks<sup>b</sup>, D. van Haarlem<sup>b</sup>,  
J. Godfroid<sup>a</sup>, A.L. Michel<sup>c</sup>, V.P.M.G. Rutten<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Veterinary Tropical Diseases, University of Pretoria, Private Bag X04, Onderstepoort 0110, South Africa

<sup>b</sup>Department of Infectious Diseases and Immunology, Utrecht University, Yalelaan 1, 3584 CL Utrecht, The Netherlands

<sup>c</sup>TB Laboratory, Onderstepoort Veterinary Institute, Private Bag X05, Onderstepoort 0110, South Africa

Received 28 July 2006; received in revised form 16 October 2006; accepted 19 October 2006

### INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) is a disease of primates caused by *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium africanum* organisms. This progressive disease has been reported in orangutan, chimpanzee, gorilla, gibbon, colobus (queezas), squirrel monkey, macaque, marmoset, mandrill and baboon.

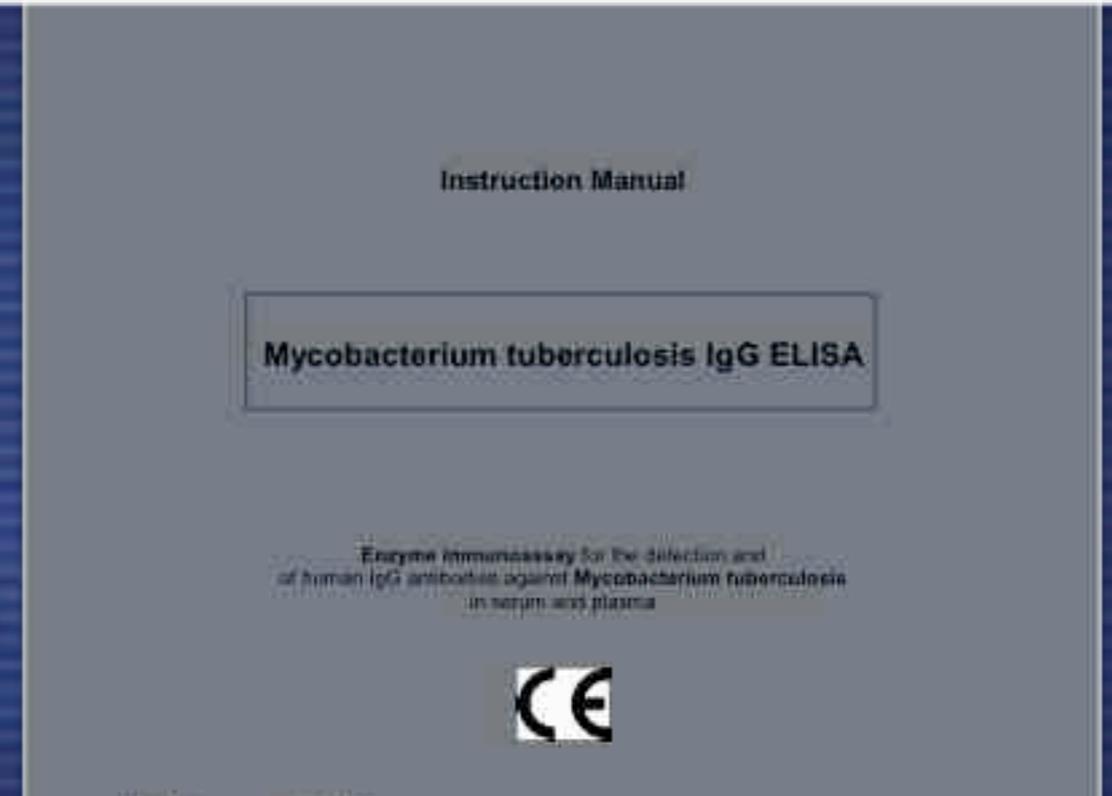
The disease can be transmitted to animal caretakers in zoos and research laboratories. The disease in primates presents a public health hazard. The traditional method to test primates for TB is the Intradermal Eyelid Skin Test. This procedure requires that animals are anesthetized and detection is based upon inflammation and swelling at the site of injection. The *Mycobacterium tuberculosis* Gamma Interferon Test Kit for Non-Human Primates is used for detection of tuberculosis in primates either in association with or as an alternative to the Intradermal Eyelid Skin Test.

# Sérologie ELISA

- Détection d'anticorps circulant (IgE, IgG,...)
- Choix des antigènes
  - MPB70, MPB83
  - ESAT6, CFP10
  - PPD, ...
- Controverses en Med.Humaine
- Meilleure détection en cas de TB maladie
- Essais chez les herbivores, les primates et les oiseaux

SP ?

