

ÉVOLUTION DES OUTILS DIAGNOSTIQUES DE LA TUBERCULOSE DES ESPÈCES ANIMALES SAUVAGES

NEW DIAGNOSTIC TOOLS FOR WILDLIFE TUBERCULOSIS

Par Alexis LÉCU⁽¹⁾ et Laurence RIQUELME⁽²⁾
(communication présentée le 07 février 2008)

RÉSUMÉ

Devant la recrudescence des cas de tuberculose humaine, la maîtrise des risques de contamination passe nécessairement par le contrôle du portage animal. Les différentes espèces de mycobactéries responsables de la tuberculose sont capables d'infecter les espèces sauvages, chez lesquelles la pathogénie, la réceptivité et les réponses immunitaires sont très variées. Les moyens du diagnostic classique sont en fait d'application limitée chez les espèces sauvages, en particulier lors de faible prévalence. À l'inverse, l'exploration de l'immunité cellulaire par dosage *in vitro* de l'interféron gamma, présente de nombreux avantages (bonne sensibilité), dès lors que les limites de ce test sont bien connues, ce qui n'est pas encore le cas. De même, d'autres approches, basées sur l'exploration de la voie humorale (sérodiagnostic), semblent montrer un large potentiel pour la détection d'anticorps dirigés contre certains antigènes mycobactériens immunogènes chez de nombreux taxons différents. Ces nouvelles méthodes sont encore en cours d'évaluation sur le terrain, malgré la difficulté d'une validation rigoureuse.

Mots-clés : tuberculose, mycobactéries, espèces sauvages, interféron gamma, sérologie, zoo.

SUMMARY

As the prevalence of tuberculosis is increasing in the human population, controlling the risk of contamination requires a control of animal carriers. Most tuberculosis mycobacteria are able to infect wild species, in whom the pathogenesis, receptivity and immune responses vary widely. Standard screening tools have limited application in wildlife, especially when prevalence is low. Inversely, investigations of cell-mediated immunity through in vitro assay of gamma interferon have numerous advantages (good sensitivity), as long as technical limits are known and can be improved. Furthermore, new tools based on the investigation of humoral immunity seem very promising for the detection of antibody directed against certain immunogenic mycobacterial antigens in a wide range of species. All these methods are currently evaluated in field studies, despite difficulties to ensure rigorous validation.

Key words : tuberculosis, mycobacteria, wildlife, gamma interferon, serology, zoo.

(1) Parc Zoologique de Paris, M.N.H.N. 53 avenue de St Maurice, 75012 PARIS.

(2) O.N.C.F.S., 4-6 rue Golard, 76720 Auffay.

INTRODUCTION

En 2007, plus d'un humain sur trois a déjà été en contact avec le bacille tuberculeux. Avec plus de 2 millions de morts par an depuis 2005, la tuberculose est redevenue l'une des trois maladies infectieuses les plus mortelles sur la planète avec le paludisme et le sida. En particulier, la proportion grandissante de souches multirésistantes aux principaux agents anti-tuberculeux fait craindre l'imminence d'une impasse thérapeutique.

La tuberculose est causée par groupe d'espèces de mycobactéries appartenant au complexe « *tuberculosis* » (**tableau 1**). Parmi celles-ci, plusieurs espèces sont retrouvées chez les animaux domestiques aussi bien que sauvages, tant sous forme d'infection latente qu'en maladie active. La lutte contre la tuberculose passe nécessairement par la prise en compte de ce volet zootique.

Le plus souvent, la transmission inter-humaine de *Mycobacterium tuberculosis* survient par voie aérienne, ce qui nécessite la présence d'une forme pulmonaire dite « ouverte » ou active chez le contaminateur. Cet aspect épidémiologique permet de définir des procédures claires pour réduire la contamination chez l'homme. À l'inverse, les risques de transmission de tuberculoses animales sont plus complexes à cerner : les voies sont multiples (digestive, aérienne, cutanée,...) et la pathogénie varie suivant l'espèce animale hôte et l'espèce de mycobactérie. Les moyens de prévention de cette maladie sont donc plus difficiles à mettre en place et l'identification des animaux infectés devient alors cruciale.

Mycobactéries du complexe <i>tuberculosis</i>	Hôtes majeurs historiques	Autres Hôtes connus
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Homme	Prosimiens Primates de l'ancien monde
<i>Mycobacterium bovis</i>	Ruminants domestiques	Ongulés sauvages Carnivores,
<i>Mycobacterium africanum</i>	Homme	
<i>Mycobacterium microti</i>	Campagnol	Camélidés
<i>Mycobacterium pinnipedii</i>	Pinnipèdes	Tapirs
<i>Mycobacterium canettii</i>	Homme	
<i>Mycobacterium caprae</i>	Chèvre	Mouton, Porc
« <i>Dassie bacillus</i> »	Daman	

Tableau 1 : Liste des espèces de mycobactéries du complexe *tuberculosis* et leurs principaux hôtes connus. (D'après Thoen et al. 2006).

