

**Diagnostic et Épidémiologie Moléculaire de la Tuberculose
Bovine au Tchad:
Cas des Bovins Destinés à l'Abattage**

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Ngandolo Bongo Naré

aus

Sarh, Tschad

Basel, 2012

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag von Prof. Dr. Marcel Tanner, Prof. Dr. Joachim Frey und Prof. Dr. Jakob Zinsstag.

Basel, den . 14. Dezember 2010

Prof. Dr. Martin Spiess
Dekan

Table des Matières

Liste des cartes et figures	iii
Liste des Tableaux	iv
Liste des Abréviations.....	v
In Memorium.....	vii
Dédicace	viii
Remerciements	ix
Resumé	xi
Summary	xiii
Zusammenfassung.....	xv
1. Introduction Générale.....	1
2. Synthèse Bibliographique.....	3
2.1. Importance de la Tuberculose Bovine.....	3
2.1.1. Situation de la tuberculose bovine dans le monde	3
2.1.2. Situation de la tuberculose bovine en Afrique	4
2.1.3. Situation de la tuberculose bovine au Tchad.....	6
2.2. Connaissance Générale sur la Tuberculose Bovine	8
2.2.1. Définition	8
2.2.2 Taxonomie.....	8
2.2.3. Caractères généraux de <i>M. bovis</i>	10
2.2.4. Transmission	12
2.2.4.1. Transmission directe.....	12
2.2.4.2. Transmission indirecte.....	13
2.2.4.3. Risque de transmission de la tuberculose bovine à <i>M. bovis</i> , de la faune sauvage (réservoir) à la faune domestique et à l'homme	14
2.2.4.4. Les modèles épidémiologiques	15
2.2.5. Pathogénie de la tuberculose bovine	16
2.2.5.1. Conditions de l'infection	16
2.2.5.1.1. Conditions qualitatives	16
2.2.5.1.2. Conditions quantitatives	17
2.2.5.2. Les étapes de l'infection	18
2.2.5.2.1. Étape primaire ou primo-infection	18
2.2.5.2.2. Tuberculose secondaire.....	18
2.2.5.3. Réaction de l'organisme infecté.....	19
2.2.5.3.1. Le développement d'une immunité exclusivement cellulaire.....	19
2.2.5.3.2. Le développement de l'hypersensibilité retardée ou hypersensibilité de type IV.....	20
2.2.5.3.3. Apparition d'anticorps anti <i>M. bovis</i>	21
2.2.6. Les symptômes de la tuberculose bovine	22
2.2.7. Les lésions.....	22
2.2.8. Diagnostic de la tuberculose bovine	23
2.2.8.1. Diagnostic ante mortem.....	23
2.2.8.1.1. Les tests <i>In Vivo</i>	23
2.2.8.1.2. Les tests <i>In Vitro</i>	25
2.2.8.2. Diagnostic post mortem.....	27
2.2.8.2.1. Inspection d'abattoir	27
2.2.8.2.2. La culture des mycobactéries	29
2.2.8.2.3. Les Tests Biochimiques	30
2.2.8.2.4. Les techniques de la biologie moléculaire	31
2.2.9. Le <i>M. bovis</i> et la résistance aux antituberculeux.....	34
2.2.10. Transport des isolats issus des cultures et les exigences de biosécurité	34
2.2.11. Gestion de la tuberculose bovine dans les élevages.....	35

3. Santé Animale et Tuberculose Bovine au Tchad.....	37
3.1. Position Géographique du Tchad.....	37
3.2. Élevage Bovin au Tchad.....	39
3.3. La Direction des Services Vétérinaires	39
3.4. Le Réseau d'Épidémiologie des Maladies Animales au Tchad	40
4. Les Objectifs de l'Étude.....	43
4.1. Objectif Principal	43
4.2. Les Objectifs Spécifiques	43
5. Le Cadre Institutionnel, le Lieux de l'Étude, Les Matériels et Méthodes	45
5.1. Cadre Institutionnel.....	45
5.1.1. <i>Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha</i>	45
5.1.2. <i>Centre National Suisse de Mycobactéries</i>	46
5.1.3. <i>Veterinary Laboratory Agency</i>	47
5.1.4. <i>Laboratoire de Van Haeringen</i>	47
5.1.5. <i>Institut Tropical et de Santé Publique Suisse</i>	47
5.1.6. <i>Université Cheik Anta Diop de Dakar</i>	48
5.2. Lieux de l'Étude	49
5.3. Matériels et Méthodes	50
5.3.1. <i>Les animaux</i>	50
5.3.2. <i>Le matériel biologique</i>	51
5.3.3. <i>Les techniques de diagnostic utilisées</i>	53
5.3.3.1. Caractérisation moléculaire des races bovines.....	53
5.3.3.2. Diagnostic ante mortem de la tuberculose.....	53
5.3.3.3. Diagnostics post mortem de la tuberculose	53
5.3.3.4. Gestion des données et analyses statistiques	54
6. Résultats	55
6.1. Molecular Characterization of two Common Chadian Cattle Breeds.....	55
6.2. Diagnostics Ante et Post Mortem de la Tuberculose Bovine au Sud du Tchad: cas des bovins destinés à l'abattage.	71
6.3. Molecular Epidemiology of Bovine Tuberculosis in Chad.....	91
6.5. Comparative Assessment of Fluorescence Polarization and Tuberculin Skin Testing for Diagnosis of Bovine Tuberculosis in Chadian Cattle	103
7. Discussion Générale.....	127
8. Conclusions Générales, Recommandations et Perspectives.....	135
8.1. Conclusions Générales	135
8.2. Recommandation et Perspectives.....	136
9. Bibliographie	139
10. Annexes	155
10.1. Curriculum Virae	155
10.2. Protocole de L'Étude	161
10.3. Fiche d'Examen Clinique.....	163
10.4. Fiche de L'Intradermo-Tuberculation Comparative	164
10.5. Fiche D'Inspection Post Mortem.....	165
10.6. Middlebrook 7H9 Medium Preparation	167
10.7. Making Digestion and Decontamination Solutions	172
(NaOH-NALC & Phosphat Buffer).....	172
10.9. Homogenisation of Tissues.....	177
10.10. Decontamination	181
10.11. Sowing of Inocula on Solid and in Liquid Media.....	189
10.12. Harvesting Cultures for Storage and Biotyping.....	197

Liste des Cartes et Figures

Figure 2.1: Coloration d'un échantillon frais par la technique de Ziehl Neelsen (en rouge: les BAAR)	11
Figure 2.2: Colonies de <i>M. bovis</i> (excroissances blanches) obtenues par culture sur milieu Löwenstein Jensen.....	11
Figure 2.3: Coloration de Ziehl Neelsen d'une colonie de BAAR issue de la culture sur milieu Löwenstein Jensen.....	11
Figure 2.4: Colonies de <i>M. tuberculosis</i> (excroissances jaunes) obtenues par culture sur milieu Löwenstein Jensen.....	11
Figure 2.5: Concept de transmission de la tuberculose bovine dans un système d'élevage transhumant (Photo. Steven A. Osofsky AHEAD).....	13
Figure 2.6: Mécanisme de l'hypersensibilité retardé (44).....	21
Figure 2.7: Section transversale d'une lésion ganglionnaire caséifiée par le bacille tuberculeux (Photo Ngandolo 2006).	23
Figure 2.8: Les étapes principales du test IFN - γ (source: http://www.prionics.com/fileadmin/user_upload/downloads_and_prints/TB_leaflet_03.pdf).....	27
Figure 2.9: Phylogénie du <i>M. bovis</i> d'après Smith <i>et Coll.</i> , 2006.....	32
Figure 3.1: Carte bioclimatique du Tchad.....	38
Figure 5.1: Collecte de données et les différentes étapes de diagnostic (les flèches rouges indiquent des échantillons éliminés du processus de diagnostic).	52
Figure 6.1: Mbororo cattle (in red) at the slaughterhouse in Chad (photo Ngandolo B.N.R.).....	58
Figure 6.2: Arab cattle at the slaughterhouse in Chad (photo Ngandolo B.N.R.).....	59
Figure 6.3: Log-likelihood of each individual's multilocus genotype in the population sample Arab and Mbororo, respectively, assuming that it comes from this population.	63
Figure 6.4: STRUCTURE clustering result for k=2 clusters.	63
Figure 6.5: Spoligotypes of isolated <i>M. bovis</i> strains	95
Figure 6.6: ROC curves for three diagnostic tests: GENios Pro (black), SENTRY 100 (dark grey) and SICCT (light grey).....	115
Figure 6.7: Lesion prevalence and SICCT reactor prevalence using the OIE and cut-off > 2 mm for different age groups.	115

Liste des Tableaux

Tableau 2.1: Caractères d'identification des mycobactéries appartenant au complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9
Table 6.1: Age structure and average age of the sampled individuals (grouped by sex and breed)..	60
Table 6.2: Number of genotypes (N), number of alleles, fraction of missing genotypes observed heterozygosity, expected heterozygosity and p-value for HWE-testing for the Arab sample and the Mbororo sample, respectively.	62
Tableau.6.3: Analyses multi variées avec IDC, lésions et BAAR en tant que variables dépendantes et classe d'âge, sexe, race et embonpoint comme variables explicatives.	77
Tableau 6.4: Statuts et répartition des bovins suspectés tuberculeux au moyen de l'IDC et du DPM en fonction des classes d'âge	80
Tableau 6.5: Comparaison des résultats de l'IDC issus de la présente étude avec ceux émanant de six études antérieures.....	82
Table 6.6: Distribution of <i>M. bovis</i> strains isolated based on age, breed and tissue localization	97
Table 6.7: Distribution of gross visible lesions.	112
Table 6.8: Logistic model for lesion occurrence	112
Table 6.9: Test performance and characteristics for SICCT, Geniospro and Sentry 100.....	114
Table 6.10: Test Sensitivities for fixed Specificities	117

Liste des Abréviations

AFF: Abattoir Frigorifique de Farcha

AITA: Association Internationale du Transport Aérien

AUC: Area Under Curve

BAAR: Bacille Acido-alcool-résistant

BCG: Bacille Calmette et Guérin

CBLT: Commission du bassin de Lac Tchad

CEMAC: Communauté Économique et Monétaire de l'Afrique Centrale

CDC: Center for Disease Control

CSSI: Centre de Support en Santé Internationale

CVL: Central Veterinary Laboratory

DPM: Diagnostic Post Mortem

DR: Region of Deletion

DSV: Direction des Services Vétérinaires

EIMVT: Institut d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux

EISMV: École Inter-États de Sciences et de Médecine Vétérinaire

FAO: Food and Agriculture Organization

FPA: Fluorescence Polarization Assay

IDC: Intra Dermo tuberculination Comparative

IPM: Inspection Post Mortem

ITS: Institut Tropical Suisse

LRVZ: Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques

MCMT: Membres du Complex *Mycobacterium tuberculosis*

MERA: Ministère de l'Élevage et des Ressources Animales

MGIT: Mycobacterium Growth Indicator Tube

MNT: Mycobactérie Non Tuberculeuse

MTBC: Mycobacterium Tuberculosis Complex

NTM: Non Tuberculosis Mycobacteria

OIE: Office International des Épizooties

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PCR: Polymerase Chain Reaction

PMTRA: Plan à Moyen Terme de la Recherche Agronomique

PPD: Purified Protein Derivative

RCA: République Centrafricaine

REPIMAT: Réseau d'Épidémiologie et de Surveillance des Maladies Animales du Tchad

ROC: Receiver Operating Characteristic
TBB: Tuberculose Bovine
UCAD: Université Cheik Anta Diop de Dakar
UN: United Nation
VIC: Veterinary Investigation Center
VLA: Veterinary Laboratory Agency
VNTR: Variable Number Tandem Repeat

In Memorium

A mon père NARÉ NGANDOLO, mon grand Père NADAL NANDING-NGAR Job, votre disparition précoce a constitué un vide mémorial dans le parachèvement de mon éducation, mais je resterai attaché à votre façon de braver la vie par le travail.

A tous mes collègues du LRVZ de Farcha disparus pendant la préparation de cette thèse, il s'agit de:

- Docteur MAHO ANGAYA,
- Docteur GANDA KANA,
- BEASOUM GOUBDO,
- MAHAMAT SALEH,
- ABDELKERIM BRAHIM,
- AMINA LADAR,
- HALIMATA ZAKARIA,
- ADIDA DAMASSAR,
- MAHAMAT HASSANE TERAP,
- MOUMINE BRAHIM,

Votre disparition a constitué un vide pas facile à combler au niveau du laboratoire mais nous continueront vos œuvres inachevées.

Que Dieu tout puissant vous accueille dans son Royaume.

Paix à vos âmes.

Dédicace

Cette thèse est dédiée à toutes celles et ceux qui ont choisi de se consacrer à la recherche scientifique. Une petite minorité d'entre eux a brillamment réussi sa carrière et je suis fier d'avoir de telles personnes dans mon jury de thèse. Grâce à leurs compétences, probablement une majorité de ces personnes ont trouvé un travail intéressant, au moins pour une part, le reste étant occupé par des tâches administratives. Ma pensée va particulièrement à ceux qui n'ont pas complètement abandonné leur carrière académique et qui essayent de trouver de temps en temps quelques jours pour travailler leur thèse.

Remerciements

J'exprime mes profonds remerciements à mes Directeurs de thèse, les Professeurs Jakob ZINSSTAG et Ayayi Justin AKAKPO pour l'aide compétente qu'ils m'ont apportée, pour leurs patiences et leurs encouragements à finir un travail commencé il y a longtemps. Leurs yeux critiques m'ont été très précieux pour structurer ce travail afin de présenter un document scientifique de base qui servira de guide à la lutte contre une pathologie listée parmi les 33 maladies animales déclarées Réputées Légalement Contagieuses par la loi tchadienne N° 09 / 04 / PR du 19 mai 2004.

Ensuite, je tiens à remercier le Professeur Bhen Sikina TOGUEBAYE pour m'avoir fait profiter de ses connaissances en matière de méthodologie de recherche et de rédaction des documents scientifiques mais aussi de m'avoir encouragé à commencer une thèse qui a fini par aboutir.

Je remercie le Docteur Colette DIGUIMBAYE-DJAIBÉ pour toutes ses bonnes intentions à me voir avancer dans ma carrière scientifique et surtout pour toute sa disponibilité pour mon encadrement technique en matière de diagnostic de la tuberculose au LRVZ de Farcha.

Toute ma gratitude au Professeur Marcel TANNER et tout le personnel du Swiss Tropical and Public Health Institute (Swiss TPH) pour l'encadrement scientifique qu'ils m'ont apporté dans le cadre des études semestrielles à l'Université de Bâle.

Au Professeur GLYN HEWINSON, aux Docteurs Noël SMITH et Stefan BERG ainsi que tout le personnel du VLA, toute ma gratitude pour leur apport technique en matière de diagnostic moléculaire de la tuberculose lors de mon séjour à Londres. Cet apport m'a été d'une grande importance car il m'a permis de mettre en route l'unité de diagnostic moléculaire du LRVZ de Farcha.

Je remercie vivement le Professeur Erik BÖTTGER de Institut für Medizinische Mikrobiologie (IMM) de Zurich (Suisse) et tout son staff pour leur accueil et leur aide technique et matériel lors de mon stage au sein de leur laboratoire.

A mes compagnons de lutte, BORNA MULLER, MARCUS HILTY, MAHAMAT BECHIR et PHUC PHAM DUC, je ne sais comment les remercier pour leurs compagnies et les échanges d'idées que nous avons eu à faire tout le long de cette dure période de travail. Toute ma gratitude à eux.

Je remercie de vive voix le Docteur Ester SCHELLING pour tout son encadrement en analyse statistique et méthodes épidémiologiques, ainsi que pour son apport dans la mise en forme de ce document.

Toute ma gratitude au Directeur du LRVZ de Farcha, le Docteur MAHAMAT HAMID MAHAMAT pour tout son appui et son dévouement à voir aboutir cette thèse.

A toute l'équipe de MAÏNGARA, précisément TCHARI DOUNGOUS, BAIZINA MAMA et le Président de l'association des bouchers de Sarh Monsieur ELHADJI BRAHIM, je leur dis merci pour l'importante aide qu'ils m'ont apporté durant la collecte des données.

Je dis également merci à LAMIREOU DIDI pour tout son apport en matière de suivi de culture des souches tuberculeuses, chaque fois que je me trouve en dehors du pays.

Au Docteur ASSANDI OUSSIGUERE et Service NAISSENGAR KEMDONGARTI, merci pour la confiance qu'ils ont toujours placé en moi surtout dans l'exercice de certaines tâches au niveau de la Division Santé Animale du LRVZ de Farcha.

Au Docteur Daugla DOUMAGOUM MOTO et tout le personnel du Centre de Support en Santé Internationale (CSSI) de N'Djamena, je ne sais comment les remercier pour l'estime et surtout la confiance qu'ils ne cessent de placer en ma modeste personne. Toutes mes gratitude à eux.

Je remercie ma famille, Ma Maman, mes frères et sœurs, oncles et tantes, mes cousins et cousines, précisément NGAGO SOLLO, Didier DERRY et sa femme BAGANGE, François NGAMADA et sa femme MODJAM BANGODJI, BONGO DERRY Edgard et sa femme DEBORA, SAMAGNE DERRY DELPHINE, TOHOGADJI DOMBO, Général DJIMET MAMARI, MAHAMAT DOGO, MADJIRI KOSS et ses enfants, Salomon NADJIANA et toute la famille NANDIG-NGAR, SOLO NGANDÉRE et toute sa famille, GUÉDJI NGAMADA et tous les enfants BONGO NGANDOLO pour m'avoir aidé à fonder mon foyer durant cette dure période de préparation de la thèse.

A ma femme BOUKOYO MALLA GERMAINE NARÉ et tous ses parents, merci pour votre patience et surtout pour l'amour que vous continuez à exprimer en vers moi en dépit de mon absence quotidienne auprès de vous eu égard à mon attachement aux activités de recherches scientifiques.

A tous mes amis, NADJADJIM ABLAYE, AIGONGAR DJIDINGAR, AIME ASSIDJIM DJIDAN, RIRABE DJIDINGAR, KOSSADOUMNGAR DJIDINGAR et sa Femme NELOUM, NGARYAM BENOUDJITA, ROASNGAR ABLAYE, MOUASSEDE MADINGAR, NANG-YADE Richard, Célin NGABÉRE et DJIRA HAROUN BAIPOR, merci pour vos encouragements et aides moraux durant les dures épreuves de préparation de cette thèse.

A l'Université de Bâle (Suisse), je dis merci pour l'encadrement académique qu'elle m'a fait profiter et surtout pour le financement de l'impression de cette thèse de PhD.

Je remercie de vive voie les autorités Suisse de m'avoir octroyé la bourse fédérale qui m'a permis de séjourner en Suisse dans le cadre des études semestriels et de la soutenance de cette thèse.

Merci à Dieu tout puissant de m'avoir protégé et guider mes pas vers la recherche scientifique.

Resumé

La tuberculose bovine (TBB) est une maladie infectieuse et d'évolution chronique, transmise à l'Homme et de nombreuses espèces animales. Elle est due à une infection intracellulaire du *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), membre du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Elle représente un fléau majeur dans les élevages bovins des pays en voie de développement, dont le Tchad.

Au Tchad, quand bien l'évaluation de son impact sur l'économie nationale n'a pas encore été effective, les pertes en termes de tonnes de viande saisie sont remarquables.

La présente étude se fixe comme objectifs de:

- identifier les facteurs de risque responsables à l'infection due à la TBB dans les élevages transhumants du Tchad,
- mettre en évidence, pour la première fois les souches *M. bovis* circulant dans la partie sud du Tchad,
- valider et mettre au point les outils de diagnostic ante et post mortem de la TBB chez le bétail transhumant du Tchad,
- Identifier des options appropriées de contrôle de la TBB chez le bétail transhumant du Tchad.

L'étude a été faite dans la zone méridionale du pays (Moundou et Sarh) et a permis d'échantillonner 954 bovins destinés à l'abattage. Ces animaux provenaient de 3 races locales (Arabe, Mbororo ou Peuhl et Bogolodjé) ainsi que des métis issus de leur croisement. Il a été effectué l'examen clinique sur les animaux vivants et des échantillons sanguins ont été collectés sur ces derniers afin de réaliser la caractérisation génétique des races bovines et la mise en évidence des anticorps anti *M. bovis* (Fluorescence Polarization Assay (FPA)). L'épreuve d'Intradermo tuberculination comparative (IDC) a été en suite, effectués sur les mêmes animaux. Le diagnostic post mortem (DPM) a été constitué par l'Inspection en abattoir aussi bien que des diagnostics bactériologique et moléculaire.

La caractérisation génétique de 205 animaux issus des deux races bovines (Arabe et Mbororo) n'a révélé aucune différence génétique entre ces dernières, lorsque 21 marqueurs ont été utilisés. Sur 929 bovins Arabes et Mbororo, il a été mis en évidence 95 réagissants (10,3%). Cependant, sur 919 carcasses inspectées à l'abattoir, il a été enregistré 109 cas de saisies liées à la tuberculose (11,8%) sur lesquels 120 échantillons de tissus (lésions) ont été collectés. Des frottis ont été confectionnés à partir des échantillons de tissus collectés et colorés par la méthode de Ziehl Neelsen. En combinant les résultats issus de l'IDC et ceux issus de la microscopie, la prévalence des animaux suspectés de TBB a été estimée à 14% (130 / 919). La culture de 112 échantillons de tissus provenant de 108 carcasses a permis de montrer que 50 bovins furent réellement

porteurs de bacille acido-alcoolo résistant (BAAR). Le PCR en temps réel a prouvé la présence des mycobactéries chez 33 bovins et il a été notifié parmi ces dernières 13 souches de mycobactéries non tuberculeuses et 20 membres du complexe *M. tuberculosis*. La technique du Spoligotyping a permis de révéler que, 13 carcasses sur 108 (12%) ont été infectées par le *M. bovis*. Les traits communs aux différents spoligotypes caractérisés sont représentés par l'absence des spacers 3, 9, 16 et 30. Le manque de spacer 30 a été au par avant signalé comme étant spécifique aux souches *M. bovis* isolées en Afrique Centrale mais aussi caractéristique de la souche *M. bovis BCG*. Ce qui suggère l'origine européenne de ces souches. En effet, la mise en évidence du *M. bovis* dans cette région du Tchad est une première.

L'évaluation des techniques utilisées pour la mise en évidence de la TBB au sein de la population d'étude a montré que le seuil de mesure utilisé pour l'épreuve d'IDC devrait être revu en baisse (> 2 mm) par rapport à celui recommandé par l'OIE (> 4mm). Toutefois, l'étude a pu montrer qu'il n'y a aucune évidence que les animaux porteurs de lésions n'ayant pas réagi à l'IDC (probablement anergique) pourraient être détectés par le test FPA. Le test IDC demeure à cet effet, le test de référence pour la détection des bovins tuberculeux dans les élevages transhumants.

Mots clés: Tchad, Tuberculose bovine, *M. bovis*, Diagnostic, IDC, FPA, Épidémiologie Moléculaire.

Summary

Bovine tuberculosis (BTB) is a chronic infectious disease, transmitted to humans and many animal species. It is due to an intracellular infection of *Mycobacterium bovis* belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. It represents a major threat to cattle in developing countries, including Chad.

In Chad, where the assessment of its impact on the national economy has not yet been, we anticipate that the losses in tonnes of condemned meat are substantial.

The objectives of this study were:

- To identify risk factors of BTB infection in Chadian transhumant cattle,
- To describe for the first time the circulating *M. bovis* strains in the southern part of Chad,
- To validate and establish ante post-mortem diagnostic tools for BTB in transhumant cattle,
- To identify appropriate disease control options for BTB in Chadian transhumant cattle.

The survey was done in the southern area of the country (Sarh and Moundou) and involved sampling 954 cattle prior to slaughter. Cattle belonged to 3 local breeds (Arab, Mbororo or Fulani, Bogolodjé) and crossbreeds of these. Clinical examination of live animals was performed and blood samples were collected for the genetic characterization of breeds and detection of antibodies against *M. bovis* (Fluorescence Polarization Assay (FPA)) and Single Intradermal Comparative Cervical Tuberculin (SICCT) test. The post mortem diagnoses consisted of slaughterhouse inspection as well as bacteriological and molecular diagnostic examinations.

Genetic characterization of the two main breeds (Arab and Mbororo) for 205 animals found no genetic difference in the 21 markers used. Ninety-five of 929 Arab and Mbororo cattle were tuberculin reactors (10.3%). However, meat inspection of 919 carcasses at the slaughterhouse condemned fully or partially 109 carcasses due to tuberculous lesions (11.8%). One hundred and twenty tissue samples were taken from organs with lesions amongst 108 carcasses. The smears from sampled tissues were stained with the Ziehl Neelsen stain for microscopic evaluation.

After combining results from the SICCT and smear microscopy, the prevalence of suspected BTB animals was estimated to be 14% (130 of 919 cattle). The cultures of 112 tissue samples from 108 carcasses revealed that 50 cattle were infected with acid-fast bacilli. The real-time PCR showed the presence of mycobacteria in 33 cattle, with 13 strains being non-tuberculous mycobacteria and 20 strains belonging to the *M. tuberculosis* complex. Spoligotyping further showed that 13 of 108 condemned carcasses (12%) were infected with *M. bovis*. The spoligotype pattern of all *M. bovis* isolates lacked spacers 3, 9, 16 and 30. The lack of spacer 30 was previously reported as typical

for *M. bovis* strains in central Africa which is also a characteristic of *M. bovis* BCG. This suggests an European origin. This is the first description of *M. bovis* in the southern Chad.

The assessment of the techniques used for the detection of BTB in the population showed that the threshold used for the SICCT test should be decreased from > 4 mm (current OIE recommendation) to > 2 mm in order to increase its sensibility. We found no evidence that lesion positive animals not reacting to the SICCT (likely due to anergy), would be detected with the ante-mortem FPA test. The more expensive FPA test did not perform better than the SICCT. Therefore, the latter remains the standard test for detection of BTB in Chadian cattle.

Keywords: Chad, Bovine Tuberculosis, *M. bovis*, Diagnosis, SICCT, FPA, molecular epidemiology.

Zusammenfassung

Die bovine Tuberkulose (BTB) ist eine ansteckende Krankheit, welche beim Menschen und vielen Tierarten eine chronische Erkrankung verursachen kann. Die Krankheit wird durch eine intrazelluläre Infektion von *Mycobacterium bovis* verursacht. *M. bovis* gehört zum *M. tuberculosis* Komplex. Die BTB stellt eine Bedrohung für die Rinderhaltung in Entwicklungsländern, inklusive dem Tschad, dar.

Im Tschad, wo noch keine Evaluation der durch die Krankheit verursachten ökonomischen Verluste gemacht worden ist, nehmen wir dennoch an, dass die Tonnen von konfisziertem Fleisch beträchtlich sind.

Die Ziele dieser Studie waren die Folgenden:

- Risikofaktoren einer BTB Ansteckung von transhumanten Rindern zu identifizieren,
- Die zirkulierenden *M. bovis* Stämme im Süden vom Tschad zu beschreiben
- Ante- und post-mortem Diagnostikmethoden zu evaluieren und einzurichten
- Angemessene Massnahmen zur Kontrolle der BTB in transhumanten Rinderherden zu identifizieren.

Die Feldstudie wurde im Süden vom Tschad (Sarh und Moundou) bei 954 Schlachtrindern durchgeführt. Die Rinder gehörten zu 3 lokalen Rassen (Arabische, Mbororo und Bogolodjé) und Kreuzzüchtungen aus diesen. Die Rinder wurden vor der Schlachtung klinisch untersucht und Blutproben genommen. Das Blut wurde für die genetische Beschreibung der Rassen und für den Nachweis von Antikörpern gegen *M. bovis* (mit dem (Fluorescence Polarization Assay (FPA)) verwendet. Zudem wurden die Rinder mit dem vergleichenden intradermalen Tuberkulintest („Single Intradermal Comparative Cervical Tuberculin“ (SICCT) test) geprüft. Die postmortem Untersuchungen bestanden aus der Fleischschau sowie bakteriologischen und molekularbiologischen Investigationen.

Die genetischen Untersuchungen der beiden vorherrschenden Rinderrassen (Arabische und Mbororo) fand keine Unterschiede zwischen den Rassen (mit Material von 205 Tieren) mit den 21 benutzten Markern. Fünfundneunzig von 929 Arabischen und Mbororo-Rindern waren tuberkulin-positiv (10.3%). Hingegen hat die Fleischschau 109 von 919 untersuchten Tierkörpern ganz oder partiell konfisziert (11.8%). Hundertzwanzig Gewebeproben von Organen mit tuberkulöser Läsionen wurden von 108 Tierkörpern entnommen. Diese Proben wurden mit Ziehl Neelsen gefärbt und auf säurefeste Stäbchen mikroskopisch untersucht.

Die aus der Tuberkulinisierung und Mikroskopie hervorgehende kombinierte Prävalenz von BTB-Verdachtsfällen war 14% (130 / 919). Unter den 112 erhaltenen Kulturen waren säurefeste

Stäbchen Kulturen von 50 Tieren. Real-time PCR zeigte, dass die Kulturen von 33 Rindern bei 13 atypische Mykobakterien waren und 20 Kulturen zum *M. tuberculosis* Komplex gehörten. Diese wurden weiter mit Spoligotyping untersucht und insgesamt waren 13 von den 108 untersuchten Tierkörpern mit *M. bovis* infiziert (12%). Die Spoligomuster von allen Kulturen hatten fehlende Spacers 3, 9, 16 und 30. Stämme mit fehlendem Spacer 30 wurden früher in Zentralafrika beschrieben und dies ist auch charakteristisch für *M. bovis* BCG. Dies deutet auf einen europäischen Ursprung. Wir beschreiben hier die ersten *M. bovis* Stämme für den südlichen Tschad.