- Facile et rapide
- Nécessite peu de sang
- Aspect cinétique



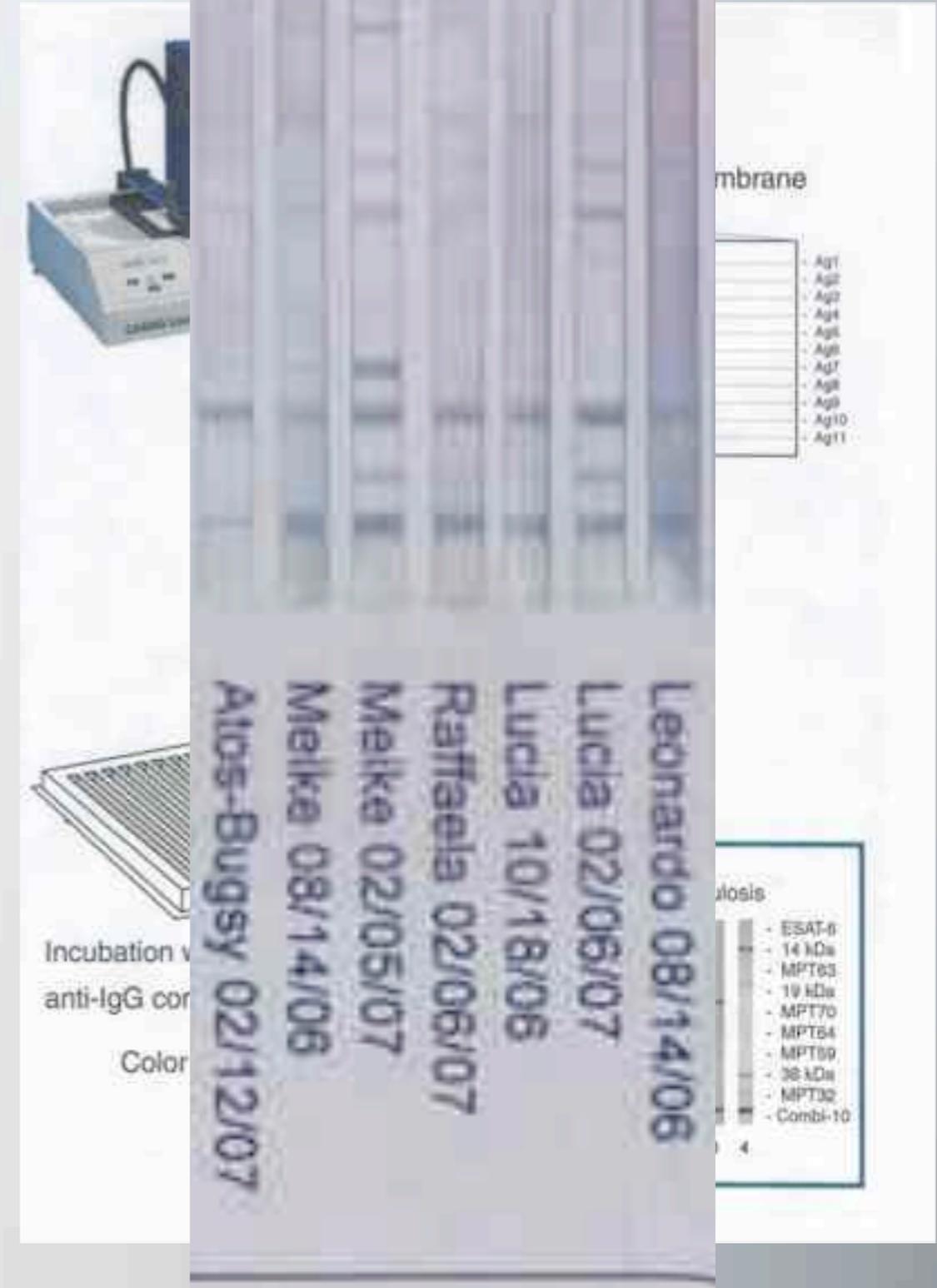
## Spécificité ???