Les méthodes de dépistage (diagnostic), en particulier *ante mortem*, souffrent parfois d'une sensibilité faible (Cousins & Florisson, 2005), mais qui reste suffisante lors de forte prévalence (augmentation des valeurs prédictives). Notamment, après la seconde guerre mondiale, un effort déterminant a été effectué dans la lutte contre *Mycobacterium bovis* et sa persistance au sein des troupeaux de ruminants domestiques, en Europe et aux États-Unis, ramenant la prévalence de plus de 200/100 000 à moins de 10/100 000.

L'application des mêmes méthodes aux espèces sauvages est beaucoup plus délicate. Les outils diagnostiques sont parfois spécifiques d'espèce et/ou ne peuvent techniquement s'appliquer aux animaux sauvages et à leur gestion.

LA TUBERCULOSE DES ANIMAUX SAUVAGES

La réceptivité des espèces animales pour une mycobactérie donnée dépend à la fois de l'espèce de la mycobactérie, de l'espèce de l'hôte et enfin de l'individu (âge, état immunitaire...). La probabilité qu'un animal développe une infection latente plutôt qu'une tuberculose active dépend aussi d'un très grand nombre de facteurs intrinsèques (récepteurs à l'interféron gamma, génotypes de la vitamine D,...) encore peu connus chez les espèces animales. On reconnaît cependant des différences notables au sein des mêmes ordres de Mammifères : par exemple, les primates de l'ancien monde (babouins, macaques,...) sont beaucoup plus sensibles que les primates sud-américains : un seul bacille de *M. tuberculosis* inhalé est capable de déclencher une tuberculose active chez un macaque. La quasi-totalité des cas de tuberculose, recensés chez les Proboscidiens, sont diagnostiqués chez les éléphants d'Asie (*Elephas maximus*), aussi bien en captivité que dans le milieu sauvage, alors que l'espèce africaine (*Loxodonta africana*) est nettement moins affectée, bien que vivant aussi dans une région d'enzootie.

Le portage de mycobactéries par les espèces sauvages pose deux types de problèmes : dans le milieu naturel, elles sont sources de contamination du milieu (germe tellurique) et des troupeaux domestiques (Artois *et al.* 2004), et agissent parfois comme réservoirs. En captivité, la proximité avec l'homme engendre un risque de transmission plus direct pour celui-ci. Que ce soit en milieu naturel ou en captivité, l'animal ou les animaux infectés peuvent menacer des populations animales entières, notamment lors de fortes prévalences (ex : prévalence supérieure à 12 % chez les éléphants d'Asie aux États-Unis).

LE DIAGNOSTIC CLASSIQUE ET SES LIMITES

L'examen clinique de l'animal sauvage est souvent bien plus limité que celui de l'animal domestique, pour des raisons évidentes de contention. Certains examens complémentaires utilisés lors de recherche d'une tuberculose sont peu réalisables soit par manque de références (radiographie) soit par carence technique (tomographie). Parmi ces examens, l'endoscopie est toutefois une méthode d'exploration très utile lorsqu'elle

permet à la fois de visualiser et de prélever la lésion. Cependant, la localisation et le volume des granulomes tuberculeux restent souvent difficiles d'accès, quelle que soit la méthode, en particulier lors d'infection latente.

La recherche directe de la mycobactérie ou de son matériel nucléaire reste une étape diagnostique incontournable.

- De nombreux prélèvements *ante mortem* s'avèrent paucibacillaires chez les espèces sauvages, en particulier lors de cas chroniques ou latents, limitant l'intérêt de la détection directe de la mycobactérie (examen direct par coloration spécifique soit de Zhiel-Neelsen, soit par l'auramine).
- La détection de matériel nucléaire peut permettre une diagnose précoce de l'espèce, voire de la souche. Les techniques d'amplification génique (PCR), appliquées à certaines régions du génome mycobactérien, sont utilisées avec succès, mais leur sensibilité décroît fortement en fonction du matériel nucléaire effectivement disponible dans l'échantillon, ainsi que de la longueur de l'amplicon recherché. De plus, certains échantillons biologiques (lavage de trompe chez l'éléphant, jetages prélevés au sol) sont parfois fortement contaminés par d'autres bactéries, compliquant la recherche et pouvant conduire à de faux positifs.
- De récentes techniques de génotypage moléculaire sont utilisées en particulier pour retracer les chaînes de contamination. Ces techniques reposent sur la détection de séquences connues répétitives du génome mycobactérien comme les locus DR (Direct Repeat) ou MIRU (Multiple Intersped Repetitive Units). Des analyses précises, que l'on peut numériser, du nombre de copies de ces séquences et/ou de leur variation aident à établir le profil d'une souche et à vérifier sa transmission éventuelle. Ces techniques sont actuellement utilisées, par exemple, pour évaluer l'adaptation de *M. pinnipedii* à certains mammifères terrestres.
- La culture de la mycobactérie reste le seul moyen de diagnostic de certitude. Elle permet aussi d'évaluer la résistance aux anti-tuberculeux. Même si son application thérapeutique est rarement utilisée (coût, pharmacocinétique inconnue des anti-tuberculeux chez les espèces sauvages), son intérêt reste important pour la santé publique (surveillance de la prévalence des souches résistantes, voire multi-résistantes).