Die verschiedenen untersuchten Diagnostikmethoden für BTB in der Rinderpopulation zeigte, dass der Grenzwert vom SICCT von der von der OIE empfohlenen > 4 mm auf ≥ 2 mm gesenkt werden soll um die Sensibilität zu erhöhen. Wir fanden keine Anzeichen, dass der FPA Test jene Tiere mit tuberkulösen Läsionen entdeckt, die aber tuberkulin-negativ waren (wahrscheinlich wegen einer Anergie). Der teure FPA Test hat somit nicht besser als der Tuberkulintest abgeschnitten und der Letztere wird für die Untersuchung auf BTB der tschadischen Rinder weiterhin empfohlen.

Schlüsselwörter: Tschad, bovine Tuberkulose, *M. bovis*, Diagnose, SICCT, FPA, molekulare Epidemiologie.

1. Introduction Générale

L'élevage joue un rôle central dans l'économie des pays africains avec plus de 60 millions de têtes de bovins dans le Sahel et l'Afrique de l'Ouest qui s'illustrent comme une région d'élevage par excellence. Il constitue également une des principales activités économiques dont sont tributaires les populations les plus pauvres de la région en tant que source d'aliments et de revenus monétaires (26).

Ce secteur est de nos jours menacé par diverses pathologies que sont les maladies parasitaires, virales et bactériennes. Parmi ces dernières, figure la tuberculose bovine (TBB) qui demeure l'une des maladies animales les plus dévastatrices dans les pays en voie de développement (12) tant du point de vue de Santé publique que du point de vue économique (51).

La TBB qui fait l'objet de la présente étude, est une maladie infectieuse, contagieuse, d'évolution chronique à inflammation granulomateuses chez des nombreux hôtes mammifères. Elle est causée par un bacille intracellulaire communément appelé Bacille Acido - Alcoolo - Résistant (BAAR) mise en évidence dans des sections histologiques colorées. L'espèce bacillaire responsable de la TBB est surtout le *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) ou parfois le *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Les bovins sont également réceptifs à *Mycobacterium avium* (*M. avium*) qui est le plus souvent responsables d'infections bénignes, spontanément curables, dont l'importance est surtout liée aux conséquences sur le dépistage allergique de la tuberculose.

De nos jours, à l'exception de l'Antarctique, la TBB due à l'infection de *M. bovis*, a été mise en évidence sur tous les autres continents bien que son éradication a été en grande partie une réussite dans les pays développés, particulièrement ceux ne disposant pas d'importants réservoirs sauvages (125).

En Afrique, la majeure partie des programmes nationaux de lutte contre la tuberculose ignore la part du *M. bovis* en tant que cause de la maladie chez l'Homme compte tenue du manque de moyen de diagnostic de pointe, d'où la grande difficulté d'évaluer son impact sur la Santé humaine. Parmi les 55 pays africains, seuls sept (Afrique du Sud, Algérie, Burkina Faso, Cameroun, Maroc, Namibie et Zambie) disposent d'un programme de lutte contre la TBB dans les troupeaux de bétail, utilisant les tests tuberculiques et l'inspection post mortem pour la surveillance de la maladie (28). Ces programmes restent toutefois peu efficaces du fait des mouvements de transhumance des animaux dans des zones où ces mesures ne sont pas du tout appliquées mais aussi du manque de synergie entre les États impliqués dans la lutte.

Au Tchad, la TBB a fait l'objet de quelques investigations menées au niveau des abattoirs et des élevages transhumants dans le cadre des activités de recherche ponctuelles. Cependant, le diagnostic ante et post mortem de la maladie sur un même échantillon destiné à la consommation n'a jamais fait l'objet d'une étude au Tchad. La présente étude s'inscrit dans le cadre de l'évaluation des méthodes et techniques de diagnostics relatives à la mise en évidence de la TBB aussi bien sur l'animal vivant que sur des carcasses (et abats) destinées à la consommation en tant que préalables à l'élaboration d'un projet de programme d'assainissement des troupeaux

transhumant au Tchad. Elle tient également lieu d'une première enquête relative à la mise en évidence des souches tuberculeuses circulant dans la partie méridionale du pays.

Notre étude est organisée de la manière suivante:

- la première partie est consacrée à la synthèse bibliographique,
- la deuxième partie porte sur la présentation du Tchad, de son élevage ainsi que les différentes structures en charge de la santé animale,
- la troisième partie présente les objectifs de l'étude,
- la quatrième partie porte sur la description du cadre institutionnel, du lieu de l'étude ainsi que des matériels et méthodes utilisées,
- la sixième partie présente les principaux résultats obtenus,
- la septième partie porte sur la discussion générale,
- la huitième partie est consacrée aux conclusions générales, aux recommandations et aux perspectives.

2. Synthèse Bibliographique

2.1. Importance de la Tuberculose Bovine

2.1.1. Situation de la tuberculose bovine dans le monde

La tuberculose est l'une des vieilles maladies connues, et chez le bétail elle est plus couramment mise en évidence dans les abattoirs (63). Après l'identification de l'organisme responsable de la maladie par Robert Koch en 1882, les travaux de McFadyean et de Ostertag, ont posé les bases des pratiques d'inspection de la viande. En 1891, McFadyean assisté par Albert Mettam et de Stewart Stockman ont mis au point les premiers tests de tuberculine sur le bétail en Grande Bretagne. C'était au Congrès international de la Tuberculose en 1901 à Londres que la maladie aurait connue son épisode historique avec les débats scientifiques houleux qui avaient eu lieu entre McFadyean et Robert Koch. Pour ce dernier, la TBB serait d'une importance secondaire en ce qui concerne l'infection chez l'Homme, tandis que McFadyean considérait que la presque absence de législation relative à la tuberculose mammaire du bétail à l'époque, était un scandale (63). La série des conférences internationales sur la TBB à *M. bovis*, n'a commencé qu'en 1991 à Dublin (86). Ces conférences avaient toutes pour objectifs de lever les contraintes actuelles au contrôle et à l'éradication de la maladie chez le bétail (63).

Dans beaucoup de pays industrialisés, la lutte contre la TBB a commencé vers la fin du 19^{ème} siècle. Au cours des décennies qui ont suivis cette période, les mesures de contrôle de la maladie consistaient à effectuer les diagnostics cliniques dans les troupeaux, le contrôle bactériologique du lait et à l'abattage volontaire des animaux malades (36). L'utilisation des tests intradermiques et sous cutanés ou l'injection de la tuberculine étaient sporadiquement appliqués (85). En ce moment, bien que sporadique et quelques fois persistante, la TBB chez le bétail a été réduite à un niveau très négligeable dans les pays comme les États-Unis, le Canada, l'Afrique du Sud et une grande partie de l'Union Européenne. Douze États membres de l'Union Européenne sont officiellement considérés être indemnes de la TBB et la mise en œuvre des plans d'éradication de la maladie a été approuvée dans huit autres pays (6).

En Australie et quelques îles de la Caraïbe (y compris le Cuba), ainsi qu'une partie de l'Amérique du Sud, l'éradication de la TBB a été un succès (31).

En Grande Bretagne, les sérieuses initiatives prises pour l'éradication de la TBB au sein des troupeaux ont commencé en 1935 quand le Gouvernement Britannique a introduit le régime d'attestation de test obligatoire afin d'abattre tous les animaux réagissant au test de tuberculination (125), et ce n'est que vers les années 1950 que ce régime devenait obligatoire. Il a connu un succès remarquable et a permis de réduire considérablement l'incidence des réagissants au test tuberculinique sur l'ensemble de l'île Britannique entre 1961 et 1982 (125). Par ailleurs, à mesure que la couverture de test du troupeau national s'améliorait au fil des ans, la contribution des examens cliniques pour la détection du bétail infecté régressait, et vers le milieu des années 1960, moins de 10 cas cliniques relatifs à la TBB par an, n'ont été détectés et éliminés (125). Toutefois, à

l'heure actuelle, il est presque inouï de détecter la TBB chez le bétail par le biais de l'examen clinique, la tendance est orientée vers les techniques de biologie moléculaire pour des raisons d'intérêt épidémiologique.

Cependant, l'existence des hôtes réservoirs sauvages rend difficile le succès des plans et programmes d'éradication de la TBB dans certains pays développés, et des cas simultanés de flambés épidémiques chez le bétail et certaines espèces sauvages ont été souvent signalés (125). En effet, la TBB a été mise en évidence chez les animaux sauvages d'Amérique du nord, d'Europe, d'Afrique et de Nouvelle Zélande (27). Ce sont surtout, le cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus*) et le bison (*Bison bison*) d'Amérique du nord, le blaireau (*Meles meles*) en Grande Bretagne et en Irlande, le possum (*Trichosurus vulpecula*) en Nouvelle Zélande et le buffle d'Afrique (*Syncerus calfer*) (89). Des études récentes effectuées en Grande Bretagne et en Irlande ont démontré que le blaireau européen (*Meles meles*) est un important réservoir de la TBB et il a été aussi montré que l'abattage à grande échelle de cette espèce sauvage a réduit de façon significative l'incidence de la maladie dans les zones assainies (36). Il en est de même au Nouvelle Zélande et au Michigan (États-Unis) où les programmes conjoints de test et d'abattage des animaux domestiques et sauvages ont été initiés, et ont permis de réduire considérablement l'incidence de la maladie chez le bétail (93, 117).

Vu les efforts faits au niveau des autres continents en ce qui concerne la lutte contre la TBB, à quel niveau de contrôle de la maladie, le continent africain se trouverait à l'aire de la mondialisation?

2.1.2. Situation de la tuberculose bovine en Afrique

La TBB représente un fléau majeur de l'élevage bovin dans les pays en voie de développement. Elle demeure l'une des maladies animales les plus dévastatrices dans ces pays tant du point de vue de Santé humaine que du point de vue économique.

En Afrique, elle représente un risque potentiel pour ces deux domaines de Santé car près de 82% de la population humaine et de 85% du bétail vivent soit dans des régions où la maladie demeure prévalente soit dans des zones partiellement contrôlées (8). Bref, elle est presque présente dans toutes les nations africaines (142) affectant ainsi les animaux domestiques et sauvages. Il a été aussi montré que, le taux de prévalence de la TBB est très élevé (80% pour 33 pays africains sur un total de 43), dans les pays membres de la commission régionale d'Afrique pour l'Office International des Épidémiologies (OIE) où elle a été classée "maladie animale à haute priorité" par les 17 pays d'Afrique sub-saharienne membres du Réseau d'Épidémiologie (dont le Tchad) (10). L'une des principales raisons qui ont conduit à cette classification a été son impact sur l'économie au niveau de ces pays (baisse de production des produits et sous produits animaux, ainsi perte en termes de tonne de viande confisquée). Elle représente un fléau majeur dans les élevages transhumants et la plus part des motifs des saisies dans les abattoirs en Afrique sahéenne sont liées à la TBB (33). Quand bien même, les pertes économiques dues à cette

maladies demeurent sous évaluées, il existe des indicateurs qui témoignent de son importance dans les élevages africains.

Au Cameroun, Mali, Nigeria et Tchad où un même complexe clonal du *M. bovis* (Afircan1 (Af1)) a été mis en évidence (88), diverses investigations ont prouvé à différentes échelles l'importance de la TBB chez le bétail. Au Cameroun, des données collectées sur les cas des saisies au niveau des abattoirs, ont montré que la prévalence de la maladie serait très élevée et que la diversité géographique des spoligotypes des souches *M. bovis* isolées nécessitait l'élaboration d'une carte régionale du *M. bovis* qui pourrait aider à mener un contrôle efficace de la maladie (92). Au Mali, une étude réalisée dans 36 troupeaux bovins laitiers, a montré que 34 d'entre eux (soit 94,44%) ont réagi positivement au test IDC (123). Au Nigeria, pour un seul troupeau privé testé à l'IDC (de taille n = 171), il a été détecté en moyenne 10,5% (18 / 171) de réagissants au test IDC parmi lesquels 11 portaient des lésions dues à *M. bovis* (17). Au Tchad, sur 10000 carcasses bovines inspectées à l'abattoir de N'Djamena, 727 ont été suspectées de tuberculose à l'inspection des viandes dont 56 sur 199 choisies au hasard portaient des lésions contenant la souche *M. bovis* (40).

La TBB est également présente dans la partie Est de l'Afrique (y compris la "Corne de l'Afrique"). Au Soudan, il a été mis en évidence que sur 120 lésions collectées dans les abattoirs, 25 étaient des lésions causées par le *M. bovis* (soit 46%) (128). En Érythrée, utilisant le test IDC comme méthode de diagnostic *in vivo*, il a été mis en évidence un taux de prévalence de 41,7% lorsque 72 troupeaux des élevages laitiers ont été diagnostiqués autour d'Asmara (95). En Éthiopie, la TBB est considérée comme une maladie majeure du bétail à l'origine d'une forte morbidité et d'une forte mortalité bien qu'au niveau national son taux de prévalence n'est pas encore connu avec certitude (122). Un taux de prévalence troupeau de 51,4% mis en évidence par le test IDC chez les bovins issus du système d'élevage transhumant en Ouganda a été d'une part associé aux facteurs contacts et transfert des animaux d'un troupeau à un autre et d'autre part au facteur âge, preuve d'une longue conservation des animaux malades dans les troupeaux (94). Au Burundi, il a été isolé du *M. bovis* chez 38% de bovins cliniquement suspectés de TBB (113). Une étude épidémiologique conduite en Tanzanie afin de prouver la similarité des souches *M. bovis* d'origine animale et humaine et donc de déterminer l'importance de la tuberculose zoonose, a permis de souligner que la preuve de chevauchement entre les profils génétiques d'ADN provenant des souches *M. bovis* issues de ces deux hôtes, démontre la nécessité d'une synergie des politiques vétérinaires et médicales (Santé publique) en ce qui concerne la surveillance de cette zoonose dans les pays en voie de développement (71).

En ce qui concerne la Santé publique, aucun rapport soumis par les pays africains membres de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ou l'OIE n'a fait mention de l'importance de la tuberculose due au *M. bovis* chez l'homme (8). Cela pourrait être essentiellement lié au fait qu'en Afrique, d'une part, la majorité des laboratoires ne sont pas à mesure de différencier la souche *M. bovis* de la souche *M. tuberculosis*, et d'autre part, du manque de synergie entre les institutions de

recherches vétérinaires sur la question de la TBB en tant que zoonose mais aussi par la faiblesse des systèmes d'informations sanitaires nationaux. Toutefois, quelques travaux ont mis en évidence l'agent responsable de la TBB chez l'Homme. Il est aussi important de noter que, après la mise au point de la technique de Spoligotyping par Kamerbeck (66), quelques travaux de recherche effectués à partir des prélèvements d'origine humaine ont pu décrire le profil génétique des souches *M. bovis* isolées chez l'homme en Afrique (1, 18, 70, 91). A Madagascar le *M. bovis* a été mis en évidence à partir des frottis des crachats positifs (1,25%) et des patients ayant présenté une tuberculose extra pulmonaire (1,30%) (109, 110).

Il vient de constater qu'au vue des travaux menés au profit de la recherche sur la TBB au niveau continental, des efforts restent à fournir dans ce cadre, et les pays à vocation agro-pastorale comme le Tchad doivent insérer dans leurs stratégies de développement, le programme de lutte contre cette zoonose.

2.1.3. Situation de la tuberculose bovine au Tchad

Les présomptions sur l'existence de la TBB au Tchad avaient commencé avec les travaux de Perpeza *et coll.*, (98) qui ont essayé de montrer à partir des lésions collectées à l'abattoir de Fort Lamy (actuel N'Djamena), l'importance du Farcin (à *Mycobacterium farcinogenes*) dans l'élevage du bétail tchadien. Afin de faire un diagnostic différentiel avec la tuberculose, les mêmes auteurs, en 1967, ont étudié les caractères cultureux et biochimiques des souches de *Mycobacterium farcinigenes* isolées lors de la précédente étude (comparé à la souche sénégalaise) et ont même confirmé ses différences avec la souche *Nocardia ateroïdes*. Dès lors, l'hypothèse de l'existence de la TBB au Tchad a été écartée par ce premier groupe de chercheurs bactériologistes qui œuvraient depuis plusieurs années au compte du Laboratoire Central de l'Institut d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux (IEMVT) qui détenait jusqu'à la guerre civile de 1979, la gestion scientifique du LRVZ de Farcha.

En 1985, le LRVZ de Farcha a été rétrocédé à l'État tchadien et plusieurs activités de recherche relatives à la mise en évidence de la TBB chez le bétail ont été entreprises. C'est ainsi qu'en 1997, lors d'une enquête effectuée à l'Abattoir Frigorifique de Farcha (AFF) à N'Djamena, Maho *et coll.*, (78) ont montré à partir d'un échantillon représentatif de 17144 bovins abattus, en utilisant la technique de coloration de Ziehl Neelsen, que pour une prévalence de 1,7% de suspicion à la TBB (lésions issues des carcasses ou des abats contenant des BAAR); 59,4% et 40,6% des cas ont concerné respectivement les races bovines locales Mbororo et Arabes. Deux ans plus tard (en 1999), les mêmes auteurs, en collectant des lésions sur des carcasses et abats saisies sur les aires d'abattage d'Abéché et de Gozbéida (Est du Tchad), ont prouvé que pour une prévalence de 8,8% des cas suspectés de TBB (n = 2048) par la même technique de diagnostic, les bovins de races Mbororo et arabe étaient concernés respectivement à 72,9% *versus* 23,2% (78).

L'hypothèse de la présence de la tuberculose au sein du bétail tchadien a été beaucoup plus renforcée au début des années 2000, par les travaux de Schelling *et coll.*, (120) et de Delafosse *et*

coll., (32), qui ont mis en évidence la présence des bovins réagissant à la TBB en utilisant le test IDC dans les troupeaux transhumant des régions du Kanem et du Chari Baguirmi d'une part et dans le Ouadaï d'autre part. La mise en évidence d'une fréquence plus élevée des bovins réagissants au sein de la race Mbororo par Schelling *et Coll.*, (120), venait à point nommé renforcer les précédents résultats qui ont prouvé que les bovins issus de cette race étaient beaucoup plus porteurs de lésions tuberculeuses que les bovins de race Arabe.

En 2004, Diguimbaye *et Coll.*, (39) ont mis évidence les premières souches du Complexe *M. tuberculosis* chez l'Homme et l'animal. Au cours de cette étude, les premières souches de *M. bovis* d'origine animale ont été isolées confirmant ainsi les résultats obtenus précédemment par les différents tests IDC. La TBB est dorénavant confirmée au sein du cheptel bovin tchadien et sa prédominance au sein de la race bovine Mbororo constituait un sujet de recherche incontournable, surtout lorsque les précédents résultats issus du test IDC et des diagnostics post mortem l'ont déjà bien démontré.

Diguimbaye *et coll.*, (40) ont pu confirmer à partir des lésions collectées à la Société Moderne des Abattoires entre 1^{er} juillet et 31 août 2002, que la proportion des souches *M. bovis* isolées sur des carcasses saisies étaient plus élevées au sein de la race bovine Mbororo comparée à la race Arabe (30 / 75 *versus* 26 / 124). Ces derniers ont pu montrer par diagnostic moléculaire (Spoligotyping) une homogénéité de la structure moléculaire des souches *M. bovis* isolées comme décrite au Cameroun et au Nigeria voisins, prouvant ainsi une probable circulation transfrontalière des souches, sachant que l'élevage bovin est dans la plus part des cas, de type transhumant dans ces pays. Lors de ces investigations, Diguimbaye *et coll.*, (41) ont également prouvé la présence des Mycobactéries Non Tuberculeuses (MNT) à partir des lésions d'origines animales suspectées de tuberculeuses. En effet, la présence des MNT dans l'organisme animal pourrait être à l'origine des faux positives à l'IDC et pourrait dans ce sens surestimer la prévalence ou l'incidence de la TBB au sein du cheptel bovin tchadien.

En utilisant les souches *M. bovis* issues des précédentes études, M. Hilty (58) a suspecté la présence de deux clones de l'espèce *M. bovis* au Tchad. Ce fondement scientifique a permis à Müller *et coll.*, (88) lors d'une étude intégrée, de déterminer du point de vue épidémiologique, un important complexe clonal de *M. bovis* à partir des souches du Cameroun, du Nigeria, du Mali et du Tchad, actuellement nommé Africa 1 (Af 1)

Il est à souligner que, compte tenue de l'importance et de la complexité de la pathologie tuberculeuse d'origine animale présentée ci-haut, une connaissance générale sur l'agent causale de la maladie serait d'un apport capital quant à la réalisation de toute activité de recherche visant à identifier des techniques de diagnostic fiable destiné à des fins de lutte épidémiologique.

2.2. Connaissance Générale sur la Tuberculose Bovine

2.2.1. Définition

La TBB est une maladie infectieuse et contagieuse d'évolution chronique, transmise à l'Homme et de nombreuses espèces animales. La maladie se caractérise par le développement progressif des tubercules dans la plupart des organes du corps, hormis les muscles squelettiques. Dans un grand nombre de pays elle est une maladie infectieuse majeure parmi les bovins, d'autres animaux domestiques, et parmi certaines populations d'animaux sauvages. Elle figure sur la liste de l'OIE des maladies ayant un impact significatif sur le commerce international du bétail et des sous produits animaux. D'après la hiérarchisation des maladies majeures notifiables à l'OIE dans 17 pays africains, en voie de développement, la TBB est classée à haute priorité au Tchad (10). Elle est due à une infection intracellulaire des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* (36), plus précisément du *M. bovis*. Pour l'OIE, l'infection à *M. bovis* chez les bovidés domestiques, les buffles domestiques et les bisons d'Amérique doit être inscrite sur la liste des maladies à déclaration obligatoire au niveau du territoire national.

2.2.2 Taxonomie

Dans l'ordre des Actinomycétales, les mycobactéries appartiennent au genre *Mycobacterium* qui est le seul genre de la famille des *Mycobacteriaceae*. L'agent responsable de la TBB, le *M. bovis* appartient donc au groupe des bactéries, à la classe des *Actinobacteria*, à la sous classe des *Actinobacteridae*, à l'ordre des *Actinomycetales*, au sous ordre des *Corynebacterineae*, à la famille des *Mycobacteriaceae*, au genre *Mycobacterium* et au Complexe *M. tuberculosis* (Tableau 2.1). Ce dernier, très homogène sur le plan génétique compte actuellement huit espèces qui sont: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. bovis* BCG et *M. bovis*(15).

Tableau 2.1: Caractères d'identification des mycobactéries appartenant au complexe *Mycobacterium tuberculosis*.

<i>Mycobacterium</i>	<i>Tuberculosis</i>	<i>africanum</i>	<i>canettii</i>	<i>bovis</i>	<i>BCG</i>	<i>Caprae</i>	<i>pinnipedii</i>	<i>microti</i>
Aspect des colonies (culture sur Löwenstein-Jensen)	Eugonique, rugueux	Dysgonique, rugueux	Eugonique, lisse	Dysgonique, lisse	Eugonique, rugueux	Dysgonique, lisse	Dysgonique, rugueux	Dysgonique, rugueux ou lisse
Type respiratoire	Aérobie	microaérophile	aérobie	microaérophile	aérobie	microaérophile		
Croissance stimulée par le pyruvate	Non	Oui	Non	Oui	Non	Oui	Oui	Oui
Niacine	+	variable	-	-	-	-	- ^d	+
Nitrate réductase	+	variable	+	-	-	-	-	-
Croissance en présence de TCH _a (2 mg/l)	+	variable	+	- ^b	-	+ ^c	- ^e	-
Pyrazinamide (200 mg/l)	Sensible	sensible	Sensible	résistant	Résistant	sensible	sensible	sensible
Cyclosérine (30 mg/l)	Sensible	sensible	Sensible	sensible	Résistant			

^a TCH : Hydrazide de l'acide Thiophène 2 Carboxylique.

M. bovis : le résultat du TCH est ininterprétable si la souche présente une résistance de haut niveau à l'isoniazide.

M. caprae : ^c le résultat du TCH est positif (résistant) à 1 et 2 mg/l, mais négatif (sensible) à 5 et 10 mg/l.

M. pinnipedii : ^d généralement niacine négative,

^e les souches isolées en Nouvelle Zélande résistent à 1 mg/l mais sont sensibles à 10 mg/l de TCH.

Source: [J. P. Euzéby \(Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire\) http://www.mycobacterie.fr/tech/identification/9a_tableau_cmtb.htm](http://www.mycobacterie.fr/tech/identification/9a_tableau_cmtb.htm).

2.2.3. Caractères généraux de *M. bovis*

Le *M. bovis* fait partie des bacilles acido-alcool-résistants (BAAR) non photochromogéniques caractérisés généralement par la capacité de rétention du carbo-fuschine ou de l'auramine O après lavage avec de l'alcool ou de l'acide faible (Figure 2.1 et 2.3). Agent de la TBB, il est aussi pathogène pour l'homme que *M. tuberculosis*. Il est fréquent dans les pays où la surveillance du bétail est insuffisante ou absente. Il se distingue aisément de *M. tuberculosis* par ses caractères cultureux (colonies minuscules, blanches, à surface lisse, qui apparaissent en plus d'un mois à l'isolement (Figure 2.2 et 2.4) et ses caractères biochimiques (micro-aérophile, niacine négative, nitrate négative). Grâce à l'avènement des techniques de la biologie moléculaires (Polymerase Chain Reaction (PCR)), il est de nos jours possible de distinguer l'espèce *M. bovis* de son ancêtre clonal le *M. tuberculosis* (125). La technique de "spoligotyping" (66) basée sur la détection du polymorphisme des séquences inter-DR de la région DR (pour Direct repeat) à partir des 43 oligonucleotides synthétiques (correspondant à 43 séquences inter-DR) fixées sur une membrane, permet également de faire la distinction entre le *M. tuberculosis* et le *M. bovis* (absence des séquences inter-DR allant de 39 à 43). Dans l'évolution phylogénique des espèces du complexe *M. tuberculosis*, les fragments génétiques appelés "Régions de Différence" (RD) se perdent tout le long du processus évolutif. Ainsi, l'espèce *M. bovis* est caractérisée par la délétion du fragment RD4 tandis que l'espèce *M. tuberculosis* est caractérisée par la présence du fragment RD9(125)

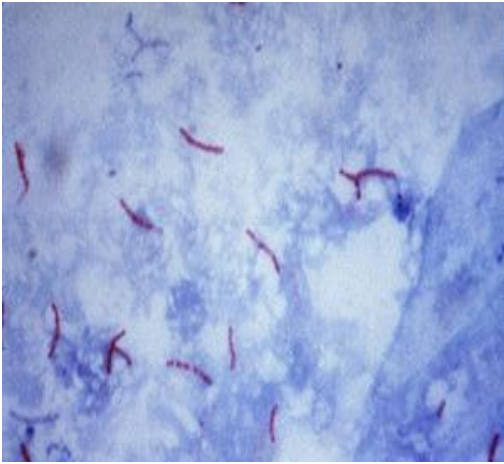


Figure 2.1: Coloration d'un échantillon frais par la technique de Ziehl Neelsen (en rouge: les BAAR)
(Source: www.techno-science.net).



Figure 2.3: Coloration de Ziehl Neelsen d'une colonie de BAAR issue de la culture sur milieu Löwenstein Jensen.
(Source: <http://www.microbe-edu.org/etudiant/mycobacterium1.htm>)



Figure 2.2: Colonies de *M. bovis* (excroissances blanches) obtenues par culture sur milieu Löwenstein Jensen.
(Source : <http://www.irctn/images/powerpoint/E-learning/tbc>).

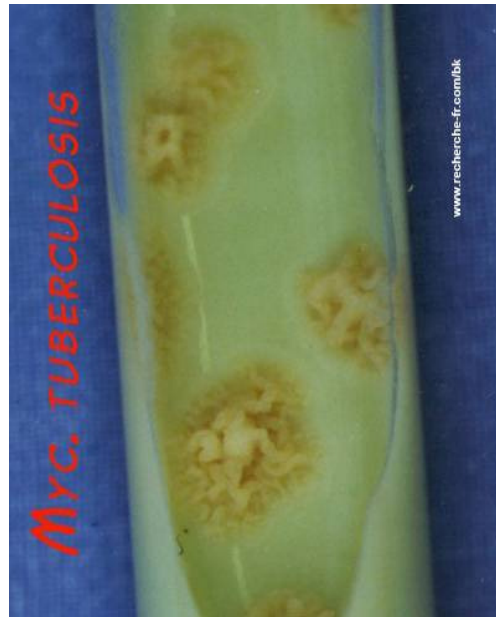


Figure 2.4: Colonies de *M. tuberculosis* (excroissances jaunes) obtenues par culture sur milieu Löwenstein Jensen.
(Source: <http://www.irctn/images/powerpoint/E-learning/tbc>).

2.2.4. Transmission

2.2.4.1. Transmission directe

La transmission directe de *M. bovis* peut se faire par contact rapproché entre animaux, par inhalation, ingestion ou pénétration transcutanée. Des lésions ouvertes (abcès cutané, ou lésions pulmonaires) permettant l'excrétion du *M. bovis* dans le milieu extérieur, favorisent la transmission. Les matières virulentes sont variées : jetage, salive, fèces, lait, urine, pus des lésions cutanées, sperme, sécrétions utérines (143). L'excrétion de bacilles tuberculeux, souvent intermittente, est précoce (bien avant l'apparition des symptômes) et durable. La transmission directe de la mère au fœtus ou transmission verticale est suspectée et n'a jamais été réellement prouvée. Une transmission pseudo-verticale, par contact étroit entre la mère et le jeune (le lait peut aussi être contaminé), expliquerait la contamination des jeunes animaux. Toutefois, l'âge et le comportement de l'animal ainsi que les pratiques inhérentes aux systèmes d'élevage peuvent avoir une importante influence sur le mode d'infection. Dans le cas de la TBB, il a été prouvé trois principales voies de transmission du *M. bovis* chez l'animal. Il s'agit de la transmission par inhalation, par ingestion et rarement par voie génitale.