- Hôte
- Mycobactérie
- Aucune étude validée

# Serologie

## M.A.P.I.A

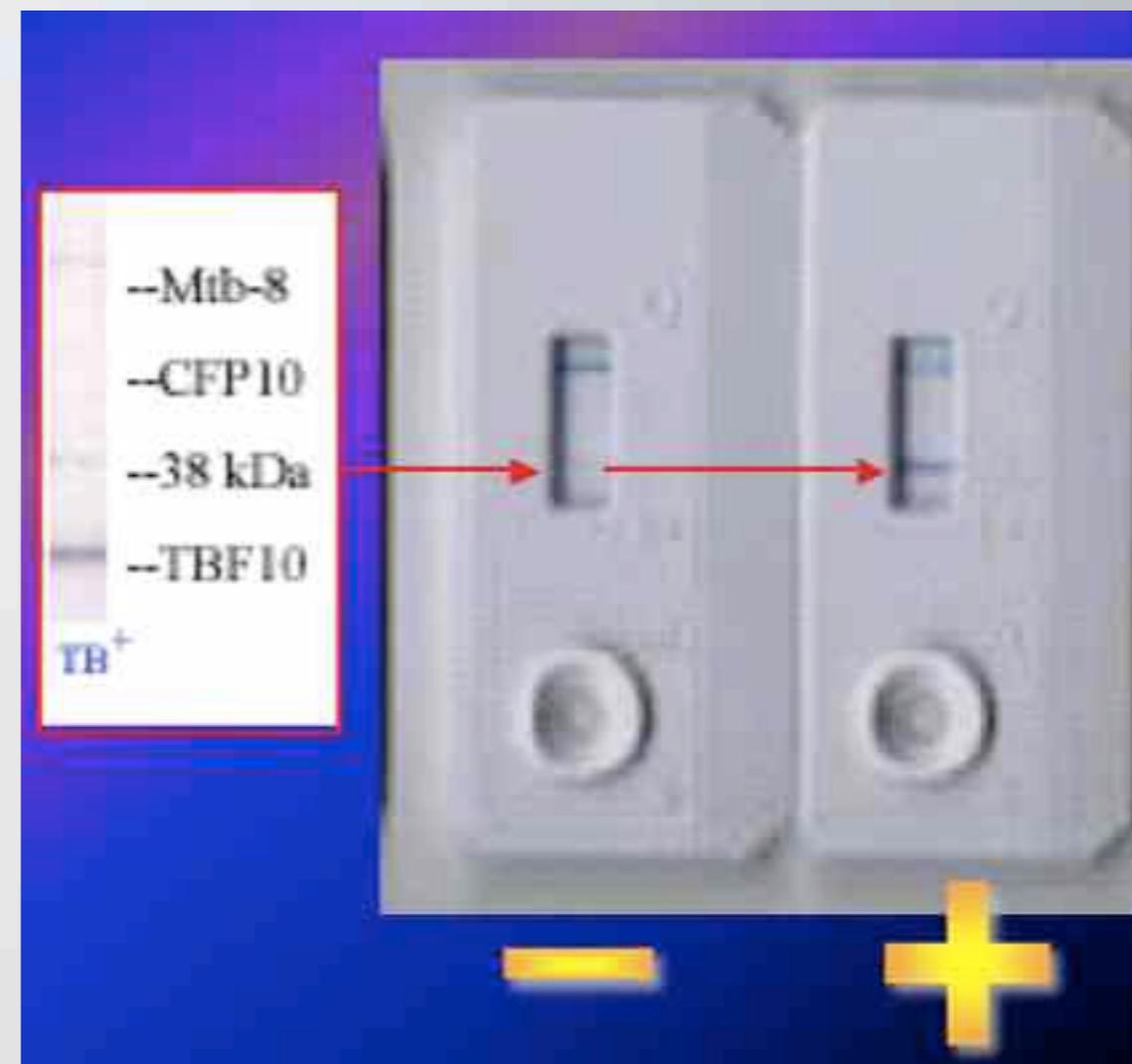
- Challenge de plusieurs antigènes dans le même test
- Teste les Ig G
- Résultats surtout qualitatifs
- Antigenicité dépend de
  - Mycobactérie (esp, so.)
  - Hôte
  - Facteurs individuels
  - Temps depuis l'infection
  - voie d'entrée, organes atteints,...
- Bonne Se et Sp (elephants, ...)



## Serologie

# Rapid Test®

- Une Sélection d'antigènes issu des études MAPIA sont imprimées sur une bande test.
- 0,03 ml de sang total ou de sérum
- Lecture en 20 min
- Collaboration U.S.A :
  - Elephant StatPak
  - Primate StatPak
- **Phase I**  
Etude sur population suspectes d'espèces non cibles + comparaison / autres tests (IC)
- En développement :
  - Camélidés
  - Cervidés
  - Bovins





## Rapid Test®

- Outil de terrain
- Utilisation rétrospective
- Capacité multi espèces (ERT= tapirs, otaries,...)
- Sensibilité >> test cellulaires sur certaines études primates
- Teste les Ig G + Ig M
- Réactivation par IDR
- Activité humorale en phase latente ?
- Spécificité des antigènes ?
- Outil non validable
- informations moins complètes que le MAPIA
- Coût

**Phase II : Etude France / Europe**



# Conclusion

- Développement de nouveaux outils
  - Issus des progrès en Médecine Humaine
  - Directement issus de La recherche vétérinaire
- Applications :
  - épidémiologiques : vecteurs sauvages
  - Conservation : espèces en captivité
- Nombreuses études en cours
  - Estimation de La prévalence dans certaines populations
  - caractérisation des souches circulantes

merci  
de  
votre  
Attention