Quelles que soient les méthodes de recherche directe employées, il est intéressant de noter que leur seuil minimal de détection, toutes techniques confondues (supérieur à 10 bacilles/ml), reste souvent supérieur à la charge minimale contagieuse (primates).

Classiquement, l'examen clinique de choix pour objectiver l'infection tuberculeuse est l'exploration de l'hypersensibilité retardée (type IV) par l'injection intradermique de tuberculine. Ce diagnostic allergique implique malheureusement une lecture quotidienne durant trois à quatre jours. Il convient d'indiquer, par ailleurs que les méthodes, les sites d'injection, les volumes de tuberculine, qualité et quantité d'antigène menant à réaction sont extrêmement variables selon les espèces animales.

La réponse de l'Intra-Dermo Réaction (IDR) repose entièrement sur la disponibilité locale de cellules inflammatoires pour le recrutement. La grande variabilité histologique et physiologique du tégument des espèces sauvages empêche parfois sa réalisation et/ou son expression: tégument trop épais (« pachydermes »), effet de la température sur le peuplement cellulaire périphérique, notamment chez les mammifères marins, etc... Cette variabilité induit de nombreux faux négatifs. D'autre part, certaines espèces sauvages sont connues pour présenter de nombreux faux positifs à l'IDR, soit par manque de spécificité (portage de mycobactéries atypiques), soit par une physiologie immunitaire particulière (orangs-outangs).

Si le diagnostic allergique est la méthode la plus simple et la moins onéreuse à mettre en œuvre, sa grande variabilité (faux positifs, faux négatifs) oblige à recourir à des méthodes nouvelles dont les caractéristiques chez les animaux sauvages sont en cours d'évaluation.

NOUVELLES APPROCHES DIAGNOSTIQUES

La production d'interféron gamma

Principe

La composante majeure de la réponse immunitaire, à l'égard des agents du complexe *tuberculosis*, est de type cellulaire. En phase de multiplication bacillaire, l'induction de la réponse protectrice se traduit par la production de cytokines de type Th1, notamment d'interféron gamma (INF γ) qui induit l'activation des macrophages infectés.

Réalisation

Le test de l'interféron gamma se réalise à partir d'un prélèvement sanguin, soit directement sur sang total soit sur un culot de lymphocytes. Il permet d'évaluer *in vitro*, la réactivité des lymphocytes thymodépendants circulants, mis en culture avec des dérivés protéiques purifiés de bacilles tuberculeux (*M. bovis* ou *M. tuberculosis* et *M. avium* pour une stimulation comparée). En cas d'infection, les lymphocytes préalablement sensibilisés produisent, en réponse à cette stimulation, de l'INF γ qui est dosé par une technique ELISA. L'INF γ étant spécifique d'espèce, plusieurs trousse de dosage ELISA ont été développées, puis commercialisées. On compte à ce jour, une trousse pour les Bovidés (BOVIGAM®), une pour les primates non humains (PRIMAGAM®), deux pour l'homme (QUANTIFERON®/QUANTIFERON Gold®) et dernièrement, une pour les Cervidés (CERVIGAM®).

Avantages et limites

Le test de l'interféron gamma est un test rapide dont les résultats sont obtenus en moins de 48 heures, facile à réaliser sur le terrain (simple prise de sang sur anticoagulant) et ne nécessitant qu'une seule capture du sujet, ce qui est important pour son application à la faune sauvage. Les résultats exprimés en den-

sité optique sont quantitatifs et contrairement à l'IDR, ne dépendent pas de l'observateur.

L'avantage principal de cette évaluation cellulaire *in vitro* par rapport à l'IDR réside en l'absence d'injection de protéines étrangères à l'animal, ce qui n'interfère pas avec son statut immunitaire; le test peut ainsi être répété sans restriction car il n'induit pas de sensibilisation ou de désensibilisation de l'organisme. De nombreuses études chez des populations d'espèces sauvages soulignent une sensibilité supérieure du test à celle de l'IDR (Vervenne *et al.* 2004; Cousins & Florisson, 2005).

Enfin, la réalisation d'une stimulation comparée par deux tuberculines, PPDavium et PPDbovis, en améliore notablement la spécificité par rapport à une IDR simple.