Le concept de transmission du *M. bovis* généralement approuvée est l'inhalation des bacilles tuberculeux (ou d'un seul bacille) contenus dans une gouttelette d'aérosol (90). L'inhalation est la principale porte d'entrée de *M. bovis* chez les animaux d'élevage dans les fermes mais aussi chez ceux de pâturage libre (Transhumance). L'observation de la distribution naturelle des lésions chez les bovins infectés montre l'implication des ganglions broncho-médiastinaux et ceux de la tête dans le processus d'infection, suggérant ainsi que la principale voie d'entrée des bacilles dans l'organisme est la voie respiratoire (99). Chez l'animal, le principal mécanisme de l'infection se fait par des gouttelettes d'aérosols qui sont disséminées dans la nature suite à la toux produite par l'animal malade qui sont ensuite inhalés par les animaux en contact. Ces aérosols vont se loger dans la voie respiratoire, si possible sur la surface alvéolaire du poumon (106). Les bacilles seront phagocytés par les macrophages, qui vont par la suite interagir avec les cellules impliquées dans la réponse immunitaire innée et acquise, dans les tissus ou les ganglions lymphatiques. Plusieurs études faites sur la pathologie et la distribution des lésions chez les bovins ont montré la prédominance des lésions tuberculeuses au niveau des voies respiratoires ainsi qu'au niveau des ganglions lymphatiques correspondants attestant ainsi la thèse d'une infection par inhalation. Il a été de même, des études expérimentales faites sur la transmission par voie nasale et trachéale (20).

L'ingestion directe de *M. bovis* provenant des animaux infectés (lait cru et autre sous produits animaux crus), des pâturages contaminés ou de l'eau est considérée comme une voie secondaire de transmission (81). En Tanzanie, il a été isolé du *M. bovis* dans deux prélèvements laitiers, montrant ainsi que la consommation du lait frais non pasteurisé constituerait un risque en ce qui concerne la contamination de l'Homme par la TBB (69).

En effet, la transmission de *M. bovis* peut se faire entre animaux, des animaux aux hommes et vice versa et rarement entre les humains. Toutefois, le bétail infecté par *M. bovis* reste une source d'infection pour un autre ou pour l'homme. Cependant, la transmission par voie congénitale et sexuelle est rare dans les régions où le contrôle de la TBB est intensif (90).

2.2.4.2. Transmission indirecte

Le milieu extérieur peut, également, en assurant la conservation des mycobactéries, permettre la transmission indirecte de la maladie entre animaux sauvages, voire entre réservoirs sauvages et domestiques (Figure 2.5). Bref l'environnement et le climat peuvent avoir une importante influence sur le mode d'infection du bétail par le *M. bovis* (94).

En effet, le temps de survie du *M. bovis* dans l'environnement diffère d'une étude à une autre. Différents travaux ont montré que le *M. bovis* peut survivre dans la terre pendant six mois et dans le pâturage de 7 à 28 jours selon la température qui a un effet négatif sur la survie quand elle augmente (99). Dans l'eau courante, qui peut être contaminée par les excréments d'animaux infectés, sa survie peut aller jusqu'à 400 jours (99).

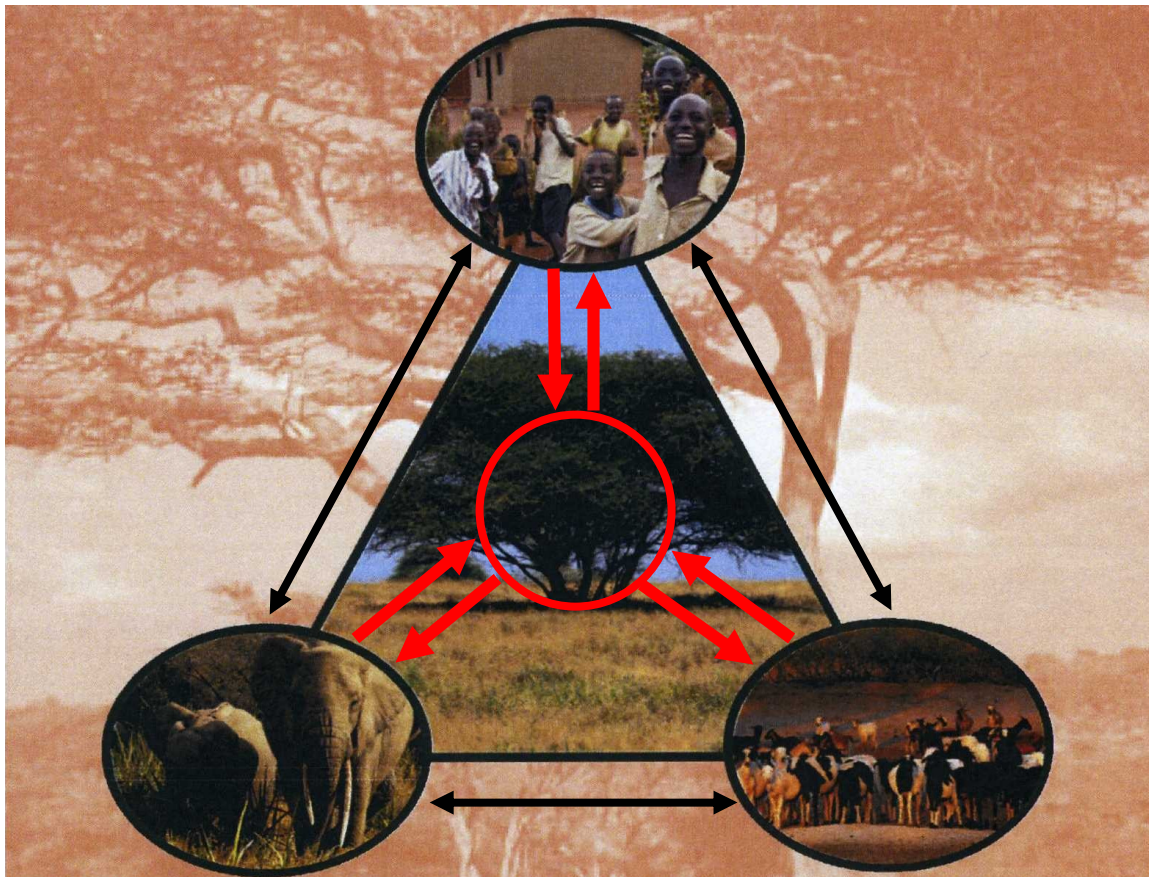


Figure 2.5: Concept de transmission de la tuberculose bovine dans un système d'élevage transhumant (Photo. Steven A. Osofsky AHEAD).

Cependant, d'autres études minimisent le rôle de l'environnement dans la transmission de *M. bovis*. Ainsi, d'après l'étude réalisée par Jackson *et coll.*, (62), la période de survie de *M. bovis* dans l'environnement est très courte, particulièrement pendant l'été, et donc la contamination des pâtures ne jouerait pas un rôle important dans l'épidémiologie de la tuberculose chez les bovins. Ceci pourrait être le cas dans les pays tropicaux, comme au Tchad où la température à l'ombre pourrait atteindre 40°C durant les périodes les plus chaudes. Par ailleurs, l'effet de la température sur la survie de la bactérie n'est pas univoque puis que des expériences de laboratoire ont permis de montrer que la terre chaude et humide était optimale pour la survie de la bactérie (143).

Dans les îles britanniques, il est généralement admis que la transmission de l'infection des blaireaux aux bovins est indirecte par contact avec du matériel virulent (143). Morris *et coll.*, (98), conclurent que la transmission à partir du matériel virulent comparée à d'autres mécanismes de transmission serait bien moins efficace qu'une transmission directe.

Chez certaines espèces, le bacille est ingéré lorsqu'un animal consomme la carcasse d'un hôte infecté. C'est le cas en Nouvelle-Zélande, où la présence de l'infection dans certaines populations de furets est attribuée à la contamination de carcasses de possums infectés (76).

En Afrique, il a été mis en évidence la présence du *M. bovis* chez plusieurs espèces d'animaux sauvages qui pourraient être à l'origine d'une transmission indirecte de la maladie aux animaux domestiques. Des travaux effectués en Afrique du sud ont permis d'une part de montrer que le buffle africain (*Syncerus caffer*) constitue un important hôte réservoir du *M. bovis* (82), et d'autre part, de montrer la susceptibilité des autres animaux sauvages à l'agent responsable de la TBB (111). Il en est de même de la Tanzanie où la présence du *M. bovis* a été mise en évidence chez bon nombre d'animaux sauvages (21). Cependant, jusqu'à ce jour, aucune étude expérimentale n'a prouvé l'existence d'une transmission indirecte du *M. bovis* chez le bétail en Afrique.

2.2.4.3. Risque de transmission de la tuberculose bovine à *M. bovis*, de la faune sauvage (réservoir) à la faune domestique et à l'homme

Historiquement, la tuberculose à *M. bovis* serait une maladie des bovins européens qui aurait été disséminée dans plusieurs pays d'autres continents pendant la période coloniale avec des bovins destinés à être exploités dans les colonies (143). Les bovins exotiques infectés seraient devenus une source importante de contamination pour le bétail local ainsi que pour les espèces sauvages d'animaux qui partageraient le même habitat avec ces derniers (143). Le même phénomène se serait produit dans les pays africains au sud du Sahara où quand bien même, la documentation sur la prévalence et les facteurs de risque à la TBB par pays demeurent rares, il a été prouvé dans certains pays que les races exotiques seraient plus sensibles à la maladie que les zébus locaux (3, 73). L'origine européenne de la TBB en Afrique, a été prouvé plus récemment par Müller *et Coll.*, (88) qui

ont pu montrer que les spoligotypes des souches *M. bovis* isolées au Mali sont identiques à celles isolées en France et en Espagne, appuyant ainsi les résultats de travaux de Sidibe *et coll.*, (123).

Une fois qu'une espèce sauvage est infectée, la maladie peut devenir endémique et cette espèce devenir réservoir de la maladie. D'après Haydon *et coll.*, (55) un réservoir d'une maladie peut se définir comme une ou plusieurs populations épidémiologiquement liées qui assurent la survie d'un agent pathogène et peuvent donc être une source de contamination pour d'autres espèces. L'hôte réservoir peut constituer un risque pour la transmission de la maladie aux animaux domestiques. Pour évaluer ce risque, il est tout aussi important de considérer la distribution et les caractéristiques pathologiques de l'infection à *M. bovis* chez l'espèce sauvage hôte, que l'écologie de cette espèce (34). Par exemple, le blaireau constitue un risque potentiel au Royaume Unie à cause de la présence endémique de l'infection dans les pâtures et à se rapprocher des bâtiments des fermes bovines (143). En Nouvelle Zélande, le possum est une espèce introduite, qui s'est révélée invasive et qui a colonisé pratiquement tout le pays (142). Il cohabite pratiquement avec les bovins dans les lisières des forêts, fourrage dans les pâtures et s'abrite dans les bâtiments. En plus, il est sensible à l'infection par le *M. bovis* et l'excrète dans des quantités élevées.

En Afrique, le phénomène est plus complexe surtout qu'en dehors des parcs zoologiques protégés, les pâturages et les points d'abreuvement sont communs à la faune sauvage et au bétail en transhumance. L'hypothèse d'une contamination entre les deux groupes d'animaux par le *M. bovis* ne serait pas exclue (82, 83). Toutefois, la persistance ou la résurgence de la tuberculose à *M. bovis* dans les élevages d'animaux domestiques dans certains pays a conduit à suspecter une éventuelle source sauvage de re-contamination. Différentes méthodes ont été utilisées pour établir l'existence d'un réservoir de la maladie et son éventuelle responsabilité dans la contamination des élevages d'animaux domestiques. Il s'agit des méthodes suivantes : l'association épidémiologique; l'étude d'intervention et la caractérisation antigénique / génétique (143).

2.2.4.4. Les modèles épidémiologiques

Un animal peut se trouver dans différents compartiments selon l'état de la maladie dans lequel il se trouve. Ils sont dénommés comme sensibles (S), infectés non excréteurs (E, de l'anglais *exposed*), infectés excréteurs (I, de l'anglais *infected*) et immunisés (R, de l'anglais *recovered*). Il s'agit dans ce cas de modèles «compartimentaux».

En ce qui concerne la transmission de la tuberculose à *M. bovis*, plusieurs formes de fonction de transmission ont été proposées par certains auteurs ainsi que des relations non linéaires entre le taux de contact et la densité de population (9). Le premier modèle de tuberculose chez le possum qui incluait des bovins et les aspects économiques de son contrôle a été écrit par Kao et Robert, (67). La composant, possum était un modèle de type SI, avec une équation différentielle et une relation non –

linéaire entre le taux de contact et la densité de la population tandis que la composante bovin était de type SEI. Trois coefficients de transmission ont été estimée (bovin – bovin, possums – possums, possums – bovins) et trois options de contrôle ont été examinées (abattage des possums, vaccination des possums et vaccination des bovins), ainsi que les coûts de chacune d'elles. Le modèle indiquait que par rapport à la vaccination des bovins, la vaccination des possums était plus avantageuse économiquement dans des zones de petite taille et l'abattage des possums dans des zones de taille moyenne. L'efficacité de la vaccination chez les bovins dépendrait de la possibilité de pouvoir faire un test intradermique chez les bovins vaccinés (143). Toutefois, le contrôle simultané de la tuberculose chez les bovins et les blaireaux a été un échec en Grande Bretagne et l'incidence de la maladie continue par augmenter et se rapprocher de 18% (80).

2.2.5. Pathogénie de la tuberculose bovine

2.2.5.1. Conditions de l'infection

2.2.5.1.1. Conditions qualitatives

Elles dépendent de deux types de facteurs :

- Les facteurs tenant au pouvoir pathogène du bacille (la virulence) dépendent d'abord de l'espèce elle même. Ainsi, l'infection par le bacille aviaire détermine des lésions peu étendues, rarement caséifiées, évoluant rapidement vers la sclérose contrairement à celles dues au bacille bovin. La souche aviaire est à l'origine des lésions riches en bacilles: ce désaccord entre le grand nombre de bacilles et leur action cytopathogène faible serait dû à leur faible toxicité. Les bacilles peu pathogènes déterminent une tuberculose localisée, souvent limitée au complexe primaire. Ils provoquent plutôt l'apparition des lésions folliculaires, alors que les bacilles très virulents induisent des lésions exsudatives. Cependant, quand bien même une exposition préalable de l'animal à la souche aviaire (*M. avium*) peut lui conférer un certain degré de protection contre la souche bovine (*M. bovis*), celle-ci peut masquer le diagnostic de l'agent causal de la TBB, même lorsque des antigènes spécifiques sont utilisés à cette fin (59). Ceci a pour conséquence la dissémination de la maladie dans le cheptel.
- Les facteurs tenant à la réceptivité et la sensibilité de l'hôte sont surtout; l'espèce animale hôte elle même, son âge, son état général, les facteurs tissulaires locaux ainsi que les facteurs environnementaux.

Pour Francis (49), la susceptibilité du bétail à la TBB dépendait de la dose ainsi que de la voie d'infection avec peu d'influence venant des autres facteurs tels que le profile génétique de l'hôte et son état nutritionnel. Ce dernier affecte beaucoup plus l'aptitude de la réponse immunitaire à médiateurs cellulaires. La résistance naturelle du bétail à la tuberculose a été habituellement attribuée

à la race Zébu (*Bos indicus*) et son importance dans les pays développés a été largement peu considérée (96). L'impact du génotype de l'animal hôte sur la résistance (ou la susceptibilité) aux bactéries intracellulaires y compris *M. bovis* BCG a été identifié et profondément étudié chez les souris où la résistance en question était liée au gène *Bcg* (79) et plus tard rapporté au gène *Nramp1* (13). Chez le bovin, les gènes homologues du *Nramp1* ont été identifiés (48) mais très peu d'investigations ont été faites en ce qui concerne leurs rôles dans le contrôle de l'infection par les mycobactéries. Il a été aussi constaté que les petits ruminants sont moins sensibles au *M. bovis* que les bovins (11). Les lésions dues à ce dernier, sont plus fréquentes et plus graves chez les jeunes ou chez les animaux âgés que chez les adultes (11).

Par ailleurs, il a été démontré que la hausse de l'incidence de la TBB était proportionnelle à celle de l'âge de l'animal (103).

La structure du tissu, la richesse de la vascularisation et du système macrophage locale, interviennent dans la morphologie des lésions: les lésions exsudatives sont plus fréquentes et plus sévères dans les tissus lâches (poumons) et les cavités préformées (séreuses). L'existence des lésions préexistantes (lésions pulmonaires, lésions mammaires, lésions locales liées à l'injection de produits irritants...) peut favoriser l'implantation du bacille tuberculeux.

Les facteurs environnementaux (externes) entraînant une diminution de l'état général tels que, les carences, les déficits nutritionnels, le stress chez les animaux ainsi que les conditions d'élevage (extensif ou transhumant), pourraient réduire considérablement la résistance de ces derniers à l'agent causal de la tuberculose (101). Ils augmentent plutôt la sensibilité de l'hôte au bacille tuberculeux. Des contacts ultérieurs avec d'autres organismes infectieux provenant du milieu extérieur peuvent affecter la résistance du bétail au *M. bovis*. On pourrait s'attendre d'une part que l'exposition aux mycobactéries environnementales pourrait à travers l'induction des réponses immunitaires aux antigènes ordinaires fournir un certain degré de protection acquise contre la tuberculose (115). D'autre part, il a été aussi démontré que des infections causées par l'agent viral de la diarrhée bovine ont un effet immunosuppresseur en ce qui concerne la résistance à la tuberculose (105). Toutefois, ces contacts avec les agents environnementaux, ne restent pas sans effet sur la mise en évidence de la TBB par des diagnostics *in vivo* tel que l'IDC.

2.2.5.1.2. Conditions quantitatives

Elles tiennent à la dose et à la répétition des doses de bacille:

- Des infections expérimentales effectuées sur le bétail avec du *M. bovis*, ont prouvé l'importance de l'effet et de la magnitude de celui-ci en terme du nombre de mycobactéries et de dose seuil (101). La dose étant le nombre de particules infectieuses. La dose minimale est variable selon l'espèce inoculée et l'importance de son action pathogène dépend de sa voie de pénétration. Ainsi, par voie cutanée, il

faut 5 à 10 bacilles viables pour infecter un cobaye (11). Par contre chez les ovins il en faut plusieurs milliers. Chez les bovins, il en faut quelques centaines. Toutefois, il a été montré que, le seul concept généralement accepté, est que l'infection à *M. bovis* peut être établie chez le bétail par inhalation d'un seul bacille contenu dans un aérosol (90). Une dose infectieuse relativement importante de *M. bovis* administrée par voie nasale se suit d'une infection qui progresse généralement vers la forme extensive de la maladie chez le bétail. Par ailleurs, la dose du *M. bovis* influence également sur la réponse immunitaire de l'animal hôte. Une dose seuil élevée provoque une réponse immunitaire à médiateur cellulaire se développant en quelques semaines, ainsi que l'apparition des anticorps anti-*M. bovis* circulant (101). Une faible dose seuil, provoque quant à elle un développement graduel de l'immunité à médiateur cellulaire, et peu ou pas du tout, l'apparition d'anticorps (101).

- Alors que l'inoculation d'une dose unique de bacilles tuberculeux peut n'entraîner que des lésions bénignes évoluant vers la stabilisation, des doses plus faibles mais répétées dans le temps, loin de susciter le développement d'une immunité, favorise l'apparition d'une tuberculose évolutive (11).

2.2.5.2. Les étapes de l'infection

Lorsque toutes les conditions sont réunies, l'infection peut progresser et il est possible de différencier schématiquement le déroulement de la tuberculose en deux étapes : l'étape primaire (primo-infection) et l'étape secondaire.

2.2.5.2.1. Étape primaire ou primo-infection

Après la pénétration dans l'organisme, les bacilles tuberculeux sont rapidement phagocytés par les macrophages. Une partie est détruite ; l'autre se multiplie dans les cellules qui les ont phagocytés. Ce qui entraîne la libération locale d'antigène d'où l'hypersensibilité spécifique des protéines, qui est la conséquence, le premier signe diagnostique de l'infection tuberculeuse. La multiplication locale des bacilles conduit en 8 à 15 jours à la formation d'une lésion initiale appelée le Chancre d'inoculation. Cette lésion se double, à la faveur du drainage lymphatique des bacilles, d'une lésion tuberculeuse du nœud lymphatique loco-régional (loi de l'adénopathie régionale de PARROT). L'association Chancre d'inoculation plus (+) adénopathie satellites constitue le complexe primaire dont la localisation révèle la porte d'entrée de l'agent infectieux: pulmonaire dans 95% des cas chez les bovins et les autres ruminants, digestifs chez les porcs et les volailles, et à part égale entre ces deux voies pour les carnivores (11).

2.2.5.2.2. Tuberculose secondaire

Elle résulte d'une prolifération de proche en proche des lésions, qui sont groupées dans un seul organe: la tuberculose chronique d'organe. Les lésions les plus souvent caséuses, peuvent s'ouvrir

sur une voie de drainage. C'est la forme ouverte de la tuberculose. Elle peut se stabiliser ou se généraliser.

2.2.5.3. Réaction de l'organisme infecté

2.2.5.3.1. Le développement d'une immunité exclusivement cellulaire

La réaction d'un organisme infecté par le bacille tuberculeux se manifeste par une mobilité accrue des macrophages, une plus grande activité de phagocytose et une capacité accrue de lyser les corps bactériens phagocytés. Cette réaction est toutefois relative et vaincue à la suite d'une atteinte de l'état générale ou des réinfections massives ou répétées. En effet, des études récentes, faites sur les réactions immunitaires induites par l'agent causal de la TBB ont suggéré qu'il y aurait un balancement de la dominance des cellules T helper de type 1 (Th1) vers la réponse immunitaire induite par les cellules T helper de type 2 (Th2), et l'arrêt de la réponse immunitaire à médiateur cellulaire serait progressivement suivi de la prédominance de la réponse immunitaire humorale (84).

Le *M. bovis* est une mycobactérie intracellulaire pathogène pour les macrophages et autres cellules de type monocyte. Quand bien même le diagnostic de plusieurs autres maladies infectieuses des animaux se repose sur la détection de la réponse immunitaire humorale (les anticorps) de l'agent infectieux, la prédominante réponse immunitaire chez le bétail infecté par le *M. bovis* est de type cellulaire (mobilisation des lymphocytes T) (114). Cette réponse immunitaire à médiateur cellulaire est en même temps un mécanisme de défense et souvent, elle est aussi à l'origine d'une inflammation chronique (les granulomes), caractéristique des infections à *M. bovis* (106). L'examen immunohistologique des premières lésions (granulomes) induites par une infection expérimentale de *M. bovis* chez le bétail, a montré que les lymphocytes-T sont parmi les premières cellules impliquées dans le mécanisme réactionnel (19). Ce qui démontre l'importance de la réponse immunitaire à médiateur cellulaire dans l'infection tuberculeuse. Ces observations ont conduit les récentes études à mener des recherches beaucoup plus approfondies sur l'implication rapide de la réponse immunitaire à médiateurs cellulaires dans l'infection tuberculeuse (104).

En effet, il a été montré que tous le sous groupe de lymphocyte-T ($\gamma\delta$ cellules-T, CD4 et CD8 $\alpha\beta$ cellules-T) est impliqué dans la réponse immunitaire anti-mycobactérienne chez le bétail (104). L'étude de la dynamique de circulation de ce sous-groupe de cellules chez le bétail infecté expérimentalement par le *M. bovis* a révélé une implication séquentielle des $\gamma\delta$ cellules-T, suivies des CD4, et plus tard d'une prédominance des CD8 (102). L'instauration de la réponse immunitaire de type Th1 est d'une importance particulière en ce qui concerne la défense contre les pathogènes intracellulaire et est caractérisée par la production de l'interféron gamma (IFN - γ), réputés essentiels pour l'activation de la voie microbicides des macrophages. Dans l'infection du bétail par le *M. bovis*, les cellules-T CD4 semblent être les plus dominantes dans la production des IFN- γ menant à

l'activation du pouvoir anti-mycobactérienne des macrophages tandis que les cellules-T CD8 sont plutôt impliquées dans la lyse des macrophages infectés (124). Les $\gamma\delta$ cellules-T sont également une source potentielle de IFN- γ sauf que la quantité est inférieure à celle produite par les cellules-T CD4 (126). Il est aussi évident que les $\gamma\delta$ cellules-T jouent un rôle de liaison entre les systèmes immunitaires inné et adaptative (72).

2.2.5.3.2. Le développement de l'hypersensibilité retardée ou hypersensibilité de type IV

Elle est une réaction d'infiltration cellulaire (lymphocytaire) dont la forme clinique la plus classique est l'eczéma avec une infiltration épidermique se manifestant par un érythème avec œdème et prurit. Dans l'hypersensibilité à médiation cellulaire, ce sont des lymphocytes T qui, par les récepteurs spécifiques de leur membrane cytoplasmique, assurent la reconnaissance de l'antigène et la spécificité de la réaction (*Figure 2.6*). Ces lymphocytes T circulent constamment dans les tissus à partir du sang pour traverser les ganglions lymphatiques et rejoindre la circulation sanguine par les vaisseaux lymphatiques. Lorsqu'ils rencontrent l'antigène au niveau d'un tissu, en présence de cellules accessoires (cellules interstitielles présentant l'antigène), ils sont activés et libèrent une série de lymphokines, substances agissant sur différentes catégories de cellules.

Le facteur d'inhibition de la migration des macrophages ou MIF est produit in vitro après incubation des lymphocytes d'un cobaye sensibilisé en présence de l'antigène spécifique. Le surnageant de ces cultures inhibe la migration des macrophages d'un cobaye non sensibilisé hors d'un tube capillaire. La production de MIF implique la reconnaissance spécifique de l'antigène par les cellules T, mais son action sur les macrophages est indépendante de l'antigène.

Le MIF n'est pas encore parfaitement caractérisé; il s'agit d'une ou de plusieurs glycoprotéines acides, de poids moléculaire de 20 000 à 55 000 daltons. Plusieurs catégories de lymphokines interviennent dans la réaction d'hypersensibilité retardée (*Figure 2.6*):

- des lymphokines actives présentes sur l'endothélium vasculaire (« skin reactive factor »), qui augmente la perméabilité capillaire;
- des lymphokines chimiotactiques provoquant l'attraction des monocytes, puis des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles;
- des lymphokines provoquant l'immobilisation et l'activation des macrophages (MAF), celles des polynucléaire (LIF), des ostéoclastes (OAF), l'activation des cellules NK (Interphéron), la multiplication et la différenciation des lymphocytes T cytotoxiques (Interleukine-2 ou TCGF) ou en fin la lyse de certaines cellules cibles (lymphotoxines).

En suite, interviennent les lymphokines régulatrices (facteurs suppresseurs) qui limitent la réaction.

Parallèlement aux lymphokines produites par les lymphocytes activés, différents médiateurs issus des macrophages et des monocytes, les monokines participent à la réaction. Les prostaglandines, notamment la PGE₂, ont une activité inflammatoire mais induisent en outre la différenciation des

cellules T suppressives. L'interleukine-1 stimule les lymphocytes T en provoquant notamment l'expression des récepteurs pour l'interleukine-2; elle agit sur les centres thermorégulateurs pour déclencher la fièvre et stimule la production d'une protéine de l'inflammation, la protéine C-réactive, par les hépatocytes.

L'hypersensibilité retardée peut être révélée chez le bovin par injection de bacilles (vivants ou morts) ou mieux encore d'extrait bacillaires appelés tuberculine.

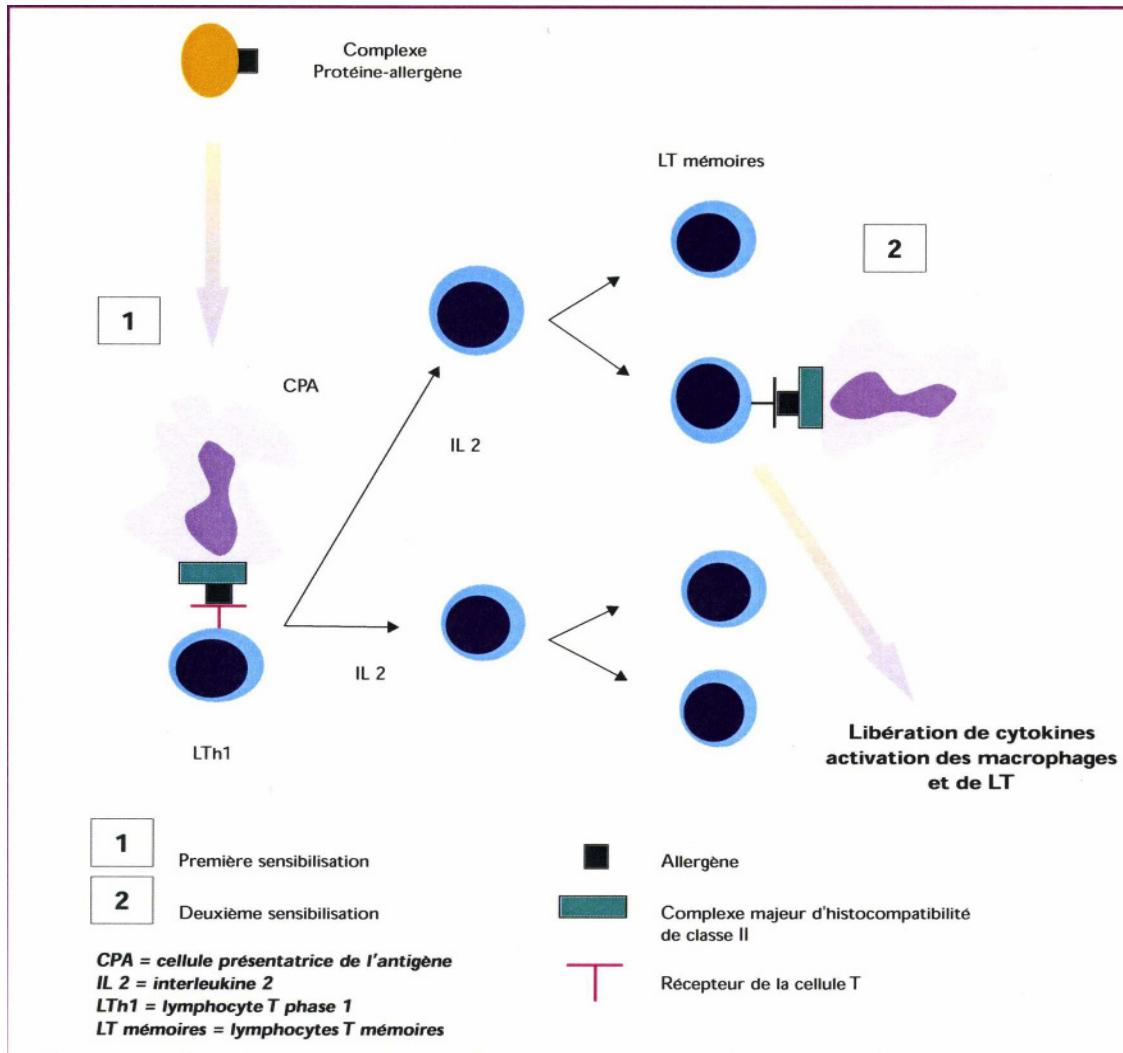


Figure 2.6: Mécanisme de l'hypersensibilité retardé (44).