Bien que le test de l'interféron gamma offre de nombreux avantages, des freins à son utilisation en routine persistent à ce jour. Très peu de laboratoires d'analyses vétérinaires le réalisent actuellement. Ce test a des impératifs biologiques, notamment le délai d'acheminement des prélèvements au laboratoire ne doit pas excéder 10 heures, afin de garder les lymphocytes viables; la quantité de sang à prélever pour disposer d'assez de lymphocytes est de l'ordre de 10 ml, ce qui peut poser un problème pour les mammifères de moins d'1,5 kg.

Son utilisation doit prendre en compte le statut immunitaire du patient. Elle n'est pas conseillée chez les jeunes individus chez lesquels de nombreux faux positifs sont rapportés, ni chez les individus immunodéficients ou présentant un état général altéré.

Applications et axes de recherche actuels

À ce jour, les tests de l'interféron gamma distribué dans le domaine vétérinaire n'intègrent pas de contrôle positif, à savoir l'utilisation, pourtant indispensable à l'interprétation des résultats, d'un super-antigène non spécifique évaluant la capacité des lymphocytes T à produire de l'INF γ (Robbe-Austerman *et al.* 2006). Une étude en cours, menée en association par le Parc Zoologique de Paris (PZP) et le Laboratoire National de Contrôle des Reproducteurs (LNCR, rattaché à l'ACSEDIATE^(*)), vise à évaluer l'emploi chez différentes espèces sauvages de deux glycoprotéines connues pour être de puissants immunogènes: la concanavaline A (conA) et la phytohémagglutinine A (PHT). Les premiers résultats montrent des réponses variables en fonction des espèces et des individus (figures 1 et 2.).

L'utilisation du test de l'INF γ chez la faune sauvage, encore restreinte par le manque d'études et de validation, se limite à quelques espèces. Des études (Wood & Jones, 2001) ont

montré une application possible de la trousse BOVIGAM[®] pour le diagnostic de la tuberculose chez plusieurs espèces de bovidés (buffle, bison, grand koudou, oryx...). Les autorités de veille sanitaire du Parc national Kruger (Afrique du Sud), l'intègre au programme de surveillance dans les zones de faible prévalence, chez le buffle africain alors que l'IDR est pratiquée dans les zones de forte prévalence (Grobler *et al.*, 2002).

L'étude menée au PZP suggère que la trousse BOVIGAM[®] peut être utilisée chez d'autres taxons que des bovidés (par exemple chez la girafe,...), alors que la trousse PRIMAGAM[®] n'est pas applicable à un spectre d'espèces aussi large que celui annoncé par le fabricant, entre autres aux lémuriens. Avec l'absence d'un contrôle positif adéquat, ce manque de spécificité du test ELISA est une préoccupation majeure à avoir lors de l'interprétation des résultats par ce type de test.

La mise au point d'un test ELISA spécifique utilisant des anticorps monoclonaux anti-INF γ de l'espèce homologue permettrait de lever cette hypothèse. Cette voie expérimentale est explorée chez certains grands herbivores comme l'éléphant d'Asie (V. Rutten, soumis pour publication) ou le rhinocéros blanc (*Ceratotherium simum*) (Morar *et al.* 2005).

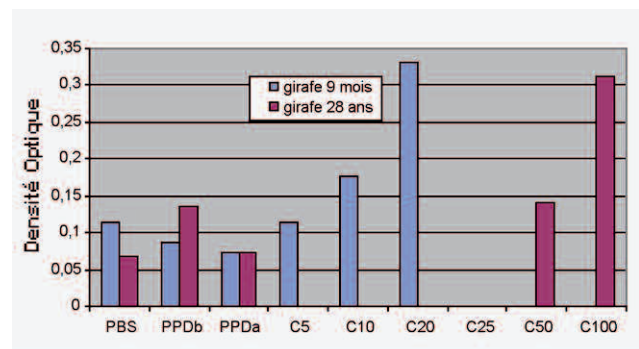


Figure 1 : Réponses en densités optiques (révélation de la production en INF γ obtenues chez deux girafes (*Girafa camelopardalis peralta*) lors de la stimulation des lymphocytes T par différentes concentrations de concanavaline A (C), dérivé de protéine purifiée de *M. bovis* (PPDb), dérivé de protéine purifiée de *M. avium* (PPDa). Des coefficients de variation (= pourcentage d'augmentation par rapport au PBS, témoin négatif individuel) sont précisés en haut des histogrammes. Cette lecture est réalisée grâce à l'utilisation d'une trousse Bovigam[®] fournissant un anticorps apparemment capable de révéler la production d'INF γ par la girafe, espèce n'appartenant pas à la famille des bovidés.

Sérodiagnostic

Principe

La réponse immunitaire humorale repose sur l'activation de la voie Th2, souvent plus tardive et inhibée par l'activation de la

(*) ACSEDIATE: Association pour le Contrôle Sanitaire, l'Étude et le Développement de l'Insémination Artificielle et du Transfert Embryonnaire

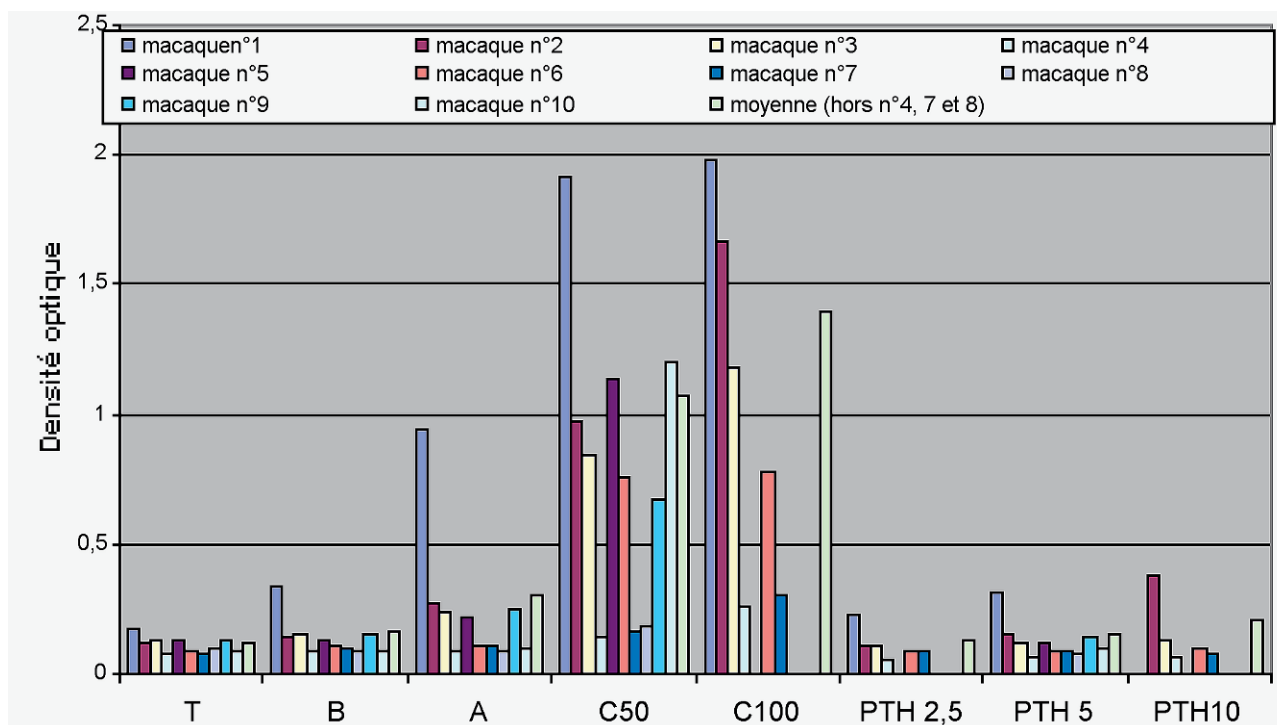


Figure 2 : Réponses en densité optiques (révélation de la production en $INF\gamma$ obtenues chez un groupe de macaques du Japon (*Macaca fuscata*) après stimulation des lymphocytes par différentes concentrations de Concanavaline A (ConA) et de Phytohémagglutinine (PTH). (T : témoin négatif, B : dérivé de protéine purifiée de *M. bovis*, A : dérivé de protéine purifiée de *M. avium*. Les coefficients de variation moyens, obtenus pour B, A, C50, C100, PHT2,5, PTH5 et PTH10, sont indiqués en rouge. La concanavaline paraît ici être un meilleur candidat dans le choix d'un témoin positif que la phytohémagglutinine. On remarquera aussi la réaction significative de l'individu n° 1 à la PPD aviaire. L'infection latente des primates par *M. avium* d'origine environnementale n'est pas rare.

voie cellulaire Th1 (Chapel *et al.* 2006). Certaines observations en pathogénie humaine suggèrent que l'activation humorale coïncide avec le passage à une forme active, dite « ouverte », de tuberculose. Ce déséquilibre Th1/Th2 pourrait en effet signifier l'incapacité du système immunitaire à circonscrire l'infection. De récentes études chez l'éléphant (Lyashchenko *et al.* 2006), les primates (Lyashchenko *et al.* 2007) ou les pinnipèdes (Jurcynski *et al.* 2007) prouvent que l'apparition ou l'augmentation du titre de certains anticorps va de pair avec une infection active de l'animal.