2.2.5.3.3. Apparition d'anticorps anti *M. bovis*

Les anticorps apparaissent plus tardivement après l'hypersensibilité retardée. Ils seraient surtout les témoins d'une tuberculose active. Ils présentent des fluctuations plus ou moins importantes rendant très relatives le diagnostic sérologique. En plus, ils manquent de spécificité. Toutefois, il a été montré que chez les animaux présentant un état généralisé de la maladie, le titre d'anticorps sériques est

élevé (77). Par ailleurs, des analyses plus poussées sur l'équilibre immunitaire chez le bétail infecté par le *M. bovis*, ont également révélé un lien entre l'évolution de la pathologie et l'éminente profile immunitaire Th0 (IFN- γ et la réponse d'IgG1) (104). Chez ces animaux, le développement d'anticorps anti mycobactérienne par les cellules de type B (Isotype partiel d'IgG1) correspond au développement de la pathologie (104). Il a été aussi montré que le taux d'isotype IgG1 anti-*M. bovis* est proportionnel à l'importance des lésions tuberculeuses alors qu'il n'existe aucune relation entre ces dernières et la réponse immunitaire à médiateur cellulaire (84).

2.2.6. Les symptômes de la tuberculose bovine

La tuberculose est le type de maladie à évolution chronique. L'évolution lente et progressive s'étend sur des mois et des années. Des poussées aiguës peuvent néanmoins survenir et accélérer l'évolution tout en l'aggravant. Les formes cliniques silencieuses sont fréquentes : il y a plus d'infectés que de malades. Dans les espèces humaine et bovine, l'état de « tuberculose-infection » peut persister pendant des années, voire toute la vie. Dans les autres espèces (porc, cheval, carnivores, oiseaux), l'infection tuberculeuse engendre normalement la maladie en quelques mois. Cependant, la tuberculose maladie présente les particularités suivantes :

- Il existe une grande variété des aspects cliniques en ce sens que tous les tissus et les organes peuvent être intéressés par le processus (les localisations sont plus ou moins fréquentes selon l'espèce et le mode de contamination).
- Les manifestations cliniques sont peu caractéristiques, en dehors de quelques localisations particulières. En fin d'évolution, elles vont de paire avec une atteinte importante de l'état général dominée par l'amaigrissement des animaux.
- Il y a un défaut de corrélation entre l'intensité des manifestations observées.

Ces quelques considérations suffisent à rendre compte des difficultés du diagnostic clinique. Ce qui nécessite de recourir à des moyens expérimentaux pour palier les insuffisances du diagnostic clinique.

2.2.7. Les lésions

Elles sont soit localisées et bien délimitées, ce sont des tubercules; soit étendues et mal délimitées; il s'agit là des infiltrations et des épanchements tuberculeux. La lésion microscopique la plus représentative, considérée comme « spécifique » est le follicule tuberculeux constitué :

- d'un centre nécrotique homogène appelé caséum,
- d'une première couronne de cellules (histiocytes et macrophages),
- d'une seconde couronne purement lymphocytaire.

L'évolution de cette lésion peut se réaliser dans le sens d'une calcification du caséum, avec une fibrose périphérique (*Figure 2.7*).



Figure 2.7: Section transversale d'une lésion ganglionnaire caséifiée par le bacille tuberculeux (Photo Ngandolo 2006).

2.2.8. Diagnostic de la tuberculose bovine

2.2.8.1. Diagnostic ante mortem

Il est important de noter que le bétail infecté reste longtemps infectieux avant qu'il n'expose certains signes cliniques ou des lésions typiques de la TBB pouvant être détectées par des agents vétérinaires plus attentifs. Même étant présents, les signes cliniques de la tuberculose chez le bétail ne sont pas pathognomoniques. Les surveillances ante mortem de la TBB les plus efficaces doivent principalement s'appuyer sur la détection du bétail infecté pendant le stade précoce en utilisant les tests d'immunodiagnostic (36). Ces tests peuvent être effectués en *in vivo* ou *in vitro*.

2.2.8.1.1. Les tests *In Vivo*

La politique adoptée pour le contrôle de la TBB en ante mortem (et *in vivo*) par bon nombre d'institutions internationales (OIE, FAO) et des pays à haute activité d'élevage, est la mise en évidence des troupeaux infectés par l'évaluation de la réponse de l'hypersensibilité de type retardée à l'inoculation intradermique des dérivées protéiques purifiées extraites des surnageants de culture de

mycobactéries, appelées tuberculines. Snider (127), Monaghan *et Coll.*, (85), puis Kaufman et Shaible (68) ont successivement détaillé les progrès scientifiques qui ont conduit à la mise au point de la tuberculine; d'abord en tant qu'un possible vaccin contre la tuberculose chez l'homme et plus tard comme un outil de diagnostic en médecine humaine et vétérinaire. En effet, l'extrait de glycérol issu de liquides des cultures pures mise en évidence par Robert Koch en 1890 a été raffiné au fil des ans et de nos jours, il est connu sous l'appellation du PPD (pour Purified Protein Derivatives) (68). C'est un complexe Eau-Fraction soluble obtenu à partir des produits traités à la chaleur et issus de la lyse d'isolat de *M. bovis* (36). La tuberculine bovine actuellement utilisée dans les pays membres de l'Union Européenne et au Royaume Unis est une préparation de la souche *M. bovis* AN5 isolée en Angleterre en 1948 (61). De même, la tuberculine aviaire a été obtenue à partir de la culture d'une souche spécifique aviaire; le *M. avium* (36). Ainsi, lors que la tuberculine est injectée à un animal dont le système immunitaire a été sensibilisé par une infection de *M. bovis* ou par l'exposition d'une réaction croisée entre antigènes, ceci déclenche une réponse inflammatoire locale au niveau du site d'injection qui atteint sa plus grande intensité post injection entre 48 à 72 heures, et en suite diminue très rapidement (100).

Dans sa forme la plus simple, le test cutané est effectué en injectant un petit volume de la tuberculine bovine dans la peau de l'animal. Approximativement 72 heures après cette injection, le site d'injection est palpé et examiné afin de mettre en évidence une éventuelle inflammation. Il s'agit dans ce cas de l'Intradermotuberculation simple ou unique (IDS) et peut être appliqué dans la peau de la région cervicale moyenne (IDS cervicale) ou dans la base de la queue (IDS caudale) (36). Lorsque l'IDS caudale est utilisée, en plus de la palpation subjective et l'observation visuelle du site d'injection, l'épaisseur du pli cutané est mesurée à l'aide d'un pied à coulisse au millimètre près, juste avant l'injection de la tuberculine et 72 heures plus tard (36). Le principe de l'IDS chez le bétail est ainsi similaire au test intra cutané mis au point en 1908 par le médecin Français Charles Mantoux pour le diagnostic de l'infection à *M. tuberculosis* chez l'homme (127).

L'Intradermotuberculation comparative (IDC) nécessite beaucoup plus de temps du fait de l'injection simultanée des tuberculines bovine et aviaire respectivement aux deux côtés du cou de l'animal. L'interprétation des résultats de l'IDC est basée sur l'observation du fait que les animaux infectés par le *M. bovis* tendent à montrer une plus grande réaction à la tuberculine bovine qu'à la tuberculine aviaire, considérant que les infections avec les autres mycobactéries peuvent provoquer une relation inverse (100). Par conséquent, ce test permet de faire une meilleure discrimination entre les animaux infectés par le *M. bovis* et ceux précédemment sensibilisés par une exposition aux mycobactéries environnementales non pathogènes que l'IDS (85).

Cependant le type de test cutané à choisir dépend généralement de la prévalence de la TBB proprement dite et de la prévalence d'exposition aux autres sensibilisants tels que les mycobactéries environnementales (85). En effet, la précision d'un test de diagnostic est la relation qui existe entre la

sensibilité et la spécificité, pouvant ainsi déterminer la proportion des faux positifs et des faux négatifs (36). Parmi les tests actuellement disponibles pour le diagnostic de la TBB, aucun ne permet la détermination précise en ante mortem du *M. bovis* chez le bétail (36). Bien que divers facteurs puissent influencer la sensibilité et la spécificité des tests intra dermiques, ces derniers demeurent les outils primaires du diagnostic ante mortem du *M. bovis* chez le bétail (36). Toutefois, quand bien même, ces tests ont permis de réduire l'incidence de la TBB dans les pays industrialisés où le contrôle de la maladie a été rigoureusement observé, une faible proportion des cas continue par y être enregistrée. Pour ce faire, plusieurs études ont été menées en ce qui concerne les limites du test de tuberculation et ont montré que certains stades du développement de la maladie nécessiteraient des tests plus spécifiques. Ce qui a conduit la mise au point d'autres techniques de diagnostic plus sensibles et spécifiques pouvant détecter les différentes phases de l'évolution de la maladie. Afin d'améliorer la détection du bétail infecté par le *M. bovis* et de réduire le nombre des troupeaux assainis comme faux positifs, il a été mis au point en plus des tests de tuberculation (précisément l'IDC), des tests de diagnostic *in vitro* qui pourraient être employés à des circonstances définies et suivant la situation sanitaire vétérinaire dans chaque pays ou région à l'exemple des tests de l'immunité cellulaire (IFN- γ et Imphocyte) et de l'immunité humorale comme le Floerescence Polyrization Assay (FPA). Il s'agit des tests réalisés surtout en *In Vitro*. Par ailleurs, il faut aussi noter que le contrôle et l'éradication de la TBB dépend dans une certaine mesure de la qualification et de l'expérience de la personne conduisant le test de dépistage sur l'animal vivant (135).

2.2.8.1.2. Les tests *In Vitro*

Le test de l'IFN- γ est un test *in vitro* mis au point pour la première fois en Australie vers la fin des années 1980 afin de diagnostiquer la TBB chez le bétail en combinaison avec le test intradermique simple (SIT pour Single Intradermal Test) couramment utilisé en pli caudal (140). Avec le temps, le test IFN- γ a été optimisé, validé et approuvé comme une méthode de diagnostic officielle en Australie (29) ainsi qu'en Nouvelle Zélande, vers la fin des années 1990. De nos jours, le test IFN- γ a été approuvé dans toute l'Union Européenne et utilisé en combinaison avec le test IDC (36). D'une part, ce test a été approuvé afin d'améliorer l'entière probabilité de détecter le bétail tuberculeux (sensibilité) dans des régions ou dans des troupeaux à haute incidence de tuberculose, en isolant les animaux qui sont diagnostiqués positifs par l'une des deux tests (139). D'autre part, pour augmenter l'entière spécificité du test durant les dernières phases d'une campagne d'éradication dans une zone à faible incidence de la tuberculose, ou dans une région à haute incidence d'animaux montrant une sensibilité non spécifique à la TBB, en isolant des animaux qui se montrent positifs aux deux tests (36).

Le test IFN- γ est effectué en *in vitro*, en deux étapes (*Figure 2.8*). D'abord, les échantillons sanguins héparinisés collectés sur le terrain sont immédiatement acheminés au laboratoire, où dans les 28

heures qui suivent la collecte, le surnageant du plasma sera collecté après l'incubation de l'échantillon sanguin à 37°C pendant 16 à 24 heures en présence des antigènes (PPD bovine et PPD aviaire). Au cours de la seconde étape, le nombre de cytokines IFN- γ dans le plasma sera quantifié à l'aide d'un kit commercial de test ELISA (pour Enzyme-linked Immunosorbent Assay). L'IFN- γ étant une cytokine majoritairement libérée par les lymphocytes T après la stimulation antigénique. Il joue un rôle important dans les réponses immunitaires aux mycobactéries tuberculeuses en tant que agent d'activation principale des macrophages. Le kit commercial du test IFN- γ actuellement approuvé par l'OIE comme test auxiliaire qui permet de confirmer ou d'infirmer les résultats d'un test cutané intradermique est le BOVIGAM[®].

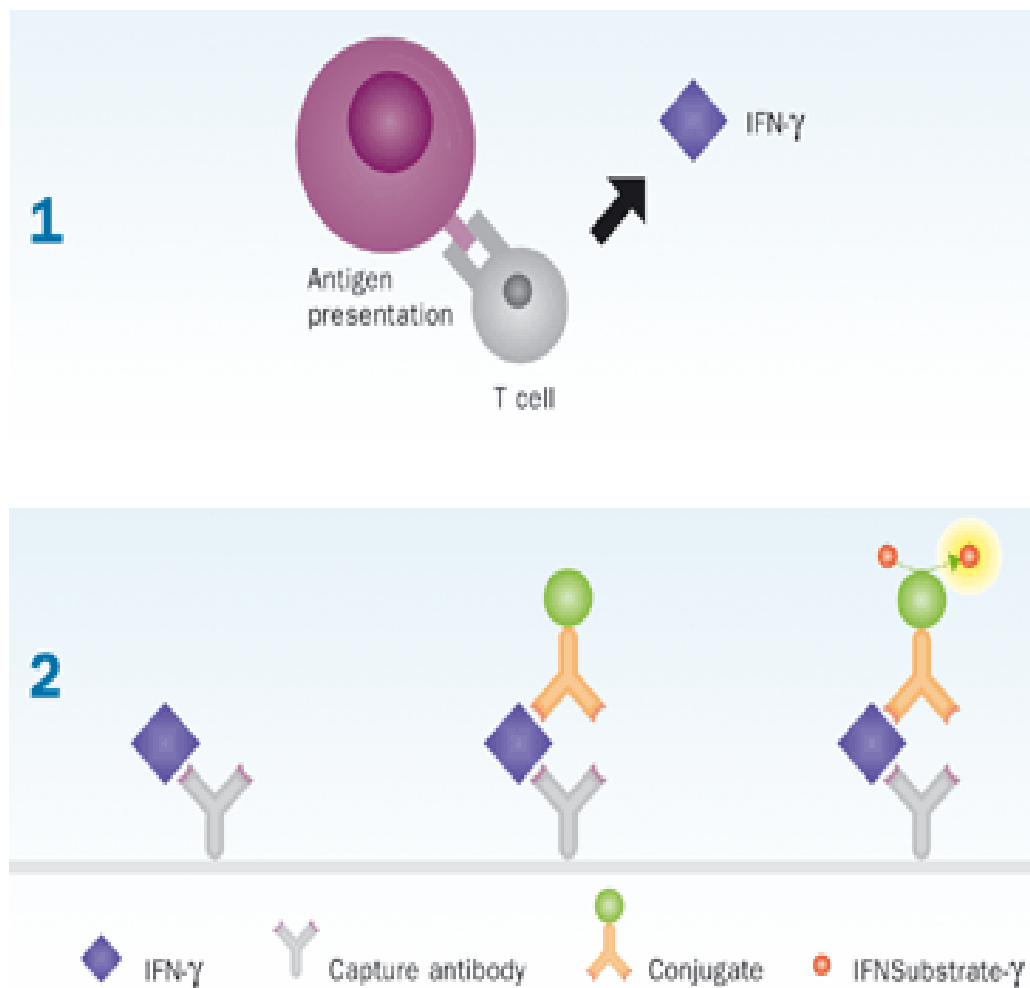


Figure 2.8: Les étapes principales du test IFN - γ (source: [http://www.prionics.com/fileadmin/user_upload/downloads_and_prints/TB leaflet 03.pdf](http://www.prionics.com/fileadmin/user_upload/downloads_and_prints/TB_leaflet_03.pdf)).

2.2.8.2. Diagnostic post mortem

2.2.8.2.1. Inspection d'abattoir

La TBB se caractérise par le développement de tubercules dans les organes de la plus part des espèces. Les lésions dues à la TBB peuvent être classées en lésions miliaires aiguës, lésions nodulaires et tuberculose chronique des organes. Chez les bovins, les lésions caractéristiques de la tuberculose aviaire se trouvent, en général, dans les ganglions lymphatiques mésentériques. La carcasse d'un animal atteint de tuberculose nécessite une inspection post mortem supplémentaire des ganglions lymphatiques, des articulations, des os et des méninges. En effet, il est conseillé de suivre les recommandations de jugement du Codex Alimentarius¹ concernant les carcasses de bovins et de buffles. Ainsi, les carcasses sont saisies:

¹ Codex Alimentarius: Organe commun à la FAO et à l'OMS.

- lorsqu'un plan d'éradication a pris fin ou dans les cas d'infection résiduelle ou de réinfections,
- dans les derniers stades d'éradication, lorsque la prévalence naturelle est basse,
- lors des premiers stades d'éradication dans les zones à fortes prévalence.

La carcasse d'un animal positif à l'inspection ante mortem mais qui ne présente pas de lésion à l'inspection d'abattoir, peut être acceptée pour une distribution restreinte. Si la situation économique du pays le permet, cette carcasse devrait être détruite. Le traitement à la chaleur est conseillé au cours des premières et des dernières étapes d'un programme d'éradication: dans les régions à faible et forte prévalence, lorsqu'un ou plusieurs organes sont touchés et lorsque l'on n'observe pas de lésions miliaires, signes d'une généralisation ou d'une diffusion hématogène récente. Si la situation économique du pays le permet, la carcasse est donc saisie. Dans certain pays, la carcasse est acceptée si les lésions inactives sont observées (calcifiées et / ou encapsulées) dans les organes sans généralisation aux ganglions lymphatiques de la carcasse.

Au Tchad, où aucun programme de lutte contre la TBB n'est mise sur pied, l'Article N°10 de la loi N°9 /04/PR du 19 mai 2004 relative à l'hygiène sanitaire des sous produits animaux, autorise l'abattage des animaux malades ou contaminés. Cependant, les suivis aux abattoirs et aires d'abattage ne permettent qu'une élimination infime des carcasses infectées, car beaucoup d'abattages se font de manière clandestine (39). Lors de la découverte des lésions évocatrices de la tuberculose, la décision de la saisie est fonction de la localisation et de la nature des lésions:

- la saisie est dite partielle, lors de la localisation unique: cette saisie concerne alors l'organe atteint et les nœuds lymphatiques associés,
- la saisie est dite totale, lors de localisations multiples ou lors de lésions caractéristiques de formes de généralisation (tuberculose miliaire).

Toutefois, chez l'animal mort, ni les lésions post-mortem, ni les résultats histopathologiques ne sont pathognomoniques de la TBB. Même, à partir des lésions visibles typiques de tuberculose, il n'est pas toujours possible d'obtenir des cultures de *M. bovis*. Ainsi, dans une étude effectuée au Soudan, sur 120 lésions suspectées de TBB dans les abattoirs de Khartoum, Gedarif et Kassala, 64 lésions (53,3%) ont été confirmées par le Ziehl Neelsen (présence des BAAR sur les lames colorées), et après culture sur milieux Löwenstein Jensen, la biologie moléculaire n'a pu mettre en évidence que 25 souches de *M. bovis* (46%) (128). Par ailleurs, les animaux qui ne présentent pas de lésion post-mortem, évidente de la tuberculose peuvent aussi être infectés (35). En Ethiopie par exemple, des travaux conduits par Teklu *et Coll.*, (131), ont permis de prouver que le *M. bovis* peut être isolé sur une carcasse ne présentant aucune lésion tuberculeuse. Quand bien même les autres techniques de diagnostic restent indispensables en ce qui concerne la mise en évidence de l'agent infectieux, responsable de la TBB, l'isolement et l'identification reste le diagnostic définitif: la culture bactérienne est donc le test de référence (37). La découverte de lésions macroscopiques évocatrices de la TBB ne constitue en matière de santé animale qu'une suspicion de l'infection qui doit être validée par le

laboratoire sauf dans le cas d'une exploitation déjà considérée comme infectée de tuberculose avérée. Il s'agit donc de confirmer expérimentalement l'existence de la maladie et d'effectuer l'identification des souches à toutes fins épidémiologiques utiles.

2.2.8.2.2. La culture des mycobactéries

Les colonies issues de la culture sur milieu spécifique sont d'abord confirmées par la méthode de coloration de Ziehl Neelsen (45) ou à l'Auramine (30) suivie d'une lecture au microscope photonique avant de subir d'autres analyses plus appropriées. Cependant, pour Griffin et coll., (52), la culture de *M. bovis* à partir de prélèvements du terrain est spécifique à 100% mais que sa sensibilité varie considérablement selon les laboratoires. A cela, il faut également ajouter les conditions de transport des prélèvements depuis le terrain jusqu'au laboratoire ainsi que leurs conditions de conservation avant le diagnostic.

En effet, en ce qui concerne la sensibilité des méthodes de culture des mycobactéries, outre les conditions de transport et de conservation, elle dépend également d'autres facteurs tels que l'environnement de travail, l'expertise du staff technique (manipulation) ainsi que la sensibilité des produits et des réactifs impliqués dans le processus de la mise en culture (Contrôle de qualité). Par exemple, les contaminations dues à la flore globale ou aux bactéries environnementales pourraient être liées aux conditions d'hygiène au laboratoire et d'asepsie de l'environnement de travail lui-même. Au cours du processus de décontamination d'un prélèvement (juste avant sa mise en culture) une concentration très élevée d'hydroxyde de sodium (NaOH) pourrait affecter négativement le résultat de la culture en tuant les bacilles.

Le rendement de la culture dépend aussi du type et de la qualité du milieu de culture utilisé. Les milieux à base d'œuf tel que le Löwenstein Jensen ont été utilisés durant des décennies pour la culture des mycobactéries sauf qu'il présente quelques inconvénients: en cas de contamination, toute la surface du milieu de culture est envahie (119) et aussi, il n'est pas conseillé pour les tests de sensibilités du fait de la concentration de certains antibiotiques qui pourrait être modifiée par l'effet de la chaleur lors de la solidification du dudit milieu. Toutefois, le milieu Löwenstein Jensen reste de nos jours un milieu fiable pour l'isolement primaire. Pour ce faire, dans certains laboratoires comme au Veterinary Laboratory Agency (VLA) de l'Angleterre, différents antibiotiques et antifongiques (Polymyxin B, Amphotericin B, Carbenicillin, Trimethoprim) sont additionnés au milieu Löwenstein Jensen afin de maximiser son rendement (culture sans contamination).

Suite aux recommandations du Centers of Disease Control and Prevention (CDC) des Etats-Unis, relatives à l'utilisation des milieux solides en association avec le milieu liquide afin de permettre un diagnostic rapide de la tuberculose, les suspensions liquides à base de Middlebrook 7H9 sont de plus en plus utilisées pour la culture des mycobactéries. En 1947, Dubos et Middlebrook avaient mis au point le milieu 7H9 qui contenait de l'albumine et de l'acide oléique et qui auraient pour spécificité

d'accélérer la croissance des bacilles tuberculeux et les protégeraient contre une variété d'agents toxiques (43). De nos jours, le bouillon Middlebrook (7H9) est utilisé pour la culture, l'isolement et la conservation des espèces appartenant au genre *Mycobacterium*. Le MGIT (pour *Mycobacteria Growth Indicator Tube*) est un milieu liquide conservé dans un tube spécifique qui contient 7 ml du bouillon de base (Middlebrook 7H9) auquel on y a ajouté de l'OADC (pour *Oleic Acid Dextrose Catalase*) et un mélange d'antibiotiques et d'antifongiques (Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixic acid, Trimetoprim Azlocillin). En dehors du sang et de l'urine, tous les prélèvements (d'origine pulmonaire ou extra pulmonaire) peuvent être mis en culture primaire en milieu liquide MGIT conformément au protocole conventionnel (119). Le principe de détection de la croissance des mycobactéries inoculées sur le milieu contenu dans le tube MGIT est basé sur la lecture de cette croissance par le système automate, le BACTEC™ MIGIT™ 960. Le BBL MGIT tube par exemple utilise la technologie de fluorescence pour augmenter l'aisance et la vitesse de lecture des résultats. En utilisant une source de lumière ultraviolette, la lecture des tubes se fait de façon journalière et les tests positifs émettent une vive fluorescence orange à la base du tube tandis que les tests négatifs en émettent faiblement ou pas du tout. Cependant, l'instauration de cette technique de diagnostic dans les pays en voie de développement nécessite de moyen financier important et bon nombre de laboratoires impliqués dans la recherche sur la tuberculose continuent par utiliser des méthodes anciennes ou bien adaptent les nouvelles technologies aux conditions locales de travail.

Au LRVZ de Farcha, le milieu liquide utilisé pour la culture des prélèvements est une modification du MIGIT dans lequel, le tryptocasein soja est utilisé au détriment de peptone (39) et l'addition de la glycérine ou du pyruvate à ce milieu de culture favorise respectivement la croissance de *M. tuberculosis* et de *M. bovis* (74). Cependant, l'incubation se fait à l'étuve ordinaire et la lecture visuelle se fait hebdomadairement, par la mise en évidence d'une turbidité observée dans le milieu de culture. La mise en évidence des BAAR contenus dans la culture turbide se fait après coloration du Ziehl Neelsen par la lecture des frottis au microscope photonique, sous immersion et à l'objectif x100 avant l'identification et la caractérisation des souches par les méthodes biochimiques ou par les techniques de la biologie moléculaire.

2.2.8.2.3. Les Tests Biochimiques

Les mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* sont classiquement identifiés par la morphologie des colonies sur milieu solide et des tests biochimiques, aux quels on y a ajouté plus récemment les tests de résistance aux antituberculeux (Tableau 2.1). Les tests biochimiques nécessitent une culture suffisamment abondante et d'une durée d'au mois deux à trois semaines et durent assez longtemps, à l'exemple du test de la réduction du nitrate ou de production de la niacine dans le cas de la mise en évidence du *M. bovis* (138). De nos jours, plusieurs techniques d'analyse de l'ADN offrent une méthode rapide de détermination de l'identité des isolats et peuvent aussi fournir des informations de typage moléculaire sur l'isolat qui est de valeur épidémiologique.

2.2.8.2.4. Les techniques de la biologie moléculaire

En santé publique, les facteurs clés de contrôle de la tuberculose sont une détection rapide des cas, une thérapie adéquate et un traçage de l'historique des différents contacts entre les sujets afin d'arrêter la retransmission ou la propagation de la maladie (14). Dans le domaine vétérinaire, le contrôle de la tuberculose repose sur le test et l'abattage, la notification, l'inspection post mortem et la surveillance à l'abattoir (31). La réussite des programmes d'éradication de la TBB repose sur un sens commun (et pluridisciplinaire) et une approche rationnelle (23). Cette dernière pourrait combiner l'utilisation judicieuse de nouvelles technologies et les progrès scientifiques tout en tenant compte de l'engagement et de la coopération des autorités compétentes. L'émergence des techniques de la biologie moléculaire dans la quasi-totalité des disciplines biologiques a marqué la fin du siècle dernier et le début du millénaire en cours. La biologie moléculaire regroupe un ensemble de techniques basées sur l'étude, la détection et la modification des acides nucléiques. Ainsi, d'éclatants succès tels que la détection rapide des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis*, la distinction entre les membres du complexe, la phylogénie du *M. bovis* depuis son ancêtre clonal le *M. tuberculosis* (Figure 2.9) ont marqué le domaine de la recherche sur la tuberculose.

Malgré les différents tropismes d'hôtes des différentes espèces membres du Complexe *M. tuberculosis*, ces derniers sont caractérisés par une grande similitude (99,9%) au niveau nucléotidique et pratiquement par des séquences 16SrARN identiques (125). La différenciation des souches isolées par la technique de RFLP (pour Restriction Fragment Length Polymorphism) a été prouvée être un outil très utile dans le cadre des études épidémiologiques de la tuberculose humaine (7). Les isolats issus du Complexe *M. tuberculosis* contiennent également 5 à 6 copies d'un second élément transposable, l'IS1081 (25). Entre 91 et 98% des isolats de *M. bovis* testés présentent le même fragment IS1081 que ceux identifiés chez la plus part des souches *M. tuberculosis* testées (24). Les différences entre les modèles dépendent uniquement de la taille de l'un des 6 fragments IS1081, montrant une rare transposition de ce dernier. Une infime hétérogénéité au niveau du site d'insertion dans le génome peut aussi être observée, entravant ainsi son utilité pour la caractérisation des isolats de *M. tuberculosis* (7).

D'autres éléments répétitifs ont été également utilisés dans le domaine de l'épidémiologie de la tuberculose. Ce sont les séquences PGRS (pour Polymorphic GC-rich repeat sequence) mise en évidence dans le Complexe *M. tuberculosis* et autres mycobactéries (116) et DR (pour Direct Repeat) (53). Ces éléments ont été utilisés pour sonder le locus *AluI*-digested sur les génomes d'ADN provenant du *M. tuberculosis* (118) et du *M. bovis* (134).