Multi Antigen Print Immuno Assay (MAPIA) et tests rapides associés

Des techniques ELISA ont été ponctuellement développées pour rechercher des anticorps dirigés contre des antigènes mycobactériens surfaciques chez l'homme (Abebe *et al.* 2007), comme chez l'animal sauvage (Haagsma & Eger, 1990). La sensibilité et la spécificité de ces tests sérologiques varient grandement selon l'anticorps recherché, menant souvent à des performances insuffisantes (Frieden *et al.* 2003)

La technologie MAPIA permet d'imprimer sur un support linéaire (nitrocellulose) une série importante d'antigènes mycobactériens purifiés. Ces bandes (figure 3) imprimées sont incubées avec le sérum du sujet durant une heure (Lyanshchenko *et al.*, 2000). Deux traitements immunoenzymatiques sont

ensuite appliqués afin de révéler en une seule fois la présence éventuelle de différents anticorps dans le sérum. Chez des sujets infectés (expérimentalement ou non), l'obtention de cette « carte sérologique » permet de déceler les antigènes les plus immunostimulants, qui dépendent à la fois de l'espèce hôte et de la mycobactérie qui l'infecte. On note que l'intensité de réaction des raies et leur nombre augmentent lors de certaines phases de l'infection tuberculeuse (dissémination,...), conférant au test MAPIA un intérêt dans le dépistage de cette maladie.

Après examen de nombreux résultats de MAPIA de certaines espèces animales, les antigènes les plus typiques ont été choisis et réunis pour servir de réactifs à un test de diffusion latérale rapide, comme il en existe pour certains diagnostics sérologiques chez les espèces domestiques (figure 3). Un test rapide de ce type est désormais disponible pour l'homme, les primates non humains, ainsi que pour les Proboscidiens. La sensibilité et la spécificité de ces tests chez les animaux étudiés devraient être supérieures à 95 % (Lyaschenko *et al.* 2006), ce qui constitue une amélioration notable par rapport aux tests existants. Leur rapidité d'utilisation en font des outils de terrain privilégiés (pas de conservation au froid, lecture du résultat en vingt minutes, volume de sang ou sérum requis inférieur à 1 ml). Ils permettront, de plus, la conduite d'études rétrospectives de sérums congelés conservés en cryobanque.

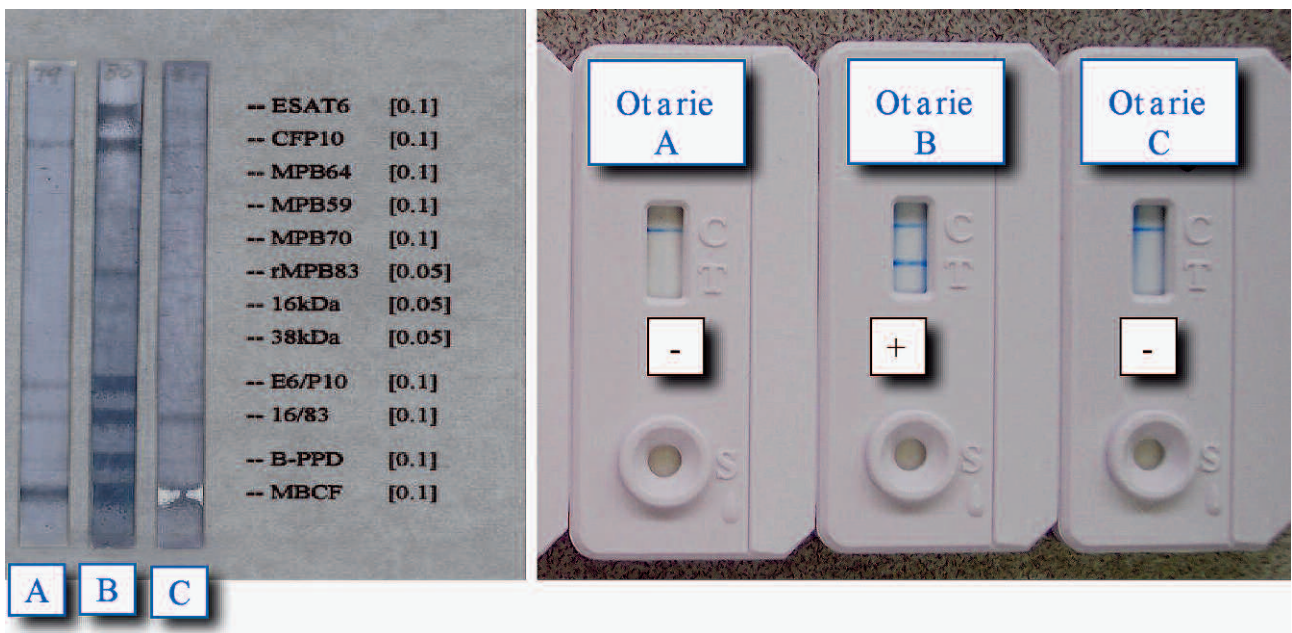


Figure 3 : À gauche, résultats d'un test MAPIA réalisé sur le sérum de trois otaries de Patagonie (*Otaria byronia*). Chaque bande représente la colonne de migration d'un échantillon et chaque ligne, un antigène de surface mycobactérien. On remarque l'absence de marquage de l'antigène MPB70 chez l'animal positif B qui s'avérera infecté par *M. pinnipedii*, espèce du complexe « tuberculosis » qui ne présente pas cet antigène sur sa surface membranaire. À droite, résultat d'un test Rapid Test® chez les trois mêmes individus. À noter la présence (première bande horizontale C) d'un autocontrôle sur le test.

Des études en cours indiquent que le test « éléphant » est utilisable chez d'autres espèces comme les tapiridés (tapirs malais, *Tapirus indicus*) ou les pinnipèdes (Otarie à crinière d'Amérique du Sud, *Otaria byronia*). À mesure des recherches, il semble en effet que certains antigènes soient souvent impliqués dans la réponse humorale au complexe *tuberculosis* : ESAT-6, CFP10, MPB83, ... (Lyaschchenko *et al.* 2006, 2007), chez de nombreuses espèces hôtes. Cela ouvre de nombreuses perspectives diagnostiques multi-espèces, qui sont en cours d'études.

Il convient cependant de noter que la plupart des études d'évaluation des tests sérologiques sont menées sur de petits effectifs chez lesquels les animaux atteints présentent souvent des signes cliniques terminaux, confirmés par l'examen nécropsique. Il s'agit donc d'individus ou d'espèces chez lesquels l'infection tuberculeuse est active. L'objectivation du portage latent reste le réel défi technologique car la sensibilité réelle des méthodes sérologiques reste encore très peu connue.

CONCLUSION

L'exploration des traces immunitaires de l'infection tuberculeuse est en plein développement chez les espèces sauvages. Les limites du diagnostic clinique et de la détection directe obligent à mettre au point de nouveaux instruments de diagnostic qui soient utilisables pour un large éventail de taxons. De ce fait, l'application de ces recherches à la faune sauvage constitue un moteur pour l'amélioration des connaissances générales sur la tuberculose animale. L'impossibilité évidente de passer, pour de nombreuses espèces sauvages, par une étape d'infection expérimentale privera longtemps le vétérinaire de tests validés pour ces espèces. C'est pourquoi un programme d'étude sur l'utilisation de nouveaux tests de diagnostic de la tuberculose animale ciblant la réponse immunitaire cellulaire ou humorale est en cours, afin d'améliorer la qualité du dépistage et d'en définir avec précision les conditions d'utilisation.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le laboratoire national de contrôle des reproducteurs (LNCR, ASCEDIATE) – particulièrement Nathalie Pozzi et Paul –, ainsi que Chembio Diagnostics – le Dr Konstantin Lyaschenko et Les Stutzman – pour leur collaboration, leurs compétences et leur disponibilité.