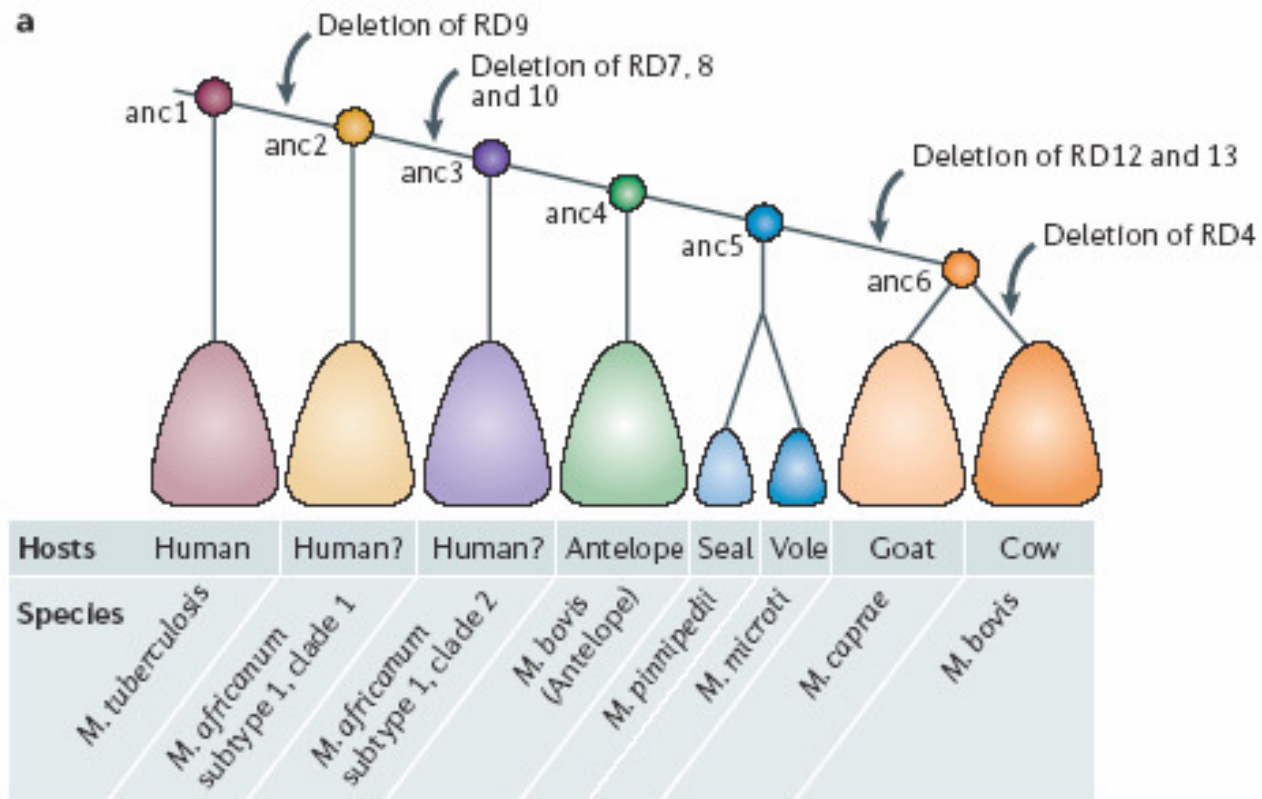


Figure 2.9: Phylogénie du *M. bovis* d'après Smith *et Coll.*, 2006

L'élément DR a été identifié par Hermans et *Coll.* (57), en 1991, au moment où ils faisaient la caractérisation de l'élément d'insertion *IS986* du *M. bovis* BCG et de l'ADN chromosomique accompagnant cet élément. Ces derniers cherchaient la différence entre l'*IS986* et l'*IS6110* afin d'expliquer l'apparente incapacité de transposition de l'*IS986*. Il a été aussi montré que l'élément d'insertion contenait un nombre important de régions DR de poids moléculaire 36 bp, entrecoupé de région d'ADN appelée "spacer" de taille comprise entre 35 et 41 bp. Le nombre total de copies de DR du *M. bovis* BCG déterminé, est de 49 et sont regroupées à une position unique sur le chromosome. Le 30^{ème} DR a été sectionné par l'insertion de l'*IS987*. Les DR sont irréversibles et sont exclusivement présents dans les isolats provenant du Complexe *M. tuberculosis*. L'analyse plus poussée du contenu de la région DR issue de différentes souches, a montré qu'elle est polymorphique en taille et en composition (57). Une région DR combinée à l'unique séquence de "spacer" adjacente est appelée "DVR" (pour Direct Variable Repeat) et est numérotée selon l'archétype des DVR du *M. bovis* BCG P3 (53). Lorsque les régions DR de plusieurs isolats sont comparées, il a été constaté que l'ordre des "spacers" a été le même pour tous les isolats. Cependant, les délétions et les insertions des DVR apparaissent. Le polymorphisme dans une variété d'isolats comprend l'absence ou la présence d'une ou de plusieurs DVR.

Le spoligotyping (Pour Spacer Oligonucleotide Typing) est la méthode de diagnostic la plus utilisée dans le domaine de l'épidémiologie moléculaire du *M. bovis* (125). Elle identifie les polymorphismes des "spacers" situés dans la région DR du chromosome. La position d'un "spacer" à l'intérieur de la région DR est constante par rapport aux autres "spacers" (136). Quarante trois "spacers" ont été sélectionnés des séquences de "spacers" provenant de *M. tuberculosis* M37Rv et de *M. bovis* BCG P3 et sont utilisés comme standard dans la caractérisation moléculaire des souches du complexe *M. tuberculosis* (66). La technique de Spoligotyping décrite par Kamerbeek *et Coll.*, (66), détecte la présence ou l'absence des "spacers" des séquences connues présents dans un isolat en deux étapes. Dans un premier temps, la méthode de PCR est utilisée pour amplifier les "spacers" compris entre les DR. L'amorce antisens utilisée est liée à la biotine de manière à ce que tous les brins complémentaires synthétisés soient également liés à cette dernière. Les "spacers" sont ainsi individuellement détectés par hybridation des produits PCR liés à la biotine contenant de "spacer", à la membrane à laquelle 37 oligonucléotides dérivés des "spacers" provenant du *M. tuberculosis* M37Rv et six "spacers" provenant du *M. bovis* BCG ont été liés de manière covalente. Des polymorphismes des motifs spoligotypes sont générés par manque de signal d'hybridation des "spacers".

Un autre élément très important dans le diagnostic moléculaire de l'espèce *M. bovis* est la délétion de la région RD4 (*Figure 2.9*) sur l'ADN du génome (15). En effet, le *M. bovis* se distingue du *M. tuberculosis* par l'absence de cette région d'ADN (*versus* RD9).

2.2.9. Le *M. bovis* et la résistance aux antituberculeux

Les recherches dans le domaine de la biologie moléculaire en ce qui concerne la multi résistance de la tuberculose aux antituberculeux usuels sont actuellement très avancées pour la souche *M. tuberculosis* communément isolée chez l'Homme. Les mécanismes de résistance aux antituberculeux de première ligne tels que la rifampicine, l'Isoniazide et la streptomycine, couramment rencontrés chez *M. tuberculosis* sont des mutations observées au niveau des gènes cibles (121). En effet, la tuberculose due à *M. bovis*, demeure une maladie infectieuse majeure chez le bétail et de ce fait, rend le contrôle des cas de flambés épidémiques et la prévention de la transmission à l'homme des souches *M. bovis* résistantes aux antituberculeux une mission obligatoire des services de la santé publique et ceux de l'hygiène vétérinaire.

L'une des caractéristiques du *M. bovis* est la résistance à la pyrazinamide (112). En outre, grâce à la technique de spoligotypage, il a été montré qu'il existe deux sous groupes de *M. bovis* en ce qui concerne la résistance à la pyrazinamide (109). Le premier groupe caractérisé par l'absence des "spacers" **3** et **16** (en plus de l'absence des "spacers" allant du 39 à 43) constitue le spoligotype de *M. bovis* susceptible à la pyrazinamide et, est définis comme *M. bovis* sous type *caprea*. L'autre groupe comportant les "spacers" **3** et **16** a été classée comme *M. bovis* sous type *M. bovis*. De nos jours, le *M. bovis* résiste à plusieurs antituberculeux (109).

Cependant, les données de la biologie moléculaire sur la résistance des souches de *M. bovis* isolées chez les animaux, relative à la résistance aux antituberculeux sont rares (121). Les travaux de SECHI et Coll., (121) seraient les premiers à mettre en évidence les bases génétiques de la résistance aux antituberculeux des souches *M. bovis* isolées chez le bétail. Les résultats issus de ces travaux ont montré que, la plus part des mutations liées à la résistance à la rifampicine n'apparaissent que sur le gène *rpoB*, au niveau du codon 521 due à une substitution de la leucine par la proline. Ce qui signifiait que le codon 521 pourrait jouer un rôle dans le développement de la résistance à la rifampicine chez le *M. bovis*.

2.2.10. Transport des isolats issus des cultures et les exigences de biosécurité

Avec la résurgence des cas de multi résistance aux anti tuberculeux, la tuberculose a été classée dans le Groupe de risque 3 qui regroupe des germes pathogènes causant habituellement une grave maladie humaine ou animale facilement transmissible d'un individu à l'autre, soit directement, soit indirectement. Pour ces maladies, il n'existe généralement ni traitement, ni mesures préventives efficaces. Les techniques de diagnostic de la tuberculose telles que la culture sur milieux spécifiques, les tests de sensibilité, la caractérisation des souches par les méthodes biochimiques ou de la biologie moléculaire, doivent se pratiquer dans des laboratoires de hautes performances techniques et de niveau de sécurité biologique bien définies. Pour ce faire, les activités de laboratoire relatives à la

manipulation des germes pathogènes dangereuses telles que les souches de *M. bovis*, doivent se faire dans des laboratoires de niveau de sécurité biologique 4.

Cependant, bon nombre de pays en voies de développement effectuant des activités de recherche sur la tuberculose, ne disposent pas d'une telle infrastructure au sein de laquelle pourrait se réaliser ce genre de diagnostic, ou bien, ils le font et en partie tout en respectant les exigences en vigueur. Lorsque, la suite du processus de diagnostic doit se faire en dehors du territoire national, l'envoi des germes pathogènes par voies aériens dans des laboratoires plus performants en vue d'un diagnostic approprié, doit obéir à la réglementation de l'Association Internationale de Transport Aérien (AITA) relative au transport de marchandises dangereuses mais aussi, en respectant la législation du pays d'accueil en ce qui concerne la biosécurité. Dans la classification de AITA, la tuberculose se trouve dans la catégorie **A** de la classe **6.2** des matières infectieuses. L'emballage contenant la matière infectieuse doit porter la numérotation des Nations Unies **UN 2814**, relative aux Zoonoses. L'emballage doit impérativement répondre aux instructions **(PI) 602** relatives à la catégorie **A** (133). Pour des raisons de sécurité, les échantillons de souches dénaturées doivent également être classés dans la catégorie **A**.

2.2.11. Gestion de la tuberculose bovine dans les élevages

La gestion de la TBB dans les élevages doit au préalable se conformer aux recommandations de l'OIE inscrites dans le code sanitaire pour les animaux terrestres. Ces recommandations qui sont des articles du chapitre 11.7 dudit code, sont dans le cadre de l'élevage bovin, adressées aux niveaux suivants:

- Pays ou zone indemne de la TBB,
- Compartiment indemne de la TBB,
- Troupeau indemne de la TBB,
- Importation des bovins destinés à la reproduction ou à l'élevage,
- Importation des semences de bovins,
- Importation d'ovules / embryons de bovins.

Toutes ces recommandations comportent des mesures qui permettent d'établir et de mettre en œuvre des programmes de prévention, d'éradication et du contrôle de la TBB dans une approche de gestion durable des ressources animales. Ces mesures sont basées sur le test et l'abattage des animaux révélés positifs par les tests d'immunité cellulaire, la notification, l'inspection post mortem et la surveillance dans les abattoirs. Cependant, la maîtrise de la gestion de la maladie dans les élevages bovins dépend du niveau économique des pays (développés ou en voie de développement), des types d'élevage (Intensif ou extensif) ainsi que du système d'élevage au niveau de chaque pays ou zone (sédentaire ou transhumant).

Le contrôle de la TBB, basé sur la tuberculination et l'élimination des animaux infectés a été une réussite en ce qui concerne l'éradication ou la réduction significative de la maladie dans les troupeaux bovins, dans plusieurs pays industrialisés ou l'élevage intensif se pratique à grande échelle (16). Cependant la mise en évidence du *M. bovis* chez certaines espèces sauvages protégées, serait à l'origine de la résurgence de la TBB dans certains pays industrialisés (125). Ainsi, la combinaison de la surveillance et du contrôle de la tuberculose chez le bétail et les animaux sauvages a été encouragée afin de limiter la persistance de cette résurgence. Toutefois, avec la mise en évidence des cas de "faux positifs " et de "faux négatifs " au test tuberculinique, l'utilisation du BOVIGAM® en tant que test auxiliaire au premier a été adopté par l'OIE et l'Union Européenne en 2002 et a considérablement contribué l'identification des animaux tuberculeux.

En Afrique au sud du Sahara, le système d'élevage le plus largement pratiqué est la transhumance et le mouvement sur le territoire national et transfrontalier du bétail échappe aux contrôles des services vétérinaires compétents, issus des différents pays. Jusqu'à la fin du millénaire passé, seulement 7 pays disposaient d'un programme de contrôle utilisant les tests tuberculiques et l'inspection post mortem (28). En dehors de ces pays, les tests de tuberculination n'ont été utilisés que lors des études sporadiques pour mettre en évidence l'absence ou la présence de la TBB dans le cadre de divers programmes de recherches. Cependant, l'inspection post mortem est pratiquée dans les abattoirs et les aires d'abattage des grands centres urbains et ne permet d'éliminer que des suspicions liées à la présence des lésions dans le cadre des activités de suivi sanitaire de viande de boucherie. L'utilisation combinée des tests de tuberculination et d'IFN- γ a fait ses preuves lors de quelques travaux effectués dans certains pays africains à forte activité pastorale (4). Sa vulgarisation au profit de la lutte contre la TBB dans un système d'élevage transhumant ou le mouvement du bétail constitue déjà un facteur non négligeable à la dissémination de la maladie, reste une question entière de recherche appliquée. L'assainissement des troupeaux transhumants constitue un domaine de recherche multidisciplinaire qui prendra assez de temps dans les pays sahéliens d'Afrique situés au sud du Sahara, comme le Tchad.

3. Santé Animale et Tuberculose Bovine au Tchad

3.1. Position Géographique du Tchad

Situé au cœur du continent Africain, entre les 7° et 24° degrés de latitude Nord, et les 13° et 24° degrés de longitude Est, le Tchad est limité au nord par la Libye, au sud par la République Centrafricain (RCA), à l'est par le Soudan, à l'ouest par le Niger, le Nigeria et le Cameroun (*Figure 3.1*). La densité de la population va de 54 habitants au km² dans le bassin du Logone à 0,1 personne au km² dans le nord désertique. D'après le recensement général de l'année 2009, la population tchadienne est actuellement de 11274106 habitants (42).

La topographie du Tchad est généralement plate et l'altitude qui va en augmentation vers le nord et l'est du pays est marquée au nord dans le massif du Tibesti par l'Emi Koussi qui est le point culminant, à l'est par les hauts plateaux de l'Ennedi et du Ouadaï qui descendent en pente vers le sud. Au centre, les plateaux du Guera atteignent 1500 m. L'ensemble du relief présente l'aspect d'une cuvette entourée d'une demi couronne montagneuse.

La cuvette tchadienne présente une hydrographie déficiente et instable en raison des taux d'évapotranspiration particulièrement élevés. Le réseau hydrographique qui se concentre essentiellement au sud, est constitué de deux fleuves: le Chari, long de 1200 km, prend sa source en RCA dans le fleuve Oubangui et le Logone long de 1000 km, vient du Cameroun. Ces deux fleuves se confluent à N'Djamena avant de se jeter dans le Lac Tchad. Ils sont alimentés par une multitude de petits cours d'eaux. A ce réseau principal, s'ajoute un réservoir en eau de surface non négligeable des six autres lacs poissonneux: le lac Fitri, les deux lacs d'Ounianga, le Lac Iro, le Lac Léré et le Lac Tikem. Le lac Tchad dont la superficie varie suivant les saisons et les années, est réduite de nos jours à une étendue moyenne estimée à 25000 km².

Quatre zones bioclimatiques suivent ce réseau hydrographique qui lui même dépend énormément de la pluviométrie annuelle. Le désert du *Sahara* se situe au nord où les précipitations annuelles sont inférieures à 200 mm et la population est largement nomade avec des troupeaux composés des chameaux et des petits ruminants. Le Sahel dans la zone centrale, reçoit entre 200 et 600 mm de précipitation par année et la végétation varie entre la *steppe* et la *savane*, c'est une zone d'élevage par excellence. Au sud où les précipitations peuvent atteindre parfois 1200 mm, la végétation va de la *savane* à la *forêt tropicale*.

L'élevage tchadien qui est essentiellement de type extensif, dépend de l'accessibilité aux ressources fourragères issues de la végétation naturelle et suit le réseau hydrographique décrit ci haut par des mouvements de transhumance qui eux sont très liés l'alternance des saisons sèche et pluvieuse.

3.2. Élevage Bovin au Tchad

Il s'agit d'élevages ne recevant qu'occasionnellement des intrants; et à l'instar des autres pays sahéliens, la productivité des animaux demeure soumise à l'importante variabilité des parcours, dont les ressources fourragères dépendent étroitement des écarts inter annuels des précipitations. Des suites d'années sèches comme celles des années 1970, 1985 ou 1992 ont décimé les troupeaux de zébus dans des proportions pouvant atteindre 30 à 80% des effectifs. Il faut également noter la fréquence des crises sociopolitiques qui, en empêchant les services vétérinaires de maintenir une couverture sanitaire de qualité, ont aggravé la mortalité des animaux.

Les zébus forment le plus gros contingent d'animaux (environ 10 000000 de têtes) dont le pays tire d'importantes ressources économiques (20% du PIB, après le coton et le Pétrole), avec ceux de moutons auxquels ils sont associés. Centrés sur le 13^e parallèle et la zone sahélo soudanienne, les éleveurs de bovins et de petits ruminants en sortent saisonnièrement. Soit ils vont exploiter les pâturages du Nord, durant les pluies, en nomadisant au gré de mares d'hivernage, soit en fin de saison sèche, ils migrent vers le Sud pour attendre les premières averses, avant de revenir vers leurs parcours centraux, où ils pratiquent aussi quelques cultures de céréales. Quelques groupes Toubou près du lac Tchad, surtout des Kréda ou des Kécherda, de nombreux cantons arabes tels que ceux des Myssérié, des Ouled Himet ou des Djaatné au centre du pays, et de nombreuses communautés dans l'Est comme des Rizégat, les Mararit, les Ouled Hit, les Sifféra, pour ne citer que les principales, s'adonnent à cet élevage de grands ruminants de façon extensive et nomade. Plus au sud jusqu'aux confins de la RCA, ce sont les peuls qui élèvent des Zébus. Au hasard des dernières sécheresses, la plupart de ces communautés se sont scindées, et plusieurs de leurs fractions vivent quasiment sédentaires à proximité des villes comme Doba, Moundou et Sarh.

On peut aussi signaler également l'élevage original des Boudouma du Lac Tchad, dont les bovins exploitent les pâturages de décrue des îles de l'archipel oriental; et aussi le fait qu'en saison des pluies de très nombreux éleveurs peuls viennent du Cameroun en remontant le long du bassin du Chari et de Logone pour passer l'hivernage au Tchad.

Cependant, sur le plan institutionnel, l'élevage au Tchad est actuellement géré par le Ministère de l'Élevage et des Ressources Animales (MERA). Au niveau de ce Ministère, c'est la Direction des Services Vétérinaires (DSV) qui se charge de la politique en matière de Santé animale et de Santé publique vétérinaire.

3.3. La Direction des Services Vétérinaires

Placée sous la direction d'un Directeur par l'Article N°11 du Décret N° 68 du 24 janvier 2006, la DSV est une structure d'élaboration, de la réglementation, de coordination et de suivi de l'exécution de la

politique nationale en matière de Santé animale et de la Santé publique vétérinaire. Elle est chargée de concevoir et d'organiser :

- l'épidémiosurveillance des maladies animales, y compris au sein de la faune sauvage et des ressources halieutiques en concertation avec les départements concernés,
- la prévention et la lutte contre les maladies animales,
- l'identification et la traçabilité sanitaire des animaux,
- le contrôle sanitaire des mouvements d'animaux et de denrées ou de produits d'origine animale à l'intérieur du territoire national et dans le cadre des échanges internationaux,
- le contrôle de la qualité des médicaments et des produits biologiques pour le diagnostic et le traitement des maladies animales, ainsi que le contrôle de la prescription et de la distribution des médicaments vétérinaires,
- l'inspection sanitaire et le contrôle de l'hygiène de denrées alimentaires d'origine animale et autres produits animaux, à tous les niveaux de leur production, transformation, transport et commercialisation.

Au niveau de la DSV, se trouve le Service d'épidémiologie qui est doté d'un organe national en charge de l'épidémiosurveillance des maladies animales jugées prioritaires par le Gouvernement Tchadien. Il s'agit du Réseau d'Epidémiosurveillance des Maladies Animales du Tchad (REPIMAT).

3.4. Le Réseau d'Épidémiosurveillance des Maladies Animales au Tchad

Créé en 1995, le REPIMAT est le réseau d'épidémiosurveillance le plus ancien de l'Afrique francophone de l'ouest et du centre (97). Il est placé sous la tutelle de la DSV et ses principaux objectifs sont les suivants :

- Surveiller les maladies animales jugées prioritaire,
- Détecter précocement les nouveaux foyers de ces maladies,
- Recueillir les informations concernant ces maladies en termes de répartition géographiques et temporelle, de prévalence et d'incidence,
- Transmettre ces informations aux autorités chargées de l'élevage, de santé animale, et de la santé humaine pour ce qui concerne les maladies à caractère zoonotique.

Comme la plupart des autres réseaux d'épidémiosurveillance en Afrique, le REPIMAT a développé un partenariat efficace avec le LRVZ de Farcha afin de pouvoir procéder à l'analyse des prélèvements faits dans le cadre de ses activités. Les travaux de recherche sur la TBB qui ont commencé bien

avant la création du REPIMAT, bien que de nos jours se réalisant dans des cadres de projets de recherche Nord-Sud au niveau du LRVZ de Farcha, la vulgarisation des résultats qui en découlent auprès des autorités compétentes relève de la compétence dudit réseau. La présente étude est inscrite dans ce cadre et ses objectifs sont définis dans la partie ci-après.

4. Les Objectifs de l'Étude

4.1. Objectif Principal

Au vu de la revue bibliographique faite ci haut en ce qui concerne la recherche sur la TBB au Tchad, aucune donnée n'a fait mention d'un travail qui a été fait dans la zone méridionale du pays sur cette zoonose qui reste de nos jours un véritable problème de santé publique et vétérinaire.

Les rapports statistiques précédents, du Ministère de l'élevage de l'Époque (130) faisaient déjà mention de l'importance des cas de suspicions liées à la TBB aux abattoirs de Sarh et de Moundou. De plus, plus de la moitié de la population tchadienne vit dans la zone méridionale (42).

L'étude se fixe comme objectif principal, une meilleure connaissance de l'épidémiologie de la TBB dans une zone à forte concentration humaine mais aussi d'intense activité pastorale, à travers l'utilisation des techniques mieux adaptées et applicables dans un système d'élevage transhumant des zébus (laitiers et de boucherie) ne bénéficiant d'aucun suivi sanitaire organisé.

4.2. Les Objectifs Spécifiques

L'étude se fixe comme objectifs spécifiques de:

- identifier les facteurs de risque responsables à l'infection due à la TBB dans les élevages transhumants du Tchad,
- mettre en évidence, pour la première fois les souches *M. bovis* circulant dans la partie sud du Tchad,
- valider et mettre au point les outils de diagnostic ante et post mortem de la TBB chez le bétail transhumant du Tchad,
- Identifier des options appropriées de contrôle de la TBB chez le bétail transhumant du Tchad.

5. Le Cadre Institutionnel, le Lieux de l'Étude, Les Matériels et Méthodes

5.1. Cadre Institutionnel

5.1.1. Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha

Le LRVZ de Farcha a été créé en 1949 et sa gestion scientifique et administrative a été confiée à l'Institut d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux (IEMVT). En 1985, le LRVZ de Farcha a été rétrocédé à l'État tchadien et placé sous la tutelle du Ministère de l'Élevage par l'Ordonnance N° 006 / PR / 85 du 21 mars 1985. Jusqu'à nos jours, les activités de recherche en matière de développement de l'élevage au Tchad sont presque exclusivement couvertes par le LRVZ de Farcha. Les priorités de recherche du LRVZ de Farcha évoluent vers le bien-être des familles productrices et consommatrices. Au vu de sa mission spécifique dans la recherche agricole, les fronts pionniers se situent dans la contribution de l'élevage à l'amélioration durable des conditions de vie en Afrique Centrale dans l'intersection de trois domaines:

- la production animale,
- le contexte environnemental et social (au sens large),
- et la santé animale et humaine.

Après la mise en évidence de la souche *M. bovis* sur les carcasses et abats provenant de l'abattoir de N'Djamena (39), l'évaluation de la situation sanitaire des bovins destinés pour l'abattage dans d'autres centres urbains du pays devenait un issu impératif quant à la conception d'un projet de lutte nationale contre la TBB dans les troupeaux transhumants au Tchad. Ce premier résultat a été le fruit d'une convention de partenariat signée entre le LRVZ de Farcha (Tchad), l'ITS de Bâle (Suisse) et le Centre de Support en Santé Internationale (CSSI) de N'Djaména en août 2002. La mise en œuvre de cette convention a commencé par le déroulement de la phase II du projet initial intitulé **"Interface entre la Santé humaine et animale chez les nomades en Afrique de l'ouest: vers «une médecine unie»"** mené dans les zones du Kanem et du Chari-Baguirmi. Le succès de cette convention de partenariat a été marqué par le renforcement de capacité du LRVZ de Farcha avec l'instauration de l'unité de diagnostic des mycobactéries (le seul laboratoire actuel de culture et de diagnostic moléculaire de la tuberculose au Tchad) et la mise en place d'une équipe de recherche sur la TBB au sein dudit laboratoire.

Le second projet issu du même partenariat libellé sous le thème de **"Epidémiologie moléculaire du *M. bovis* en association avec la variation génétique des animaux hôtes en Afrique"**, a permis de jeter les bases des travaux qui ont abouti à la présente thèse de Doctorat (PhD). Il s'agit d'un projet

multi disciplinaire (Épidémiologie, Microbiologie et Biologie moléculaire) conduit dans 7 pays africains qui sont: Maroc, Mali, Mauritanie, Nigeria, Sénégal, Tanzanie et Tchad. Ce premier regroupement a constitué un premier pas dans la mise en place du Réseau Africain de la Surveillance et de la Lutte contre la TBB créée en mai 2007 à Bamako (Mali) dont l'une des priorités a été la recherche pour l'amélioration et la vulgarisation des techniques de diagnostic de la maladie confiées au LRVZ de Farcha dans le cadre de la présente thèse. Les objectifs de cette étude qui ont porté sur l'évaluation des différentes méthodes de diagnostic de la tuberculose à *M. bovis* ainsi que l'identification des facteurs de risque liés à son endémicité dans les troupeaux transhumants du Tchad, font partie intégrante de la variante « **Ecosanté - Zoonoses et Maladies Transmises par les Vecteurs** » du programme quinquennal de recherche 2006 – 2010 du LRVZ de Farcha qui s'inscrit totalement dans le Plan national à moyen Terme de la Recherche Agronomique (PMTRA) au Tchad. En effet l'objectif principal de cette variante « **Ecosanté** » est de mettre à la disposition des décideurs et des communautés concernées un dispositif de diagnostic rapide et fiable ainsi que la mise au point d'autres outils stratégiques de lutte contre la pauvreté par une meilleure maîtrise des risques sanitaires.

Le projet qui a abouti aux présents résultats a été mené à Sarh et Moundou (Sud du Tchad) par deux doctorants. Il s'agit d'un Epidémiologiste moléculaire de nationalité Suisse et d'un Biologiste épidémiologiste de nationalité Tchadienne. La collecte des données de terrain à Sarh et à Moundou ainsi que l'évaluation des méthodes de diagnostic ont été financées par la firme PRIONICS qui siège à Zurich (Suisse), les travaux de laboratoire (cultures, extraction d'ADN et identification des membres du complexe *M. tuberculosis* ainsi que des mycobactéries non tuberculeuses) au LRVZ de Farcha et à l'Institut de Médecine et de Microbiologie de Zurich, par le Fond National Suisse de Recherches Scientifiques. Le typage moléculaire des souches *M. bovis* issues des matériels biologiques collectés à Sarh a été fait au Veterinary Laboratory Agency (VLA) de Londres (Angleterre) grâce au financement Wellcome Trust dans le cadre du Réseau de la Surveillance et de Lutte contre la TBB en Afrique. C'est aussi grâce à ce financement que s'est tenue la formation des chercheurs et techniciens dudit réseau sur le thème "**Isolement des souches et caractérisation des membres du complexe *Mycobacterium tuberculosis*: vers une gestion des souches multi-résistantes d'origine animale en Afrique du Centre et de l'Ouest**", du 03 au 16 août 2009 à N'Djamena ainsi que la mise en place de l'unité de diagnostic moléculaire de la tuberculose au LRVZ de Farcha.

5.1.2. Centre National Suisse de Mycobactéries

Créé en 1992, le Centre se trouve à Zurich et fait partie des 9 Centres Nationaux de Référence pour la surveillance des maladies infectieuses en Suisse. Placé sous la responsabilité de l'Office fédérale de la Santé publique (Berne), il est géré par l'Institut de microbiologie de l'Université de Zurich. Il a un

rôle général d'information, de coordination nationale et internationale, d'assistance technique, de recherche et de formation en ce qui concerne le diagnostic du Complexe *Mycobacterium tuberculosis*. Il joue également un rôle notoire en épidémiologie moléculaire. Le laboratoire de diagnostic du Centre National Suisse de Mycobactéries est un laboratoire de Niveau 3 doté d'une unité de culture des mycobactéries et de biologie moléculaire. C'est au niveau de ce laboratoire que nous avons pu réaliser la caractérisation moléculaire des souches du membre du Complexe *Mycobacterium tuberculosis* et des mycobactéries non tuberculeuses isolées au LRVZ de Farcha.