BIBLIOGRAPHIE

- Abebe, F., Holm-Hansen, C., Wiker, H.G., Bjune, G. 2007. Progress of Serodiagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Scandinavian Journal of Immunology 66: 176-191
- Artois, M., Loukiadis, E., Garin-Bastuji, B., Thorel, M.F., Hars, J. 2004. Infection des mammifères sauvages par *Mycobacterium bovis*, risques de transmission aux bovines domestiques. Bulletin Épidémiologique de l'AFSSA 13: 1-3
- Chapel, H., Haeney, M., Misbah, S., Snowden, N. 2006. *Essentials of Clinical Immunology*, 5th Edition. Blackwell Publishing, Oxford. 368pp.
- Clifton-Hadley, R.S., Suater-Louis, C.M., Lugton, I.W., Jackson, R., Durr, P.A., Wilesmith, J.W. 2001. *Mycobacterium bovis* infections. In Infectious diseases of wild mammals (ed E.S. Williams & I.K. Barker). pp 340-361. Iowa State University Press.
- Cousins, N.V. & Florisson N. 2005. A review of tests available for use diagnosis of tuberculosis in non-bovine species. Rev sci tech Off int Epiz. 24 (3): 1039-1059.
- Cranfield, M.R., Thoen, C.O., Kemspe, S. 1990. An outbreak of *Mycobacterium bovis* infection in hoofstock at the Baltimore Zoo. In *Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Zoo Veterinarians*, Denver, Colorado, October 21-26, 1990, pp. 128-137.
- Doherty, T.M. & Rook, G. 2006. Progress and hindrances in tuberculosis vaccine development. Lancet 367: 947-949.
- Flynn, J.-L., Capuano, S.V., Croixa, D., Pawara, S., Myers, A., Zinovika, A., Klein, E. 2003. Non-human primates: a model for tuberculosis research. *Proceedings from the 4th World Congress on Tuberculosis*. Tuberculosis 83(1-3): 116-118.
- Frieden, T.R., Sterling, T.R., Munsiff, S.S., Watt, C.J., Dye, C. 2003. Tuberculosis. Lancet 362: 887-899.
- Grobler D.G., Michel A.L., De Klerk L.M., Bengis R.G. 2002. The gamma-interferon test: its usefulness in a bovine tuberculosis survey in African buffaloes (*Syncerus caffer*) in the Kruger National Park. Onderstepoort J Vet Res. 69(3):221-227.
- Haagsma, J. & Eger, A. 1990. ELISA for diagnosis of Tuberculosis and Chemotherapy in zoo and wildlife animals. In *Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Zoo Veterinarians*, Denver, Colorado, October 21-26 1990, pp. 107-110.
- Jurcynski, K., Lyashchenko, K., Gomis, D., Lécu, A., Torstchanoff, S., Klarenbeek, A., Moser, I. 2007. *Mycobacterium pinnipedii* infection is South American sea lions (*Otaria byronia*) in Europe. *Proceeding 43rd International Symposium über die Erkrankungen des Zoo um Wildtiere*, Edinburgh 2007 : 180.
- Lin, P.L., Pawar, S., Myers, A., Pegu, A., Fuhrman, C., Reinhart, T.A., Capuano, S.V., Klein, E., Flynn, J.-L. 2006. Early Events in *Mycobacterium tuberculosis* Infection in *Cynomolgus* Macaques. *Infection and Immunity* 74 (7): 3790 – 3803.
- Lyashchenko, K.P., Greenwald, R., Esfandiari, J., Olsen, J.H., Ball, R., Dumonceaux, G., Dunker, F., Buckley, C., Richard, M., Murray, S. & al. 2006. Tuberculosis in Elephants: Antibody Responses to Defined Antigens of *Mycobacterium tuberculosis*, potential for early diagnosis, and monitoring of treatment. *Clin Vaccine Immunol* 13: 722-732.
- Lyashchenko, K.P., Greenwald, R., Esfandiari, J., Greenwald, D., Nacy, C.A., Gibson, S., Didier, P.J., Washington, M., Szczerba, P., Motzel, S. & al. 2007. PrimaTB STAT-PAK Assay, a Novel, Rapid Lateral-Flow Test for Tuberculosis in Nonhuman Primates. *Clin. Vaccine Immunol* 14(9): 1158-1164.
- Lyashchenko, K.P., Singh, M., Colangeli, R., Gennaro, M.L. 2000. A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases. *Journal of Immunological Methods*. 242(1-2): 91-100.
- Mikota, S.K., Larsen, R.S., Montali, R.J. 2000. Tuberculosis in Elephants in North America. *Zoo Biology* 19: 393-403.
- Montali, R.J., Mikota, S.K., Cheng, L.I. 2001. *Mycobacterium tuberculosis* in zoo and wildlife species. *Rev sci tech Off int Epiz*. 20(1): 291-303.
- Morar, D., Tijhaarb, E., Negrea, A., Hendriks, J., van Haarlem, D., Godfroid, J., Michel, A.L., Rutten V.P.M.G. 2007. Cloning, sequencing and expression of white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) interferon-gamma (IFN- γ) and the production of rhinoceros IFN- γ specific antibodies. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 115 (1-2): 146-154.
- Mostowy, S., Inwald, J., Gordon, S., Martin, C., Warren, R., Kremer, K., Cousins, D., Behr, M.A. 2005. Revisiting the Evolution of *Mycobacterium bovis*. *J Bacteriol*. 187(18): 6386–6395.
- Riquelme, L. 2008. La tuberculose chez les espèces sauvages captives: possibilité d'utilisation du test interferon gamma pour son diagnostic *ante mortem*. Thèse Med. Vet. Alfort, n° 35, 144p.
- Robbe-Austerman, S., Krull, A.C., Stabel, J.-R. 2006. Time delay, temperature effects and assessment of positive controls on whole blood for the gamma interferon ELISA to detect paratuberculosis. *J.Vet. Med. B* 53: 213-217.
- Schluger, N.W. 2005. The pathogenesis of tuberculosis: the first one hundred (and twenty-three) years. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 32(4): 251-256.
- Thoen, C.O., Stelle, J.H., Gilsdorf, M.J. 2006. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. 2nd Edition. Blackwell Publishing. 329pp.
- Vervenne, R.A.W., Jones, S.L., van Soelingen, D., van der Laan, T., Andersen, P., Heidt, P.J., Thomas, A.W., Langermans, J.A.M. 2004. TB diagnosis in non-human primates: comparison of two interferon-g assays and the skin test for identification of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 100: 61 – 71.
- Wood, P. R. & Jones, S. L. 2001. Bovigam®: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 81(1-2): 147-155.