5.1.3. Veterinary Laboratory Agency

Créé en octobre 1995, suite à la fusion du Central Veterinary Laboratory (CVL) et du Veterinary Investigation Center (VIC), les activités du VLA relatives à la surveillance de la TBB concernent surtout la culture des mycobactéries et la caractérisation moléculaire des isolats par la technique de spoligotypage, puis plus récemment par le VNTR. Actuellement une équipe multidisciplinaire travaille sur différents aspects de la TBB au niveau du VLA (Épidémiologie, immunologie, mise au point des techniques de diagnostic et du vaccin antituberculeux). L'un des projets les plus importants actuellement en cours au VLA est la stimulation du vaccin BCG existant. Dans le cadre de la détermination de l'importance de la tuberculose humaine due à l'infection au *M. bovis*, il collabore avec plusieurs partenaires en ce qui concerne la soumission des projets au financement du fond Wellcome Trust. L'un de ces meilleurs partenaires sur ce thème est l'Institut Tropical et de Santé Publique Suisse. Les travaux de caractérisation moléculaire des souches *M. bovis* qui ont été faits au sujet de cette étude s'inscrivent dans le cadre de cette collaboration.

5.1.4. Laboratoire de Van Haeringen

Le laboratoire Dr Van Haeringen appartient à une compagnie privée créée en 1986 aux Pays Bas. Ce n'est qu'en 1993 que la technologie de l'ADN a été implantée au niveau de ce laboratoire. De nos jours, il offre en matière de diagnostic, un service qui concerne environ 125 tests relatifs à la caractérisation des ADN d'origines animales et sanguins. Les ADN extraits des échantillons sanguins prélevés à Sarh ont été envoyés pour être caractérisés au niveau de ce laboratoire afin de mettre en évidence les gènes responsables de la différence de susceptibilité des deux races bovines locales (Arabe et Mbororo) à l'infection tuberculeuse.

5.1.5. Institut Tropical et de Santé Publique Suisse

L'Institut Tropical Suisse (ITS) a été créé en 1943 en tant que organisation publique. Il a été un partenaire de l'Université de Bâle dans le cadre de l'enseignement et de formation (Cours de formation à la Licence, Master en Biologie de l'Infection et en Épidémiologie et les Masters joints ainsi

que plusieurs autres formations doctorales). En effet, l'ITS avait pour mandat de contribuer à l'amélioration de la santé des populations du point de vu international et national par la promotion de l'excellence en matière de recherche, de prestation de services, de l'enseignement et de la formation.

Afin de bien mener ce mandat, il avait adopté les stratégies suivantes:

- une approche interdisciplinaire,
- le maintien d'un processus itératif entre le laboratoire et le terrain,
- Répondre par la recherche, la formation et les prestations de service, les niveaux de:
 - 1- l'innovation (le développement des concepts, des méthodes et des produits),
 - 2- la validation (fournir des preuves pour ce qui fonctionne),
 - 3- l'Application (renforcer le système et les politiques de santé publique).

L'ITS était organisé en quatre départements:

- Parasitologie médicale et biologie de l'infection,
- Service médical,
- Centre Suisse pour la Santé internationale,
- Santé Publique et Épidémiologie,

Le service chargé de l'Interface entre le domaine écologique, la Santé Humaine et Animale était placé sous la responsabilité du département de Santé Publique et de l'Épidémiologie. Les différents projets de recherche qui ont abouti à cette thèse ont été conçus et mis en œuvre au niveau de ce service. Le suivi académique des travaux de recherche a été conjointement fait entre l'ITS, le LRVZ de Farcha et l'Ecole Inter Etats des Sciences et de Médecine Vétérinaire de Dakar (EISMV).

La dernière révolution qu'a connue à l'ITS fut sa fusion avec l'Institut de Médecine Sociale et Préventive pour donner l'Institut Tropical et de Santé Publique Suisse (ITSPS ou Swiss TPH).

5.1.6. Université Cheik Anta Diop de Dakar

Créée le 24 février 1957, l'Université de Dakar a été officiellement inaugurée le 09 décembre 1957. Le 30 mars 1987, elle a été renommée Université Cheihk Anta Diop de Dakar (UCAD). Après les réformes de 1994, de 2003 et de 2004 qui ont conduit respectivement à la création de la Faculté des Sciences Économiques et de Gestion (FAGEG), à l'introduction du régime Licence Master Doctorat (LMD) et à la création de la Faculté des Sciences et Technologies de l'Éducation et de la Formation (FASTEF), le dernier changement qu'à connu le système académique de l'UCAD, fut la réforme des études doctorales en 2005. Les objectifs de cette dernière reforme sont:

- rationaliser les formations doctorales en créant un doctorat unique;
- orienter les études doctorales vers une formation pluridisciplinaire pour favoriser l'insertion professionnelle des diplômés;

- harmoniser le régime des études doctorales de l'Université Cheikh Anta DIOP de Dakar aux systèmes internationaux de formation doctorale.

L'École Doctorale «**Sciences de la Vie, de la Santé et de l'Environnement**» (ED-SVSE) créée par arrêtee rectorale est basée sur une approche intégrée et pluridisciplinaire couvrant un vaste éventail de disciplines axées sur le vivant, la santé et l'environnement. Ces objectifs spécifiques sont:

- former des chercheurs et des professionnels dans les domaines des sciences de la vie, de la santé et de l'environnement;
- concevoir et piloter des projets dans les domaines précités;
- contribuer à la promotion et au développement de l'éducation relative à l'environnement.

Elle rassemble quatre types de formations doctorales dont la mention "**Biologie, Productions et Pathologies animales**". Le volet "**Santé et la Biotechnologie animale**" fait partie des formations qui s'inscrivent au sein de cette mention et est rattaché à l'EISMV. La présente thèse est inscrite dans le cadre d'une thèse en co-tutelle (UCAD – Université de Bâle (Suisse) / ITS) et son thème de recherche qui traite de la question de l'épidémiologie et du diagnostic de la TBB au Tchad cadre bien avec le contexte de "Pathologie et la Biotechnologie animale". Les travaux qui ont permis la réalisation de cette thèse ont été suivis de prêt par l'EISMV.

5.2. Lieux de l'Étude

La collecte des données sur les animaux vivants ainsi que sur les carcasses (et abats) a été effectuée au sud du Tchad, principalement dans les villes de Sarh (Longitude 9.150° N et latitude 18.390° E) et de Moundou (Longitude 16.090° E et Latitude 8.550°N) (*Figure 3.1*).

La ville de Moundou, située à 450 Km de N'Djamena, est la capitale économique du Tchad. Vu sa position par rapport au fleuve Logone et son importance économique, elle attire la majorité des éleveurs nomades peuhl venant de la province de l'Ouam Pendé (Nord-Ouest de la RCA) et du Cameroun (Bénoué) pour y vendre les produits de leur élevage (Lait et animaux de réforme) durant leur séjour pendant la saison sèche. Le Marché à bétail de ladite ville est situé au sud, derrière le fleuve Logone. Les animaux achetés par un groupe de commerçants au niveau des campements sont vendus aux bouchers au niveau de ce marché. Ces animaux sont soit abattus à l'abattoir principal de Moundou (géré par un groupe de bouchers d'ethnie Kreda) situé près du Marché central de ladite ville au bord du fleuve Logone soit dans un abattoir privé situé au bord du Lac Wey à l'ouest de Moundou. Cet abattoir est géré par un natif de Moundou et c'est au niveau ce dernier que les dix animaux tuberculinisés lors de notre sortie de contact au niveau de ladite ville, ont été abattus. Compte tenu de la réticence du quasi totalité des bouchers après cette mission de contact, quant à la réalisation de notre étude au niveau de Moundou, nous avons limité notre zone de collecte à Sarh où les objectifs

de la présente étude ont été mieux appréhendés par l'association des bouchers. Ce choix a été fait afin d'éviter le gaspillage des ressources allouées à la réalisation de cette étude.

La quasi totalité de nos données (99%) a été collectée à Sarh compte tenue de l'agrément des bouchers ainsi que de la disponibilité du Président de leur association (qui est aussi le Chef coutumier de l'ethnie Kréda où la majorité des bouchers est issue) à faire aboutir le projet d'étude. Pour ce dernier, ce projet d'étude n'est non seulement une évaluation de l'abattoir privé de Sarh dont il détient la lourde charge mais aussi une contre expertise quant aux fréquents cas de saisies obtempérées par les inspecteurs vétérinaires de la Délégation des services vétérinaires de la Région du Moyen Chari. La collecte des échantillons sanguins et l'épreuve de l'IDC ont été effectuées dans l'enclos du marché à bétail de Sarh et l'inspection post mortem à l'abattoir privé de ladite ville. Tous les échantillons collectés ont été transportés sous glace jusqu'au LRVZ de Farcha à N'Djamena.

5.3. Matériels et Méthodes

5.3.1. Les animaux

Les bovins qui ont été échantillonnés, provenaient d'un système d'élevage transhumant et en dehors de l'échantillonnage de Moundou, la localisation de leurs troupeaux d'origine était beaucoup plus liée au tenu d'un marché hebdomadaire (Boum Kébir, Tarangara, ou Danamadji) non loin de la zone de campement des éleveurs nomades. Ces derniers, lors de leur passage aux environs des villages cités ci-haut, vendaient quelques animaux aux commerçants de bétail durant les jours de marché hebdomadaire, et ces derniers confiaient les animaux à un groupe de deux ou de trois convoyeurs qui à leur tour les acheminaient au marché à bétail de Sarh. Les bouchers achetaient les bovins au niveau de ce marché et après cet achat, l'équipe de recherche chargée de l'étude, grâce à un compromis basé sur une redevance financière par tête de bovin, a pu collecter les données nécessaires à la réalisation de la présente thèse. Compte tenu de l'origine et de l'arrivée hasardeuse des bovins sur notre lieu d'échantillonnage, nous avons considéré ce dernier comme étant fait au hasard. Le calcul de la taille de l'échantillon a été basé sur la prévalence de 17% (120) en utilisant le logiciel OpenEpi 2004.

L'échantillonnage a concerné essentiellement des zébus issus des races Arabes, Mbororo, Bogolodjé et des Métis issus de leur croisement. Le critère de reconnaissance d'un bovin appartenant à une race a été surtout basé sur la description phénotypique des bovins constituant le cheptel bovin tchadien (144):

- la reconnaissance de la couleur de la robe a été liée à un certain degré de standardisation suivant la région de collecte et l'ethnie de l'éleveur: robe blanche pour le Zébu arabe des éleveurs Myssériés de l'est qui descendent souvent dans la région de Sarh avant de continuer en RCA (*vice versa*), et le

bovin Mbororo généralement de robe variant du brun au rouge feu (couramment caractérisée de rouge acajou).

- la reconnaissance du type de cornage, dont ceux en coupes croissante, flottantes ou sans corne pour le zébu arabe. Chez le zébu Mbororo, les cornes sont souvent en lyres hautes, ouverte et adressées pouvant mesurer 75 à 120 cm.

- L'appréciation visuelle de la hauteur de l'animal (le bovin Mbororo étant toujours de grande taille).

Les bovins localement appelés Bogolodjé dans la région de Sarh et de Moundou, ont très souvent un phénotype proche de la description faite par Zeuh (144) sur les bovins Toupouri. Les bovins dits métis présentent généralement un phénotype intermédiaire entre les deux principales races bovines (Arabe et Mbororo).

Sur ces animaux, ont été collectés des paramètres démographiques tels que la race, l'âge et le sexe ainsi que le parcours transfrontalier. Il en est de même de l'état d'embonpoint des animaux.

5.3.2. Le matériel biologique

Le matériel biologique était constitué surtout des échantillons sanguins et des prélèvements faits aux abattoirs. Le caillot issu de chaque prélèvement sanguin a été destiné à la caractérisation génétique des races bovines Arabe et Mbororo. Cependant, les échantillons de sérum sanguin étaient destinés au diagnostic de la TBB par le biais du test FPA. La culture des mycobactéries sur milieux spécifiques a été effective à partir des prélèvements issus des lésions suspectées de TBB à l'abattoir. La *figure 5.1*, illustre le devenir des matériels biologiques collectés.

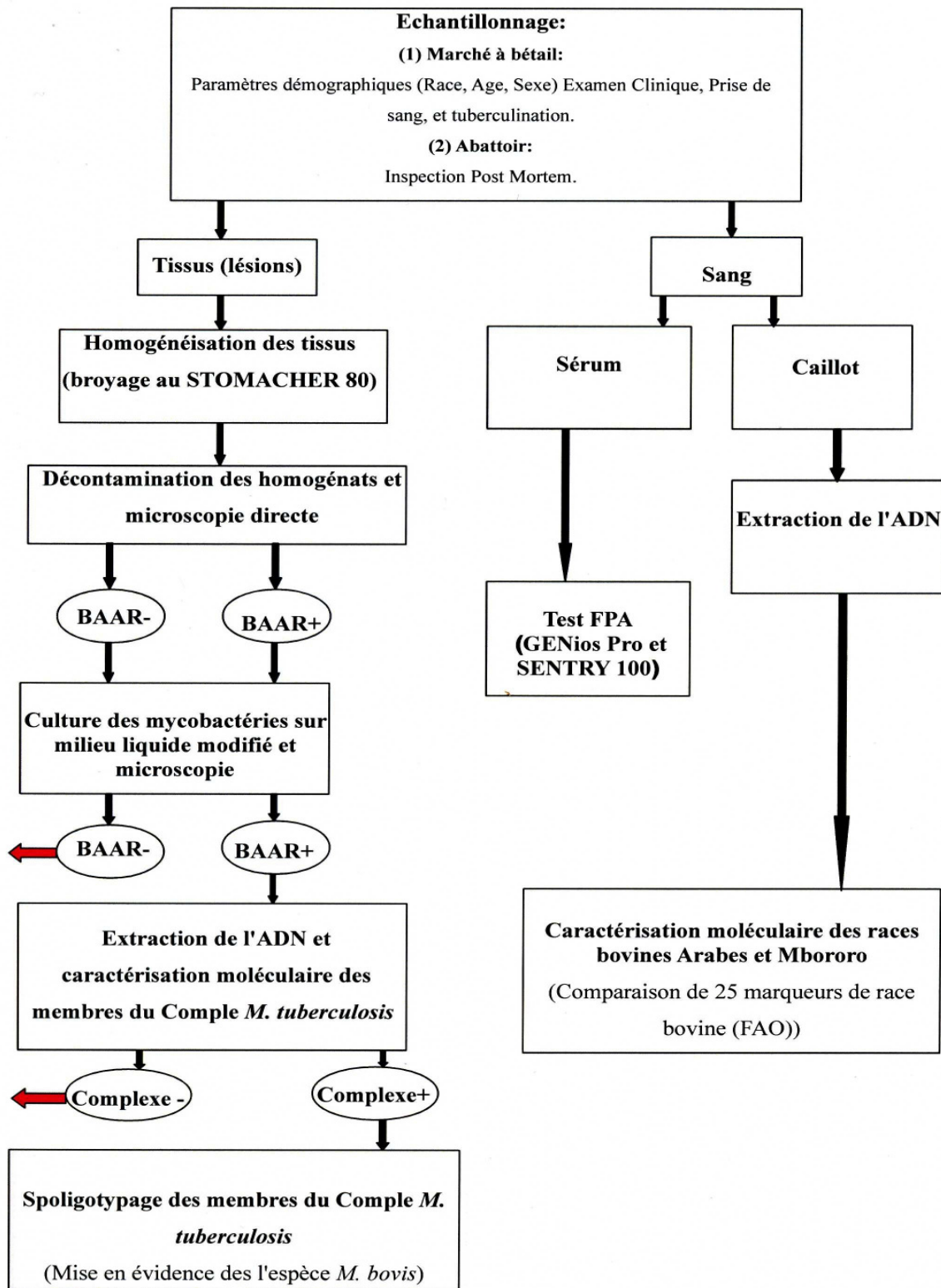


Figure 5.1: Collecte de données et les différentes étapes de diagnostic (les flèches rouges indiquent des échantillons éliminés du processus de diagnostic).

5.3.3. Les techniques de diagnostic utilisées

5.3.3.1. Caractérisation moléculaire des races bovines

Avant l'abattage, les échantillons sanguins prélevés sur les bovins Arabe et Mbororo (*Figures 6.1 et 6.2*) ont été gardés à la température ambiante pour une durée d'environ 1 heure puis pour chaque échantillon, le sérum a été séparé du caillot. Les échantillons de caillots ainsi collectés ont été transportés sous glace (+4 °C) puis conservés à – 80 ° C au niveau du LRVZ de Farcha. L'ADN issu de chaque échantillon de caillot a été obtenu par extraction en utilisant le kit QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit (QUIAGEN, Cat. No. 51106). L'extraction de l'ADN a été effectuée conformément à la procédure de manipulation des liquides corporels et des échantillons sanguins (108). Les extraits d'ADN ont été caractérisés conformément au protocole interne utilisé au laboratoire Van Haeringen en utilisant les micros satellites spécifiques de la liste de FAO (47).

5.3.3.2 Diagnostic ante mortem de la tuberculose

Trois types de diagnostics ont été réalisés en ante mortem. Il s'agit de:

- l'examen clinique basé sur l'appréciation visuelle de l'état général de l'animal,
- le test FPA (en *in vitro*),
- le test IDC (en *in vivo*).

L'IDC a été réalisé après la prise de sang en injectant à chaque bovin sur l'un ou l'autre des côtés du coup de l'animal, la tuberculine bovine (*M. bovis*) et la tuberculine aviaire (*M. avium*) puis les résultats issus de ce test ont été préalablement interprétés conformément aux recommandations de l'OEI. Cependant, il est à noter que, pour la détermination de la prévalence des réagissants dans le cadre des études épidémiologiques, le seuil standard utilisé est: la différence des épaisseurs au niveau des deux sites d'injection des tuberculines après 72 heures ≥ 4 mm. En vue d'une évaluation des tests ante mortem, il a été suggéré par la présente étude un seuil de > 2 mm.

Deux types de test FPA (GENios Pro et SENTRY 100) ont été réalisés à partir des échantillons de sérum collectés sur les animaux vivants comme décrit par Jolley *et coll.*, (65).

5.3.3.3. Diagnostics post mortem de la tuberculose

Les diagnostics post mortem ont été réalisés en trois grandes étapes successives:

- Le diagnostic macroscopique qui a consisté en une identification visuelle des lésions caractéristiques de la TBB, a été réalisé dans les deux abattoirs (Moundou et Sarh) conformément à la technique standard d'inspection des viandes de boucherie (56). Deux types de saisies ont été effectués au cours des séances d'inspection: saisie partielle et saisie totale. Les lésions identifiées ont été collectées de manière aseptique dans des flacons stériles destinés à ce fin (flacons non cassables) et transportées

sous glace (+4°C) jusqu'au LRVZ de Farcha à N'Djamena où elles ont été conservées à – 20°C jusqu'à leur traitement et mise en culture.

- Les lésions collectées ont été nettoyées puis homogénéisées comme précédemment décrit par Diguimbaye-Djaibé *et Coll.*, (40) et mises en culture sur milieu liquide 7H9 modifié. Les spécimens mis en culture ont été incubés à l'étuve à 37°C ($\pm 0,02$) et observés visuellement (chaque semaine) jusqu'à la constatation d'une turbidité, témoins d'une croissance d'organismes. A partir des cultures turbides, des frottis ont été confectionnés et colorés par la technique de Ziehl Neelsen et observés à l'objectif X100 pour la mise en évidence des BAAR (40). Pour chaque culture contenant des BAAR, un échantillon de 0.5ml (en double) a été prélevé et inactivé par incubation au bain mari, à une température oscillant entre 95°C et 100°C pendant 15mn. Les cultures contenant des BAAR ainsi inactivés, ont été dans un premier temps congelées à - 20°C puis affrêtées sous la mention "**Matériel de catégorie A, Classe 6.2 des matières infectieuses**" par le biais de la compagnie DHL jusqu'au Centre National Suisse de Mycobactéries à Zurich.

- Au laboratoire du Centre National Suisse de Mycobactéries de Zurich, les échantillons reçus ont été au préalable traités afin d'extraire l'ADN mycobactérien en utilisant le kit InstaGene™ (Catalogue No. 732-6030; Bio-Rad). Les extraits d'ADN issus des échantillons ont été en suite caractérisés par la technique PCR Light Cycler® pour la mise en évidence des souches, Membres du Complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) et des mycobactéries non tuberculeuses (MTN). Des échantillons d'extrait d'ADN de toutes les souches caractérisées comme MTBC ont été acheminés au VLA où ils ont été diagnostiqués par la technique de Spoligotyping (66) pour l'identification de l'espèce *M. bovis*.

5.3.3.4. Gestion des données et analyses statistiques

Les données ont été préalablement entrées en double dans une banque sécurisée en utilisant le logiciel Microsoft ACCESS™.

Les investigations statistiques relatives à la caractérisation génétique des deux races bovines (Arabe et Mbororo) ont été réalisées grâce à l'utilisation successive des logiciels ARLEQUIN 3.01 (46), STRUCTURE 2.1 (106) et FSTAT 2.9.3.2. (50).

En ce qui concerne les données relatives au diagnostic de la TBB ainsi qu'à l'identification des facteurs de risque liés à cette dernière, les informations collectées sur les fiches (voir annexes 10.3, 10.4 et 10.5) et préalablement entrées dans la banque sécurisée, ont été transférées par le biais du logiciel Stat transfert version 7 vers le logiciel Intercooled STATA version 9.2 au niveau duquel des analyses statistiques appropriées ont été réalisés.

6. Résultats

6.1. Molecular Characterization of two Common Chadian Cattle Breeds

C. Flury^{1*}, B. N. R. Ngandolo², B. Müller³, J. Zinsstag³ and H. N. Kadarmideen⁴

¹Institute of Animal Science, Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Universitätsstrasse 65, 8092 Zürich, Switzerland

² Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha, PO Box 433, N'Djaména, Chad

³ Swiss Tropical and Public Health Institute PO Box, 4002 Basel, Switzerland,

⁴CSIRO Livestock Industries, JM Rendel Laboratory, PO Box 5545 Rockhampton, QLD 4702, Australia

Corresponding author:

Christine Flury,

Phone: 0041 31 910 22 64;

Fax: 0041 31 910 22 99;

Email: christine.flury@shl.bfh.ch

Swiss College of Agriculture (SHL), Länggasse 85, 3052 Zollikofen, Switzerland.

Published in AGRI 2009, 44: 67 – 76.

Summary

In previous studies, significant differences in *Mycobacterium bovis* infection prevalence was reported between two Chadian cattle breeds. Those findings and the established differentiation due to phenotypic characteristics suggest that the two breeds (Arab and Mbororo) are genetically different. To evaluate the genetic structure and the differences between these breeds, the genetic diversity within and between breeds was evaluated based on a total of 205 multilocus genotypes (21 microsatellite loci).

All of the loci under investigation were polymorphic and the number of alleles ranged from 4 to 14 within the two populations. The analysis of population fixation resulted in a F_{ST} value of 0.006. Further the population assignment of the individual genotypes and the exact test of population differentiation did not support the hypothesis that the samples drawn out of the two populations are genetically different. Population admixture and sample collection are discussed as possible reasons for the rejection of the hypothesis. Finally, recommendations for sample collection in extensive systems are given.

Keywords: *Cattle breeds Africa, molecular characterization, genetic diversity within population, genetic diversity between populations.*

Introduction

Mycobacterium bovis (*M. bovis*) is the causative agent of bovine tuberculosis (BTB). Bovine tuberculosis is a zoonotic disease and one question of interest is its importance in the human tuberculosis epidemic, fostered by HIV/AIDS in different parts of Africa (Ayele *et al.*, 2004; Cosivi *et al.*, 1998). Such investigations are extensive, as the tuberculosis epidemic and spread depend on a variety of factors such as complex interactions between different *Mycobacterium tuberculosis* Complex strains, non-tuberculous Mycobacteria, susceptibility of host cattle breeds, the public health status and other environmental factors. To further investigate those complexities a large project is currently running in cooperation with Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha, N'Djaména, Chad; Sokoine University of Agriculture, Morogoro, Tanzania; Laboratoire Central Vétérinaire, Bamako, Mali; Ecole Inter-Etats des Sciences et de Médecine Vétérinaires, Dakar, Senegal; the Swiss Tropical Institute (STI), Basel, Switzerland and the Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Zürich, Switzerland.

In a previous study, differences between host cattle breeds regarding the prevalence of infections with *M. bovis* were reported (Hilty, 2006). In Chad as well as in Cameroon (Hilty, 2006) a higher prevalence in the Mbororo breed was found in comparison with the Arab breed, and the hypothesis was, that the distinct prevalence might be due to a differential susceptibility of the two breeds. Further research on the susceptibility of different host breeds and the genetic diversity between these breeds are goals of the overall project. So far, the genetic characterizations of the samples collected at the slaughterhouses in Chad are completed and subject of the presented study.

As compared to Europe, characterisation of animal genetic resources (AnGR) in Africa receives less attention. In the country report of Chad (FAO, 2007b), no molecular characterization of Chadian cattle breeds was reported. However, adequate characterization of AnGR is a prerequisite for successful management programmes and for informed decision making in national livestock development (FAO, 2007a). Even if the two breeds Mbororo and Arab are not under risk of extinction (derived from FAO, 2007c) the data collected at the slaughterhouses in Chad is expected to be worth for a detailed analysis of molecular aspects of each.

The aim of this study was the molecular characterization of the two breeds including the assessment of genetic diversity within and between populations. Such a characterization is of primary interest regarding the differences in BTB prevalence of the two breeds but also in respect to the description of indigenous African cattle breeds and African cattle husbandry systems.

Material and Methods

Breeds

The genotyped animals belong to the two breeds Mbororo and Arab. All of them were kept in a long distance transhumant system by pastoralists, thereby passed the border between Chad and Central African Republic and spent the dry season in the Central African Republic. The transhumant system is the main cattle production system in Chad. Seventy five percent of the national herds are kept by pastoralists and almost 50% of Chadian export revenues are generated within this system (FAO, 2007b).

The Mbororo cattle, also known as Red Fulani, belong to the subgroup Fulani of the West African Zebu cattle. In Chad a population size of 300 000 heads was reported in year 1992 (FAO, 2007c). This breed has long, lyre-shaped horns and a thoracic, sometimes intermediate hump (FAO, 2007c) (figure 6.1). The lactation yield is poor with 2 kg of milk per day at the peak of lactation (FAO, 2007b). The carcass dressing out is low (40% - 42%), but FAO (2007b) reported the good quality of the breed's hides for leather production. The breed is robust and adapted to different climates, i.e. the breed is kept in dry as well as humid regions of Chad (FAO, 2007b).



Figure 6.1: Mbororo cattle (in red) at the slaughterhouse in Chad (photo Ngandolo B.N.R.)

The Arab zebu (or Shewa) has a well developed dewlap and short horns (Zibrowski, 1997). Coat colour is red – maroon in the sahel-zone and predominantly white in the south-east and west (FAO,

2007b). Figure 6.2, shows some Arab animals from Chad before slaughter. Milk yield per lactation varies from a minimum of 454 kg to a maximum of 1814 kg and lactation length varies from 240 to 396 days (derived from DAGRIS, 2007). Other than the entirely deserted regions, the breed is kept in all other regions of Chad. It is estimated, that 75% to 90% of Chadian cattle belong to this breed (FAO, 2007b). A population size of 4 902 000 heads was reported in year 1992 (FAO, 2007c).



Figure 6.2: Arab cattle at the slaughterhouse in Chad (photo Ngandolo B.N.R.).

Genotyping

Blood samples were taken from animals before slaughter at three different abattoirs in Southern Chad. Additionally, information about the breed, the age, sex, the transhumance system, borders passed, the residence during dry season and the location of the slaughter house of each individual was recorded. The age structure and gender of the sampled individuals are shown in table 6.1.

Blood was allowed to clot, transported on ice to the Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques in Farcha and stored at -80°C until further processing. DNA was extracted using the QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Cat. No. 51106) from clotted blood corresponding to 238 individual animals.

Table 6.1: Age structure and average age of the sampled individuals (grouped by sex and breed).

	sex	N	age (mean)	Number of animals per age class (years)										
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Arab	male	34	4.206	6	4	6	2	6	3	3	2	2	0	0
	female	97	6.701	2	1	3	6	6	20	26	21	9	1	2
Mbororo	male	38	3.079	2	18	7	4	4	0	2	1	0	0	0
	female	36	5.611	1	5	3	2	2	6	9	7	1	0	0

Handling was carried out according to the Blood and Body Fluid Spin protocol (derived from Qiagen, 2007). DNA was transported to Europe where genotyping was conducted by Van Haeringen Laboratories, Wageningen, Netherlands. All micorsatellites were chosen from the FAO-list (FAO, 2004).

A remarkable degradation of the DNA was observed over time. This problem caused a high fraction of missing genotypes, especially for the most recent genotyped multiplexes. Markers for individuals with missing information for seven and more markers were omitted from further analysis. Finally, 205 genotypes (131 Arab and 74 Mbororo) for 21 micorsatellites were included for statistical analysis.

Statistical analysis

For the statistical investigations the packages ARLEQUIN 3.01 (Excoffier *et al.*, 2005), STRUCTURE 2.1 (Pritchard *et al.*, 2000) and FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 1995) were applied. Deviation from Hardy – Weinberg - Equilibrium (HWE) was tested for each locus in each population using ARLEQUIN (number of steps in MCMC = 100 000). The significance level was set to *P-value* <0.001.

FAO - markers are assumed to be selectively neutral and to segregate independently from other loci (FAO, 2004). In ARLEQUIN a likelihood ratio test of linkage disequilibrium is implemented for genotypic data with unknown gametic phase. This test was conducted on the data setting the number of permutations to 10 000 and the significance level to 0.05.

The number of alleles per locus, the average number of alleles per breed, the observed and expected heterozygosity per locus and breed were calculated as indicators for the genetic variability within the two breeds. The relevant results were part of the testing on HWE with ARLEQUIN. Further breed specific alleles (i.e. private alleles) were counted.

FSTAT (Goudet, 1995) was used for the assessment of Wrights fixation indices and the respective standard errors. Further, the computations given in ARLEQUIN to conduct population comparisons

and population differentiation were conducted. Additionally genotype assignment was derived with this package.

Clustering analysis was conducted with STRUCTURE 2.1 (Pritchard *et al.*, 2000). The length of burning period for the MCMC was set to 10 000 with 100 000 replications after burning. The number of clusters was varied from 2 to 5.

Results

Information content of markers and genetic variability within populations

Table 6.2, gives an overview of the genotyped markers, the number of individuals with a genotype (N), the number of observed alleles, the fraction of animals with missing genotypes, the observed heterozygosity and the expected heterozygosity and the respective *P-value* for HWE-testing for the two populations, Arab and Mbororo, separately.

Genetic diversity between populations and cluster analysis

The total degree of population subdivision according to Weir and Cockerham (1984) was found to be:

$$F_{IT} = 0.042 (\pm 0.008),$$

$$F_{ST} = 0.006 (\pm 0.002),$$

$$F_{IS} = 0.037 (\pm 0.008).$$

Figure 6.3, shows the results for the genotype assignment implemented in ARLEQUIN. The program calculates the log-likelihood of each genotype under the assumption that it belongs to the respective population.

The results of the clustering analysis assuming two clusters are given in figure 6.4. The number of clusters (k) investigated is user defined. The k resulting in the highest logarithmic probability is seen as the most probable number of subpopulations. For our data the highest log-likelihood was found for k=2.

Table 6.2: Number of genotypes (N), number of alleles, fraction of missing genotypes observed heterozygosity, expected heterozygosity and p-value for HWE-testing for the Arab sample and the Mbororo sample, respectively.

Marker	ARAB (131)							MBORORO (74)						
	N	alleles	Missing (%)	obs_het	exp_het	p-value	N	alleles	Missing (%)	obs_het	exp_het	p-value		
BM1818	129	9	1.5%	0.814	0.813	0.894	69	9	6.8%	0.783	0.844	0.238		
BM1824	131	7	0.0%	0.672	0.746	0.003	74	4	0.0%	0.703	0.743	0.910		
BM2113	131	8	0.0%	0.771	0.827	0.809	74	9	0.0%	0.824	0.822	0.734		
CSRM60	131	10	0.0%	0.595	0.568	0.677	74	8	0.0%	0.541	0.610	0.202		
CSSM66	131	11	0.0%	0.771	0.832	0.322	74	9	0.0%	0.757	0.838	0.006		
ETH10	129	8	1.5%	0.798	0.769	0.382	74	8	0.0%	0.797	0.803	0.237		
ETH225	129	9	1.5%	0.605	0.635	0.725	74	8	0.0%	0.689	0.714	0.341		
ETH3	131	8	0.0%	0.618	0.600	0.504	74	7	0.0%	0.514	0.553	0.842		
HAUT27	113	7	13.7%	0.664	0.744	0.374	66	7	10.8%	0.727	0.746	0.797		
ILSTS006	126	10	3.8%	0.651	0.687	0.631	70	10	5.4%	0.786	0.750	0.654		
INRA23	130	12	0.8%	0.708	0.745	0.526	74	10	0.0%	0.595	0.665	0.281		
SPS115	131	7	0.0%	0.496	0.497	0.810	74	7	0.0%	0.338	0.348	0.766		
TGLA122	126	14	3.8%	0.683	0.716	0.154	72	11	2.7%	0.722	0.704	0.686		
TGLA126	131	8	0.0%	0.786	0.755	0.756	74	8	0.0%	0.716	0.756	0.055		
TGLA227	131	10	0.0%	0.618	0.621	0.287	74	11	0.0%	0.500	0.572	0.223		
TGLA53 ¹	93	16	29.0%	0.763	0.787	0.747	60	15	18.9%	0.567	0.768	0.002		
ETH152	131	6	0.0%	0.511	0.525	0.827	73	5	1.4%	0.507	0.527	0.815		
ETH185	129	14	1.5%	0.806	0.823	0.478	74	11	0.0%	0.662	0.757	0.282		
HEL5 ¹	96	7	26.7%	0.573	0.770	0.000	52	6	29.7%	0.500	0.751	0.000		
ILSTS005	121	6	7.6%	0.760	0.792	0.386	71	5	4.1%	0.732	0.752	0.895		
INRA32	126	10	3.8%	0.714	0.826	0.033	72	10	2.7%	0.806	0.815	0.949		
INRA35	128	8	2.3%	0.500	0.534	0.091	71	7	4.1%	0.577	0.671	0.004		
MM12	131	14	0.0%	0.832	0.839	0.962	74	11	0.0%	0.838	0.859	0.489		
Mean²		9.3		0.684	0.709			8.3		0.672	0.707			
SD²		2.5		0.106	0.113			2.1		0.133	0.127			

¹ excluded

² after exclusion of markers TGLA53 and HEL5

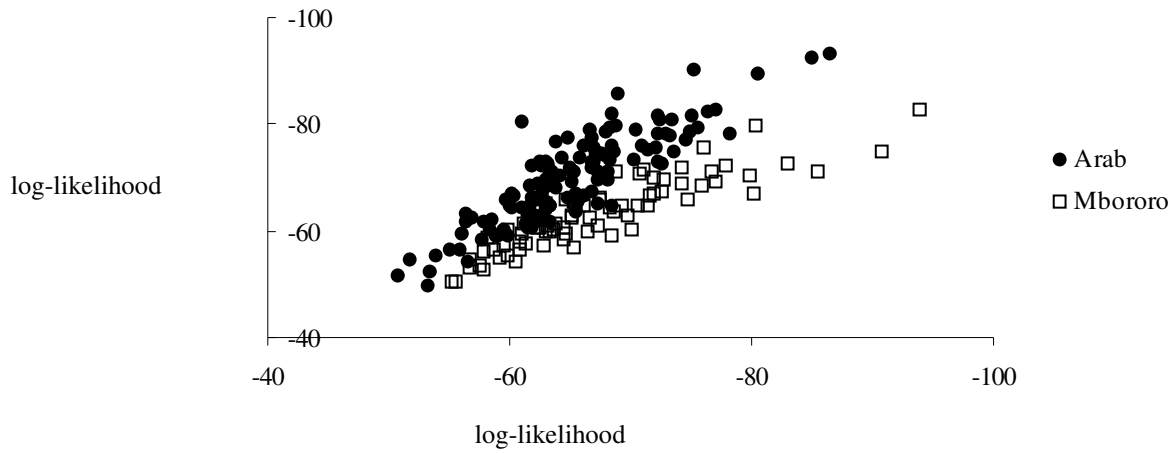


Figure 6.3: Log-likelihood of each individual's multilocus genotype in the population sample Arab and Mbororo, respectively, assuming that it comes from this population.

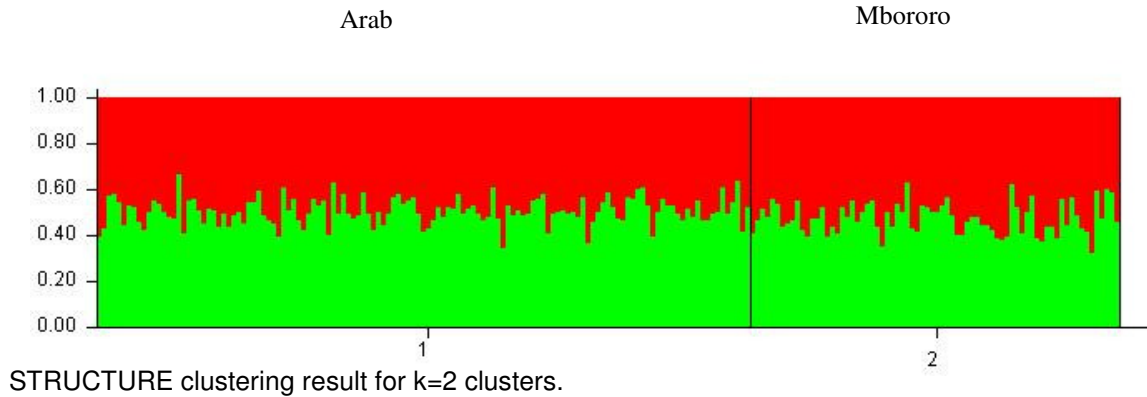


Figure 6.4:

Discussion

Information content of markers and genetic variability within populations

Marker HEL5 significantly deviates from HWE and was therefore excluded from further analysis. Further, TGLA53 was omitted, as its fraction of missing genotypes was above 20%. After exclusion of the above mentioned markers, 205 individual genotypes for a total of 21 microsatellites remained for further analysis (table 6.2).

Testing on linkage disequilibrium revealed that for each population three pairs of loci do not segregate independently ($p < 0.001$) (results not shown). However, as all of the markers in linkage disequilibrium are mapped to different chromosomes, the markers are informative regarding diversity studies and are not excluded from further analysis (Peter, 2005).

The number of alleles per locus ranged from 4 up to 14. The minimum was found in the Mbororo sample at the loci BM1824, the maximum at the three loci TGLA122, ETH185 and MM12 of the Arab sample (table 6.2). These findings show that the two populations are polymorphic for all of the 21 loci under investigation. The chosen loci all fulfil the rule of thumb given by FAO, that markers for diversity studies should segregate with at least 4 alleles per population (FAO, 2004). The mean number of alleles was $9.3 (\pm 2.5)$ for the genotypes belonging to the breed Arab and $8.3 (\pm 2.1)$ for the genotypes belonging to the Mbororo breed, averaging $8.8 (\pm 2.3)$ (table 6.2) for the total sample.

Twenty eight alleles at 13 loci out of the 203 alleles were found to be so called private alleles (results not shown). A private allele is defined as an allele found in one population but in no other (Woolliams and Toro, 2007). In our study the highest frequency of a private allele was 2.8% only. Thus, their influence on differences in the allelic frequencies between populations is expected to be low.

The average observed heterozygosity was found to be $0.684 (\pm 0.106)$ in Arab and $0.672 (\pm 0.133)$ in Mbororo, respectively. The average expected heterozygosity was $0.709 (\pm 0.113)$ for population Arab, and $0.707 (\pm 0.127)$ for the population Mbororo (table 6.2). The mean number of alleles per locus and the expected heterozygosity are seen as informative measures for the assessment of genetic diversity within populations (Hanotte and Jianlin, 2005; Toro and Caballero, 2004). The mean number of alleles per locus found in the present study is lower than the 11.5 alleles per microsatellite locus observed by Ibeagha-Awemu *et al.*, (2004) in west/central African cattle breeds. The expected heterozygosity for the nine *Bos indicus* breeds investigated by Ibeagha-Awemu *et al.*, (2004) ranged from 0.703 – 0.744. Our estimates correspond with the lower end of this range.

Generally, it has to be questioned if the samples drawn for our study reflect random samples from the Mbororo and Arab breed. The number of animals sampled is adequate, however, the animals were all kept in one region of southern Chad and the size of the two samples was not equal. A balanced affiliation of both sexes is not given for the Arab sample (table 6.1). Further, the animals from a pastoralist system arriving at abattoir do not necessarily cover all age classes of a population (Table

6.1). For both breeds the average age of the sampled cows is about 2.5 years higher than the average age of the sampled bulls (table 6.1). Considering bulls, animals from the older age classes (> 6 years) are under represented in both breeds, indicating that the majority of bulls are slaughtered in younger years (table 6.1). Older animals might have undergone selection as they had to survive dry season, long treks, disease pressure and other forces arising within this system. Due to these various factors, the assumption of two random samples can not be warranted.

Genetic diversity between populations and cluster analysis

The F_{ST} indicates that the genetic diversity between the two samples is very low. A high proportion of the F_{IT} is accounted for by the within-heterozygote deficiency (F_{IS}). The low F_{ST} is seen as a first incidence, that it might be hard to elaborate genetic differences between the samples of Mbororo and Arab cattle.

The distributions of the log-likelihoods for the genotype assignment shown in figure 6.3 overlap to a certain amount. Again it is not possible to clearly distinguish between the two populations. This result was further confirmed with the exact test of population differentiation implemented in ARLEQUIN (results not shown). The differentiation test between all samples revealed in P -value > 0.05, i.e. based on the genotypic information, the two populations do not significantly differ.

The algorithm implemented in STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) constructs genetic clusters from a collection of individual multilocus genotypes. Therefore the fraction of each individual's genotype that belongs to each cluster is estimated (Rosenberg *et al.*, 2001). It identifies sub-populations which differ in their allele frequencies.

The bars in figure 6.4 show that for none of the 205 individuals the genome can be clearly assigned to the Arab cluster or the Mbororo cluster. Furthermore, no relation between the participation of an individual's genome fraction and its initially assigned population (x-axis in figure 6. 4) was found.

Rosenberg *et al.*, (2001) showed that the power of clustering depends on the variability of markers, the number of markers and the number of individuals genotyped. For less diverged populations they propose to genotype more than 12 - 15 markers for 15 - 20 individuals of the hypothetical populations to get accurate clustering results. For our data those recommendations are fulfilled. Therefore the clustering results further support that the samples under investigation do not reflect genetically different populations.

Before slaughtering the sampled individuals were phenotypically assigned to the two breeds Mbororo and Arab. Even if relying on different individuals sampled the reported differences in BTB prevalence between the two breeds (Hilty, 2006) lead to the hypothesis, that genetic differences exist and might become obvious investigating the molecular diversity. However, the analysis of the samples investigated here and the chosen microsatellites do not support this hypothesis. Those findings are somewhat unexpected. They might be explained with effects regarding the sampling of animals kept in

transhumance systems. Unfortunately, no data about the herd affiliation was available. As already mentioned above, different age structures were observed between sexes. There is a certain chance that “old” female individuals (5 to 8 years) are the ones that survived for example BTB infection and are therefore over represented in both samples. Such sampling effects can result in diminished differences between breeds.

Mbororo and Arab animals are kept by nomadic pastoralists of two different ethnic groups, where cattle breeds are named after them. This connection appears to be rather loose and both groups often keep Arab and Mbororo cattle inter-mixed in their herds (Dr. C. Diguimbaye-Djaibe and B.N.R. Ngandolo, personal communications). Another possibility is that migration of animals between herds and breeds occur. These aspects support the rejection of the hypothesis due to population admixture. Admixture between populations homogenizes allele frequencies between populations. Therefore, the exploration of differences in allele frequencies between admixed populations does not lead to significant testing results. This conclusion is further supported by the Country Report of Chad (FAO, 2007b) which records, that important admixture between Arab and Mbororo exists.

Based on our study, we fully support the statement, that sample collection is the most important step in any diversity study (FAO, 2007a). In extensive production system the lack of pedigree information (Eding and Meuwissen, 2001; Ruane, 1999) may hamper the collection of representative samples. To overcome this difficulty a well planned data collection and the collection of additional information like herd affiliation, records of geographical coordinates and photo documentation of sampling sites, animals and flocks are highly recommended (FAO, 2007a). Otherwise, the interpretation of genotyping results and statistical analysis become hard and loose the explanatory power.

Conclusions

Considering phenotypes solely, one would have presumed the samples represented two different breeds. However, our study does not confirm genetic differences between the two samples. Here, the potential of genetic characterization studies in extensive systems becomes obvious. The presented results increase information about cattle breeds kept in pastoralists system and support that regular admixture between the two breeds occurs.

Collecting sample at slaughterhouses for semi-feral populations seems promising in comparison with the complex collection of field samples. Nevertheless, careful sample collection procedure remains the most important step. In this context the need for supplementary information (description of the breeds, herd information, information about herd management etc.) is underlined. For this purpose, the pastoralists arriving at slaughterhouse might be asked to fill in a questionnaire. Future research also requires investigations on cattle husbandry and herding practises of African pastoral communities where very little information is available. No detailed information about the influence of non-genetic factors on differences in disease prevalence (i.e. BTB) between breeds is available.

Increased information about the genetic composition of breeds as well as their production system allows for better understanding of pastoralists system in general and of specific threats - such as zoonotic diseases – arising within such systems.

Acknowledgements

This study is part of an overall SNF project. SNF is acknowledged for financial support. Stefan Rieder and two independent referees are acknowledged for their comments on earlier versions of this manuscript.

References

Ayele, W. Y., Neill, S. D., Zinsstag, J., Weiss, M. G., & Pavlik, I. (2004). Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 8, 924-937.

Cosivi, O., Grange, J. M., Daborn, C. J., Raviglione, M. C., Fujikura, T., Cousins, D., Robinson, R. A., Huchzermeyer, H. F., de K., I., & Meslin, F. X. (1998). Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 59-70.

DAGRIS, 2007. Domestic Animal Genetic Resources Information System (DAGRIS). (eds. J.E.O. Rege, O. Hanotte, Y. Mamo, B. Asrat and T. Dessie). <http://dagris.ilri.cgiar.org/>, International Livestock Research Institute, Addis Ababa, Ethiopia.

Eding, H., & T. H. E. Meuwissen. 2001. Marker-based estimates of between and within population kinships for the conservation of genetic diversity. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 118: 141-159.

Excoffier, L., G. Laval, & S. Schneider. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis *Evolutionary Bioinformatics Online*.

FAO. 2007a. The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture, B. Rischkowsky and D. Pilling (eds.), Rome, Italy, pp 511.

FAO. 2007b. The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture - annex: Country report chad. B. Rischkowsky and D. Pilling (eds.), Rome, Italy, pp 511.

FAO. 2007c. Domestic animal diversity information system (DAD-IS). <http://dad.fao.org/>, FAO, Rome, Italy.

FAO. 2004. Secondary guidelines for development of national farm animal genetic resources management plans, Rome, Italy, pp 55.

Goudet, J. 1995. Fstat (version 1.2): A computer program to calculate f-statistics. *Journal of Heredity* 86: 485-486.

Hanotte, O., & H. Jianlin. 2005. Genetic characterization of livestock populations and its use in conservation decision-making. In: The Role of Biotechnology for the characterization and conservation of crop, forestry, animal and fishery genetic resources. FAO Workshop, Turin, Italy.

Hilty, M. 2006. Molecular epidemiology of mycobacteria: Development and refinement of innovative molecular typing tools to study mycobacterial infections, Universität Basel, Basel, Switzerland, pp 157.

Ibeagha-Awemu, E. M., O. C. Jann, C. Weimann, & G. Erhardt. 2004. Genetic diversity, introgression and relationships among west/central african cattle breeds. *Genetics Selection Evolution* 36: 673-690.

Peter, C. 2005. Molekulargenetische Charakterisierung von Schafrassen Europas und des Nahen Ostens auf der Basis von Mikrosatelliten, Justus-Liebig-Universität, Giessen, Germany, pp 160.

Pritchard, J. K., M. Stephens, & P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.

Qiagen. 2007. Qiagen: sample and assay technologies. <http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000190>.

Rosenberg, N. A., Burke, T., Elo, K., Feldman, M. W., Freidlin, P. J., Groenen, M. A. M., Hillel, J., Mäki-Tanila, A., Tixier-Boichard, M., Vignal, A., Wimmers, K. & S. Weigend. 2001. Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds. *Genetics* 159: 699-713.

Ruane, J. 1999. A critical review of the value of genetic distance studies in conservation of animal genetic resources. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 116: 317-323.

Toro, M., & Caballero. 2004. Characterisation and conservation of genetic diversity between breeds. In: Proceedings 55th EAAP Annual Meeting, Bled, Slovenia.

Weir, B., & C. Cockerham. 1984. Estimating f-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 12.

Woolliams, J., & M. Toro. 2007. Chapter 3. What is genetic diversity? In: Utilisation and conservation of farm animal genetic resources. Wageningen Academic Publishers, Netherlands, 55-74.

Zibrowski, D. 1997. Atlas d'élevage du bassin du lac tschad / livestock atlas of the lake chad bassin. CIRAD-EMVT, Wageningen, Netherlands, 79-80.

6.2. Diagnostics Ante et Post Mortem de la Tuberculose Bovine au Sud du Tchad: cas des bovins destinés à l'abattage.

B.N. Ngandolo¹ C. Diguimbaye-Djaibé¹ B. Müller² L. Didi¹ M. Hilty² I. Schiller⁵ E. Schelling⁽²⁾ B. Mobeal⁶
B. S. Toguebaye⁴ A. J. Akakpo³ J. Zinsstag²

Correspondance: NGANDOLO BONGO Naré,
Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha (LRVZ de Farcha):
BP: 433 N'Djamena Tchad
Tel: (+235) 66 23 05 24
Fax: (+235) 252 37 22
Email: bongo_nov@yahoo.fr

1. Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha (LRVZ) de Farcha :
BP: 433 N'Djamena Tchad
Tel: (+235) 252 74 75 ou (+235) 252 74 76

2. Institut Tropical de Santé Publique Suisse:
PO Box CH-4002 Bale, Suisse, Département d'Épidémiologie et de Santé Publique
Tel: ++ 41 (0) 61 284 81 39
Fax: ++ 41 (0) 61 284 81 05

3. Ecole Inter – Etat des Sciences et Médecines Vétérinaire de Dakar (EIESMVD), Département de microbiologie.
BP : 5077- Dakar – Sénégal.
Tel : (+221) 861 10 18 / (+221) 825 42 83

4. Université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD), Faculté des Sciences et Techniques, Département de Biologie Animale.
Tel : (+221) 558 30 47
Fax : (+221) 824 63 18

5. PRIONICS AG WAGISTRASSE 27A
PO Box CH-8952 SCHLIEREN SWITZERLAND
Tel: + 41 44 200 20 00
Fax: +41 44 200 20 10
WWW. PRIONICS.CH

6. Société Moderne des Abattoirs / Abattoir Frigorifique de Farcha (SMA / AFF)
BP : 177 N'Djamena Tchad
Tel: (+235) 252 98 61
Fax: (+235) 252 72 08

***Article publié dans la Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux,
2009, 62 (1) : 5 - 12.***

Résumé

Entre juillet et novembre 2005, nous avons contrôlé en ante et post mortem 919 bovins issus des élevages transhumants et destinés à l'abattage à Sarh (Tchad) afin d'identifier des suspicions relatives à la tuberculose bovine (TBB). Ces animaux appartenaient essentiellement aux races locales Arabe (639) et Mbororo (280), dont 595 femelles et 324 mâles, âgés de 1 à 11 ans et répartis dans quatre classes d'âge. En ante mortem, l'examen clinique et le test Intradermo-tuberculation Comparative (IDC) ont été effectués. Le diagnostic post mortem (DPM) a été constitué par l'Inspection en abattoir et la microscopie pour la recherche des bacilles acido-alcool-résistants (BAAR). L'IDC a révélé 95 réagissants (10,3 p. 100) et 102 réactions douteuses (11 p. 100). Par ailleurs, cent neuf carcasses (abats) ont été suspectées de tuberculose et les lésions collectées, traitées et colorées au Ziehl-Neelsen ne contenaient des BAAR que dans 47, 7 p. 100 des cas. L'IDC et le DPM ont unanimement prouvé la susceptibilité à la TBB de la race Mbororo ainsi que celle des animaux âgés de 4 à 9 ans. En dépit de la discordance entre les deux méthodes de diagnostic, la combinaison de leurs résultats a permis d'identifier 130 cas dans l'échantillon contrôlé, dont la moitié était âgée de 7 à 9 ans.

Mots-clés: Tchad, bovin de boucherie, test cutané, tuberculine, Inspection de viande.

Introduction

Le Tchad, comme la plupart des pays sahéliens d'Afrique est un pays à vocation agropastorale où l'élevage représente 15 p. 100 du Produit Intérieur Brut (PIB). Le cheptel tchadien est estimé à 16 897313 têtes dont 6 475 051 bovins (24). Le mode d'élevage des bovins est essentiellement transhumant. La viande bouchère consommée dans les grandes villes tchadiennes provient surtout de ces troupeaux.

L'approvisionnement des centres urbains en viande bovine augmente lors des séjours des pasteurs nomades autour des villes. Cet approvisionnement est organisé par les groupes d'opérateurs que sont les bouchers qui achètent les bovins sur les marchés à bétail puis les font abattre dans les abattoirs ou les aires d'abattage. Entre le marché et l'abattoir, ces animaux ne sont soumis à aucun examen ante mortem, c'est généralement, après l'abattage, que les carcasses sont inspectées à l'abattoir. Ainsi l'inspection post mortem ne permet d'éliminer que les carcasses et abats, porteurs de lésions avérées comme dans le cas de la tuberculose.

La TBB est une zoonose majeure et cause de sérieux problème en santé publique. La consommation de lait et de la viande provenant de bovins infectés par la tuberculose, peut être à l'origine de contamination humaine (18). La surveillance de la TBB aux abattoirs a fait l'objet de plusieurs travaux au niveau du Tchad (13, 15, 20) qui ont confirmé l'existence de la maladie au moyen de techniques de plus en plus élaborées (13), et permis d'identifier du *Mycobacterium bovis* dans un quart des bactéries isolées (bacilles acido-alcoolo-résistants: BAAR). Au cours de cette étude, 10000 bovins ont été examinés dont 7,3 p. 100 ont été suspectés porteurs de lésions tuberculeuses. Ces résultats démontrent l'importance de la TBB au sein du cheptel bovin tchadien.

Le dépistage de la maladie dans les troupeaux par le test de tuberculination n'est pas systématique au Tchad, alors qu'il constitue le diagnostic de référence de la tuberculose en ante mortem. Néanmoins, dans le cadre d'études ponctuelles sur la TBB, des tests de tuberculination ont été effectués et ont révélés des prévalences de 0.8 p. 100 et 16.9 p. 100 (13). Des 55 pays africains, seuls sept (Afrique du Sud, Algérie, Burkina Faso, Cameroun, Maroc, Namibie et Zambie) utilisent les tests tuberculiques et l'inspection post mortem pour la surveillance de la TBB (10). L'utilisation de ces deux méthodes de diagnostic de la tuberculose sur un même échantillon destiné à la consommation n'a jamais fait l'objet d'une étude au Tchad.

L'objectif du présent travail a été d'estimer le taux de prévalence de la tuberculose chez les bovins issus des élevages transhumants abattus à l'abattoir privé de Sarh en utilisant les deux méthodes de diagnostic: l'Intra – dermo - tuberculination comparative (IDC) et le diagnostic post mortem (DPM). Il s'agit également d'une étude de faisabilité qui permet d'identifier les principaux indicateurs démographiques et d'assainissement des bovins tuberculeux dans des troupeaux transhumants.

Matériels et Méthodes

Zone d'étude

Cette étude a été menée entre juillet et novembre 2005 à Sarh, ville située à 600 km de la capitale N'Djamena au Sud du Tchad, région frontalière avec la République Centrafricaine (RCA). Sarh se trouve dans la zone climatique soudanienne couverte de savane arbustive et de forêt claire dominées par les légumineuses et les combrétacées. Grâce à cette végétation, elle dispose de ressources indispensables pour l'hivernage des troupeaux venant des zones sahéliennes du centre (17). Le test IDC a été effectué dans l'enclos du marché à bétail situé au Sud-ouest de Sarh (Maïngara). L'inspection des carcasses et des abats a eu lieu à l'Abattoir Privé du Groupement des Bouchers de Sarh (APGBS) situé au nord-est de ladite ville en bordure du fleuve Chari.

Animaux

Neuf cent vingt neuf (929) bovins destinés à l'abattage ont été échantillonnés. Les animaux provenaient tous de troupeaux transhumant entre la République Centrafricaine (RCA) et le centre du Tchad en passant par Sarh. L'échantillonnage n'a été possible qu'après un consensus trouvé entre le Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha (LRVZ / Farcha) et le groupement des bouchers de Sarh sur la base de compensation financière afin de maintenir les animaux pendant 72 heures dans l'enclos du marché à bétail après inoculation des tuberculines. Ces animaux n'ont jamais subi le test IDC auparavant. Chaque animal a été identifié par une boucle à l'oreille puis les données zootechniques sur les animaux (race, sexe et âge) ont été enregistrées. La détermination de l'âge a été effectuée par la lecture de la table dentaire.

Examen clinique

Il a consisté en une appréciation à vue d'œil de l'état d'embonpoint des animaux, en la palpation des ganglions lymphatiques, organe lymphoïde périphérique et lieu de développement de la réaction immunitaire contre toutes infections. Des cas d'ectoparasitisme constatés et d'autres infections susceptibles de provoquer une réaction ganglionnaire ont été également enregistrés. Trois états d'embonpoint ont été spécifiés: le bon, le mauvais et le très mauvais.

Le test Intra - dermo - tuberculation comparative (IDC)

Le test IDC a été réalisé en utilisant les tuberculines *M. bovis* (PPD Bovina N° 812) et *M. avium* (PPD avian N° 814) de l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (Perugia, Italie). Les tuberculines ont été injectées dans l'épaisseur du derme de l'encolure à raison de 1 Unité Internationale (UI), 0,2 ml pour *M. avium* et 0,1 ml pour *M. bovis*. Une première mensuration du pli

cutané a été effectuée au niveau de chaque site à l'aide d'un pied à coulisse et enregistrée. La tuberculine *M. bovis* a été introduite sur le côté droit du cou et la tuberculine *M. avium* sur le côté gauche. La lecture a consisté en une seconde mensuration de l'épaisseur de la peau au point d'inoculation des protéines, 72 heures après inoculation puis enregistrée sur une fiche avec l'identification individuelles des animaux (28).

Diagnostic Post Mortem (DPM)

Il a été considéré comme DPM l'Inspection post mortem à l'abattoir et la microscopie directe des échantillons de lésions au laboratoire.

L'inspection a été effectuée sur toutes les carcasses et abats provenant des bovins échantillonnés. La méthode d'inspection utilisée est celle décrite par la Division de mise en Quarantaine et d'inspection des viandes du Ministère de l'Agriculture de l'Ethiopie (34).

Elle a consisté à palper puis à inciser les organes (poumons, foies, rates, reins et mamelles) et les ganglions (pré scapulaires et inguinaux). D'autres ganglions ont été incisés lors qu'il a été constaté une lésion au niveau des tissus les recouvrant. En cas de tuberculose généralisée, la carcasse entière a été saisie. En cas d'organe infectés, elle a constitué une saisie partielle. Les lésions constatées ont été prélevées et conservées dans des flacons stériles, identifiés avec le numéro de la boucle de l'animal correspondant et placés sous glace jusqu'au LRVZ de Farcha à N'Djamena.

Les prélèvements effectués ont été préalablement nettoyés à l'eau distillée stérile avant d'être broyés à l'aide du broyeur STOMACHER 80 comme décrit par DIGUIMBAYE et coll. (13). Des frottis ont été confectionnés à partir des broyats obtenus puis colorés par la méthode de Ziehl Neelsen (ZN) (25). Les lames colorées ont été observées au microscope sous immersion pour la recherche des BAAR à l'objectif x 100. La quantification des bacilles a été faite conformément aux directives de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (26).

Critère d'identification des animaux suspects de tuberculose bovine (Cas)

Ce critère a été défini par la combinaison des résultats issus du diagnostic ante mortem (IDC) et le diagnostic post mortem (DPM). Il a été considéré comme animaux suspects de tuberculose (cas), ceux qui ont répondu aux critères suivants:

IDC+ / DPM-; IDC- / DPM+; IDC+ / DPM+ et IDC ± / DPM+

Le statut des bovins présumés indemnes de tuberculose a été IDC- / DPM-.

Analyse statistique

Les données ont été saisies en double en utilisant le logiciel Microsoft ACCESS™, comparées avec EpiInfo et analysées par le logiciel STATA 9. Le transfert des données du logiciel ACCESS au logiciel

STATA a été fait par le biais du logiciel STAT/Transfert. Le "taux de prévalence" a été utilisé comme mesure statistique pour exprimer le ratio des bovins tuberculeux identifiés par chacune des techniques de diagnostic mise en œuvre au moment de la collecte des données par rapport au nombre total échantillonné. La fréquence relative a été utilisée pour exprimer le nombre de cas ou des individus dans les classes d'âge, les sexes, les races et les différents niveaux d'embonpoint. Pour montrer si la différence de pourcentage entre les bovins tuberculeux et indemnes détectés par chacun des tests, provenaient du hasard ou bien reflétait effectivement la différence dans la population d'étude, le test de Fisher a été utilisé. L'analyse multi variée et le Likelihood Ratio Test (LRT) ont été utilisés pour la mise en évidence des facteurs significativement dépendants de la maladie. Le test de Mc Nemar a été utilisé pour évaluer la sensibilité des méthodes de diagnostic utilisées.

Résultats

Neuf cent vingt neuf (929) bovins, destinés à l'abattage étaient issus de quatre races locales: Arabe [639], Mbororo ou Peuhl [280], Bogolodjé [7] et métis [3] (23). Les bovins de races Arabe et Mbororo ont constitué l'essentiel de l'échantillon (98,9 p.100). L'analyse démographique sexe / âge a dénombré 595 femelles et 324 mâles parmi les deux races majoritaires, et sont répartis dans les quatre classes d'âge (Tableau 6.3). L'association entre le sexe et les classes d'âge a été statistiquement significative ($P < 0,001$). Les mâles ont été plus nombreux dans la classe d'âge [1 ans – 3 ans] contrairement aux femelles, plus nombreuses dans les classes d'âge [4 ans – 6 ans] et [7 ans – 9 ans]. Compte tenu de la faible fréquence de bovins des races Bogolodjé et métis, les résultats présentés ci-dessous ont été basés sur l'analyse des données relatives aux différentes méthodes de diagnostic utilisées pour la mise en évidence de la TBB chez 919 bovins appartenant aux races Arabe et Mbororo (Tableau 6.3).

Tableau.6.3: Analyses multi variées avec IDC, lésions et BAAR en tant que variables dépendantes et classe d'âge, sexe, race et embonpoint comme variables explicatives.

	IDC+				IDC±				Lésions				BAAR				
	n	n+	Pr (%)	OR	(IC)	n ±	Pr (%)	OR	(IC)	n+	Pr (%)	OR	(IC)	n+	Pr (%)	OR	(IC)
Classes d'âge	919	95	10,3		10,4 – 12,5	102	11,0		9,1 – 13,3	109	11,8		9,8 – 14,1	52	5,6		4,2 – 7,3
[1 - 3]	293	20	6,8	1		24	8,2	1		17	5,8	1		4	1,3	1	
[4 - 6]	264	37	14,0	2,3**	1.2 – 4.3	41	15,5	1,9*	1,0 – 3,6	33	12,5	2,7**	1.4 – 5.2	12	4,5	4,7*	1.4 – 15.5
[7 - 9]	351	37	10,5	1,7	0.8 – 3.3	36	10,2	2,8**	1,4 – 5,4	55	15,6	3,7***	1.9 – 7.5	34	9,7	12,3***	3.7 – 40.8
[≥ 10]	11	1	9,1	1,6	0.2 – 14.1	1	9,0	2,3	0,2 – 20,5	4	36,3	13,4***	3.2 – 55.0	2	18,2	28,7**	4.0 – 204.6
Sexe																	
Males	324	28	8,6	1		35	10,8	1		30	9,2	1		13	4,0	1	
Femelles	595	67	11,2	1,1	0.6-1.9	67	11,2	0,7	0,4 – 1,3	79	13,3	0,9	0,5 – 1,5	39	6,5	0,8	0,3 – 1,4
Race																	
Arabe	639	57	8,9	1		61	9,5	1		68	10,6	1		33	5,1	1	
Mbororo	280	38	13,6	1,8*	1.1 – 2.8	41	13,5	1,9**	1,2 – 2,9	41	14,6	1,9**	1.2 - 2.9	19	6,8	2*	1.1 – 3.7
Embonpoint																	
Bon	407	38	9,3	1		53	13,0	1		42	10,3	1		20	4,9	1	
Moyen	456	58	10,9	1,1	0.7 – 1.8	45	9,8	0,6	0,4 – 1,0	54	11,8	1,1	0,7 – 1,7	26	5,7	0,9	0,5 – 1,6
Mauvais	56	7	12,5	1,3	0.5 – 3.3	4	7,1	0,3	0,1 – 1,0	10	17,8	1,1	0,5 – 2,5	6	12,5	0,9	0,3 – 2,7

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

IDC: Intradermo-tuberculation comparative

IDC+: animaux ayant réagi positivement au test IDC

IDC±: animaux ayant présenté une réaction douteuse à l'IDC

BAAR: bacilles acido-alcool-résistants

n: taille de l'échantillon

+: animaux suspectés de tuberculose par un des tests

OR: Odds ratio

IC: intervalle de confiance

La répartition des réagissants ainsi que celle des bovins ayant présenté une réaction douteuse à l'IDC par classe d'âge, sexe, race et embonpoint est rapportée dans le tableau 6.3. L'IDC a mis en évidence 95 réagissants sur 919 soit 10,3 p. 100 (IC: 8,4 p. 100 – 12, 5 p. 100). Les fréquences relatives ont été significativement inférieures parmi les animaux Arabe (8,9 p. 100) comparés aux Mbororo (13,6 p. 100) ($p < 0.05$). Cent deux [102] réactions douteuses réparties entre les deux races ont été enregistrées, soit un taux de prévalence de 11 p. 100 (IC: 9,1 p. 100 – 13, 3 p.100). La différence entre les fréquences relatives a été également significative chez les deux races en ce qui concerne les réactions douteuses ($p < 0.05$). Les fréquences relatives des réagissants et des bovins ayant présenté une réaction douteuse ont été plus élevées dans la classe d'âge [4 ans – 6 ans]. Entre les sexes, il n'y a pas de différence significative pour les réactions à l'IDC. Par contre, la différence observée entre les deux niveaux de réaction chez les mâles a été légèrement significative ($P > 0,05$). Les résultats issus de l'IDC ont montré une liaison entre les réagissants et la dégradation de l'état d'embonpoint des animaux. Toutefois chez les bovins ayant présenté une réaction douteuse, une situation contraire a été observée. Les odds ratios des réagissants et des bovins ayant présenté une réaction douteuse dans les différentes classes d'âge et les deux races, comparés respectivement à la classe d'âge [1 an – 3 ans] et à la race Arabe ont montré qu'il y a eu plus de réagissants dans la classe d'âge [4 ans – 6 ans] et chez les bovins de race Mbororo. Les réactions douteuses ont été plus nombreuses dans les classes d'âge [4 ans – 6 ans] et [7 ans – 9 ans]. Elles ont été importantes, surtout parmi les bovins issus de race Mbororo (OR=1,9).

Sur les 919 bovins inspectés à l'abattoir, il a été enregistré 109 cas de saisies soit un taux de prévalence de 11,8 p. 100 (IC: 9,8 p. 100 – 14,1 p. 100), dont un seul cas de saisie totale. Des prélèvements ont été effectués sur 109 bovins ayant présenté au moins une lésion. Il a été aussi constaté que plus de 73 p. 100 des lésions étaient localisées dans les parties antérieures de la carcasse: la tête (ganglions de la tête), l'encolure (ganglions près scapulaire), la cage thoracique (poumons (6 / 109)) et l'abdomen (foie (9 / 109) et rate (1 / 109)). Les lésions observées dans les parties postérieures ont concerné essentiellement les mamelles (31 / 109) et les reins (1 / 109). Par ailleurs, en fonction des organes il a été notifié de la caséification au niveau de certaines lésions, notamment des ganglions pré scapulaires, mammaires, poumons, foies, et des ganglions de la tête. Les fréquences des animaux porteurs de lésions tuberculeuses chez les bovins Arabe et Mbororo étaient respectivement de 10,6 p. 100 et 14,6 p. 100. La différence entre les bovins porteurs des lésions tuberculeuses a été significative dans les deux races ($P < 0,01$). La présence de lésions tuberculeuses chez les bovins est liée à l'âge ($P < 0,01$). Aucune dépendance significative n'a été constatée entre l'état d'embonpoint des animaux et la présence des lésions. Les odds ratios des bovins porteurs de lésions suspectées de tuberculose dans les différentes classes d'âge et les deux races, comparés respectivement à la classe d'âge [1 an – 3 ans] et à la race Arabe ont montré qu'il y a eu plus d'animaux porteurs de lésions dans les trois classes d'âge consécutives et chez les bovins Mbororo (Tableau 6.3).

La microscopie directe n'a confirmé que 47,7 p. 100 (52 / 109) des suspicions faites à l'inspection d'abattoir mais elle a aussi démontré que la fréquence des animaux infectieux a augmenté avec l'âge. Le taux de prévalence des bovins infectieux (porteurs de BAAR) a été de 5,6 p. 100 (IC: 4,2 p. 100 – 7, 3 p. 100). Les animaux infectieux ont été plus nombreux parmi les bovins Mbororo comparés aux bovins Arabe ($P < 0,001$). La microscopie directe n'a pas pu confirmer une dépendance significative entre l'état d'embonpoint des animaux et la présence des BAAR. Le *odds ratios* des bovins infectieux dans les différentes classes d'âge, comparés respectivement à la classe d'âge [1 an – 3 ans] a toutefois montré qu'en dépit de l'importance des animaux infectieux dans les trois classes d'âge consécutives, le risque d'infection est plus élevé dans la classe d'âge [7 ans – 9 ans]. Comparé à la race Arabe, il a été constaté que le risque d'infection a été plus élevé avec les bovins de race Mbororo.

Le test de McNemar a révélé une importante discordance entre les résultats issus de l'IDC et ceux issus du DPM ($ddl = 1$; $\chi^2 = 16,98$; $P < 0,001$). Il a été observé que 15 bovins ayant présenté une réaction douteuse présentaient des lésions. Quatre statuts des bovins tuberculeux ont été identifiés en combinant les résultats issus de l'IDC et du DPM: IDC+ / DPM-, IDC+ / DPM+, IDC ± / DPM- et IDC - / DPM+.

L'analyse des données consignées sur le tableau 6.4 a montré que sur 79 bovins réagissants ayant présenté au moins une lésion à l'inspection (IDC+ / DPM-), aucun n'a été infectieux. Ces cas de suspicion ont été plus importants (37/79) dans la classe d'âge [4 ans – 6 ans]. Par contre 20 animaux sur 52 DPM+ n'ont pas réagi à l'IDC (IDC - / DPM+). Ces derniers étaient fréquents (12/20) dans la classe [7 ans – 9 ans]. Sur 102 animaux ayant présenté des réactions douteuses à l'épreuve de l'IDC (IDC±), 15 présentaient au moins une lésion contenant des BAAR (DPM+). Le statut de ces animaux a été défini comme étant IDC ± / DPM+. Ces derniers ont été également plus enregistrés dans la classe d'âge [7 ans – 9 ans]. Cependant 16 réagissants infectieux (IDC+ / DPM+) ont été aussi plus fréquents (11/16) dans la classe d'âge [7 ans – 9 ans]. Ainsi dans la population bovine abattue à l'abattoir privé de Sarh, la prévalence apparente des animaux suspectés tuberculeux a été de 130 sur 919 soit 14,1 p 100 (IC: 11,9 p. 100 – 16,5 p. 100).

Tableau 6.4: Statuts et répartition des bovins suspectés tuberculeux au moyen de l'IDC et du DPM en fonction des classes d'âge

Statuts					
Classes d'âge	IDC + / DPM -	IDC + / DPM+	IDC ± / DPM +	IDC - / DPM+	Total
[1 – 3]	12	0	2	2	16
[4 – 6]	37	4	1	6	48
[7 – 9]	30	11	11	12	64
[≥ 10]	0	1	1	0	2
Total	79	16	15	20	130

DPM: Diagnostic Post Mortem.

DPM+: animaux avec lésions contenant des BAAR.

DPM-: animaux sans lésion ou dépourvus BAAR.

IPM: Inspection Post Mortem.

Discussion

Notre population d'étude a été constituée uniquement de bovins de races locales dont l'alimentation est basée sur les plantes fourragères sauvages sans nutriment complémentaire. Ces bovins transhumants destinés à l'abattage n'ont jamais bénéficié de suivis sanitaires réguliers comparés à ceux des élevages intensifs modernes. Contrairement à la présente étude, des travaux du même genre réalisés en Afrique ont été dans la plus part des cas, portés sur des bovins exotiques ainsi que ceux de races locales, tous élevés pour des raisons expérimentales ou de production laitière (32, 6). Bien qu'il a été démontré que la transmission de l'agent causal de la TBB serait faible dans un système extensive d'élevage transhumant, contrairement aux systèmes intensifs (26), des pratiques favorisant cette transmission sont fréquentes et de routine dans l'élevage transhumant (29). Ce sont: le partage de pâturage et des points d'eau par des troupeaux venant de différentes zones, une forte contamination des points d'eau stagnante par du *M. bovis* provenant des matières fécales et un entassement dans les enclos pendant la nuit. Par ailleurs, l'absence d'une politique d'assainissement des troupeaux par utilisation combinée du test de tuberculination suivi de l'abattage systématique des animaux réagissant et la culture des pasteurs nomades axée sur l'élevage extensif avec l'objectif d'un nombre élevé d'animaux, à savoir conserver dans les troupeaux les animaux malades jusqu'à leur mort par suite de maladie ou de vieillesse, ont favorisé l'endémicité de la TBB dans l'élevage transhumant (29). La situation ci-dessus est similaire à celle des bovins transhumants du Tchad et les investigations précédemment effectuées dans divers campements et abattoirs ont montré que les bovins suspectés de tuberculose dans les campements par le test IDC ou bien saisis pour la même cause dans les abattoirs ont été en majorité des animaux de réforme (19). Lors de la présente étude, l'analyse par classe d'âge des bovins Arabe et Mbororo échantillonnés a montré une prédominance des veaux

et des vaches respectivement dans les classes d'âge [1 an – 3 ans] et [7 ans - 9 ans] (Tableau 6.3). Ce constat rejoint celui des études déjà effectuées à l'abattoir de N'Djamena et dans le bassin du lac Tchad en général (Cameroun, Nigeria, RCA et Tchad) montrant que la quasi-totalité des bovins de qualité bouchère consommés dans ces pays est issue des deux races précitées (18, 27). Les rares investigations relatives à la TBB et faites au Tchad ont également porté sur des bovins appartenant aux races Arabe et Mbororo.

Les résultats issus de l'IDC ont été comparés à ceux des études similaires effectuées au Tchad et dans d'autres pays africains (Tableau 6.5). Ils montrent que l'infection tuberculeuse chez les bovins transhumants et ceux issus des élevages sédentaires africains est liée aux variables "race" et "âge" comme l'ont déjà montré quelques auteurs (1, 29, 32). Les fortes fréquences de réagissants constatées chez les bovins de groupe peuhl soulèvent le problème de la susceptibilité de l'hôte à l'agent infectieux de la tuberculose et le mode d'élevage bovin au sein de ce groupe car un constat similaire a été récemment fait par Ameni et coll (1) en ce qui concerne la race exotique Holstein introduite en Éthiopie pour la production laitière. En Ouganda, il a été montré que la fréquence des bovins présentant des réactions douteuses augmente avec l'âge des sujets ayant subi l'IDC (29). À l'issue de la présente étude, il a été constaté que la probabilité de détecter les bovins présentant des réactions douteuses à l'IDC est élevée dans la classe d'âge [4 ans – 9 ans]. Cependant, il faut aussi signaler la faible différence observée entre la fréquence des réagissants et celle des bovins ayant présenté des réactions douteuses dans chaque classe d'âge. Ce résultat a montré que dans les troupeaux transhumant en zone soudanienne du Tchad, les taux de prévalence des bovins pouvant présenter une réaction spécifique et non spécifique pourraient être sensiblement les mêmes. Les réactions douteuses pourraient être le reflet de nombreuses autres maladies intercurrentes pouvant entraîner une baisse de réactivité de l'organisme (5) mais aussi de la faible sensibilité de l'IDC lorsque le seuil de positivité standard a été celui de l'Office international des Epizooties (2).

Tableau 6.5: Comparaison des résultats de l'IDC issus de la présente étude avec ceux émanant de six études antérieures.

Pays	Zones d'étude	Taille de l'échantillon (N)	Prévalences des réagissants (%)	Fréquences des réagissants par race bovine (%)				Classes d'âge à risque (an)	Références	
				Groupe Peuhl (%)	Autres races locales (%)	Race importées	Races métissées			
Tchad	Sarh (Sud)	919	10,3	Mbororo	-	Arabe	-	-	[4-6]	Présent travail
				13,6	-	8,9	-	-		
	Chari Baguirmi et Kanem (Ouest)	-	16,9	Mbororo	-	Arabe	-	-	-	(31) Shcelling et Coll., (2000)
				Sensibilité plus élevée	-	Faible sensibilité	-	-		
	Ouadaï (Est)	151	0,8	-	-	-	-	-	Âge élevé	(11) Delafosse et Coll., (2002)
Nigeria	Ibadan	171	10,5	White Fulani	-	Ndama	-	-	[2-12]	(6) Cadmus et Coll., (2004)
				23	-	14	-	-		
Cameroun	Bangangte (Ouest)	142	14,8	White Fulani	Red Fulani	-	-	métisses	[≥ 3]	(26) Nfi et Ndi, (1997)
				0	42	-	-	9,09		
Mali	Zone péri urbaine de Bamako	1087	18,58	-	-	Races locales et sujets croisés	Importées et métissées	-	[≥ 10]	(32) Sidibé et Coll., (2003)
				-	-	9,09	22,42	-		
Éthiopie	Selalle et Holeta	5424	13,5	-	-	zébus	Holstein	-	[5-9]	(1) Ameni et Coll., (2007)
				-	-	11,6	22,2	11,9		

Les résultats de l'IPM confirment ceux des auteurs ayant déjà fait des études similaires à l'ouest du Tchad (N'Djamena) qui avaient montré la prédominance des lésions tuberculeuses chez les bovins de race Mbororo comparés au bovins de race Arabe (13, 19). La variable âge a été aussi identifiée comme étant un important facteur de risque lié à la pathologie tuberculeuse. L'inspection à l'abattoir a révélé que dans 12,8 p.100 des cas, les organes qui ont présenté des lésions sont logés dans la cage thoracique (poumons) et l'abdomen (foie et rate). Nous avons aussi constaté qu'il y a eu deux fois plus de cas de lésions pulmonaire (8,25 p. 100) que des lésions hépatiques (3,66 p. 100). Le présent constat infirme celui de McIlroy et coll., (21), qui ont montré au cours de leur étude que 73 p. 100 des bovins qui ont présenté une lésion tuberculeuse pulmonaire ont aussi présenté une lésion tuberculeuse hépatique. Au niveau des mamelles, 28,4 p. 100 des cas de lésions ont été enregistrées. Ce résultat diffère des ceux de Miliano-Suazo et coll., (22) qui n'ont mis en évidence que 1,5 p. 100 de cas de lésions au niveau des pis et de Asseged et coll., (3) qui n'ont constaté aucune lésion au niveau de cet organe lors de leurs investigations. Cette forte fréquence des lésions au niveau des nodules lymphatiques mammaires pourrait constituer un risque de contamination pour les éleveurs nomades au Tchad dont l'alimentation est basée sur la consommation du lait (36) mais aussi, elle peut constituer la preuve d'une endémicité de la TBB (extra pulmonaire) dans le troupeau transhumant au sud du Tchad. Vu la forte présence des lésions pulmonaires et mammaires, nous émettons l'hypothèse que la transmission de la TBB par voie respiratoire et alimentaire est présente dans le cheptel transhumant Tchadien.

Il est toujours difficile d'identifier les BAAR dans les lésions tuberculeuses suite à une infection naturelle contrairement aux lésions expérimentalement induites chez le bétail (7). Toutefois, les auteurs comme Baron et coll., (4) ainsi que Cernoch et coll. (8), ont déjà signalé la faible sensibilité de la microscopie directe à détecter les BAAR. Ce constat a été vérifié au cours de ce travail, car l'observation microscopique des frottis issus des broyats n'a pu révéler que 52 cas de saisie sur 109 soit, 47,7 p. 100 des animaux suspectés suite à l'IPM. Ce résultat est proche de celui de Sulieman et Hamid (33) qui ont démontré par une étude similaire que, sur 120 lésions collectées dans les abattoirs du Soudan 64, soit 53,3 p. 100 contenaient des BAAR. Le résultat de la présente étude montre que, en dépit de la faible sensibilité de la microscopie directe à détecter les BAAR, 5,6 p. 100 des animaux infectieux étaient inclus dans l'échantillon étudié car seulement 52 carcasses (abats) saisies sont porteurs de BAAR sur 919 animaux échantillonnés. La fréquence relative de la présence de BAAR dans les carcasses et issues des bovins de race Arabe et Mbororo étaient respectivement de 33/639, soit 5,10 p. 100 et de 21/280, soit 7,5 p. 100. Ce résultat vient soutenir la thèse de la prédominance des bovins tuberculeux de race Mbororo dans l'échantillon étudié. La présence des BAAR ainsi mis en évidence par la microscopie dans des lésions chez de nombreux bovins de race Mbororo vient confirmer l'hypothèse d'un facteur à haut risque attribué à la variable "race". Il vient également renforcer l'hypothèse selon laquelle, la fréquence de détection des lésions suspectées tuberculeuses à l'abattoir croîtrait avec l'âge. Les animaux âgés de 4 à plus de 10 ans sont à haut risque de TBB comparés à ceux âgés de 1 à 3

ans. Il est aussi à noter que la nécrose caséuse centrale est une caractéristique des granulomes tuberculeux chez la plupart des espèces animales et a une influence importante sur l'expansion de l'infection (16). Il convient de signaler que ces lésions caséuses observées durant la collecte des échantillons pourraient avoir des effets bactéricides sur les bacilles tuberculeux (3, 7). A ce stade de l'infection, la seule alternative plausible pour confirmer l'infection tuberculeuse, serait la mise en évidence des anticorps antituberculeux au moyen des tests sérologiques (30, 35).

Il a été signalé par des études précédentes que le stress ainsi qu'une tuberculose avancée et généralisée pourraient être à l'origine d'une anergie à la tuberculine chez les bovins (12). Il a été également notifié que l'absence des BAAR dans des lésions caséifiées serait due à un effet bactéricide de la caséification (3, 34). Il est important de souligner ces particularités et de constater que la discordance entre les résultats issus de l'IDC et du DPM signalée lors du présent travail a été significative et pourrait être liée à l'effet de l'anergie post tuberculeuse et l'effet bactéricide de la caséification. En effet, il a été montré par Clifton-Hadley et Goodchild (9), qu'il existe une corrélation positive entre la réaction au test tuberculinique et la probabilité d'observer la pathologie tuberculeuse (lésion) à l'abattoir. Cependant, il faut noter que Teklu et coll. (34) ont également remarqué l'absence des BAAR dans des lésions suspectées tuberculeuses. Le présent travail montre que, en dépit des réactions non spécifiques qui pourraient affecter la fiabilité des résultats de l'IDC, 14,7 p. 100 (16 / 109) des cas suspectés de TBB à l'abattoir de Sarh pourraient effectivement représenter les infections tuberculeuses à *M. bovis*. Autrement dit, dans la population bovine destinée à l'abattage à Sarh, on pourrait s'attendre à 1,7 p. 100 (16 / 919) de cas de TBB causée par *M. bovis*. Par ailleurs, il a été également montré par Diguimbaye et coll. (14) que des mycobactéries non tuberculeuses ainsi que des polluants environnementaux ont été à l'origine des lésions similaires à celles provoquées par des infections tuberculeuses chez le bétail. Sur 52 animaux porteurs de lésions contenant des BAAR, 20 n'ont pas réagi à l'IDC. Il s'agirait là des animaux se trouvant à une phase avancée de la maladie qui aurait saturé les capacités de réaction de l'organisme (5). Il a été constaté que les réagissants non porteurs de lésions ou bien porteurs de lésion dépourvus de BAAR (IDC+ / DPM-), ont été présents dans les trois premières classes d'âge (60,77 p. 100). L'absence des BAAR dans une lésion tuberculeuse est due généralement à l'effet bactéricide de la calcification (3, 34) et cette dernière est la preuve d'un état avancé de la pathologie. Comme l'ont montré De la Rua-Domenech et coll., (12), la TBB est une maladie spectrale qui dépend de l'équilibre immunitaire de l'hôte. Cet équilibre va de la réponse immunitaire issue des médiateurs cellulaires vers celle issue des anticorps, au fur et à mesure que la pathologie évolue. Les bovins non réagissants mais porteurs des lésions contenant des BAAR (IDC- / DPM+), ont représenté 15,38 p. 100 des cas. Cependant il a été constaté plus ou moins un équilibre entre les réagissants porteurs des lésions contenant des BAAR (IDC+ / DPM+) et les bovins ayant présenté une réaction douteuse mais porteurs de lésion contenant des BAAR (IDC± / DPM+) (16 / 130 *versus* 15 / 130). Cet équilibre est plus remarquable dans la classe d'âge [7 ans – 9 ans] où les fréquences relatives issues des deux statuts ont été les mêmes

(11 / 60). Ce résultat a montré une fois de plus l'équilibre entre la réaction spécifique et non spécifique dans les troupeaux transhumants destinés à l'abattage à Sarh. Toutefois, la combinaison des deux méthodes de diagnostic (IDC et DPM) utilisées lors de la présente étude a permis de démontrer qu'un taux de prévalence de 14,1 p. 100 (130 / 919) de bovins tuberculeux se retrouverait dans la population bovine destinée à la consommation et abattue à l'abattoir privé de Sarh.

Conclusion

Notre étude ante et post mortem effectuée sur un échantillon de bovins provenant d'élevages transhumants et destinés à la consommation a mis en évidence que deux paramètres, l'âge et la race, s'avéraient être les plus importants facteurs de risque à la TBB. De ce fait, ces deux facteurs devront être pris en compte à l'avenir par le ministère de l'Élevage et des ressources animales du Tchad dans le cadre d'un projet de contrôle de la TBB.

Par ailleurs, il est à constater que, l'importante différence observée entre les taux de prévalence de la TBB mise en évidence singulièrement par l'IDC d'une part, et par le DPM d'autre part, serait liée aux constats suivants:

- la différence non significative observée entre la fréquence des bovins réagissants (IDC+) et ceux ayant présenté une réaction douteuse (\pm IDC),
- la discordance entre les résultats issus de l'IPM et ceux issus de la microscopie directe.

L'observation de bacilles tuberculeux chez 15 bovins ayant présenté une réaction douteuse nous a conduit à considérer que ces derniers étaient des animaux suspects. Par extrapolation, l'échantillon d'étude aurait comporté 130 bovins tuberculeux. Les quatre statuts tuberculeux identifiés sur les bovins ont été inégalement répartis dans les classes d'âge que nous avons définies. Les bovins âgés de 7 à 9 ans ont constitué près de la moitié des animaux suspects, d'où l'importance donnée à la variable « âge » en tant que facteur de risque quant à l'endémicité de la TBB dans les troupeaux transhumant au Tchad. La combinaison des deux méthodes de diagnostic utilisées nous a permis d'estimer que le taux de prévalence de bovins tuberculeux à l'abattoir de Sarh était d'environ 14 % et de montrer qu'une seule méthode de diagnostic n'était pas suffisante pour connaître la situation réelle de la maladie. Par conséquent, la mise au point d'un test sérologique permettant la mise en évidence des anticorps anti tuberculeux chez les bovins transhumants sera primordiale pour la mise en œuvre au Tchad d'un programme d'assainissement des troupeaux transhumants.

Remerciement

Nous remercions vivement le laboratoire PRIONICS de nous avoir fourni les tuberculines nécessaires ainsi que les consommables pour notre étude. Nos remerciements sont aussi adressés au Font National Suisse qui nous a fourni le matériel de laboratoire nécessaire durant nos investigations. Nous remercions aussi l'Equipe des techniciens du LRVZ de Farcha constituée

de Tchari Doungous, Baizina Mama et Brahim Abdelkerim dont la participation technique a été d'une importance capitale pour la réalisation de ce travail. Nos remerciements sont également adressés au Président de l'association des bouchers de Sarh, Monsieur Hel-Hadji Brahim dont l'apport et le charisme été d'une importance non négligeable durant nos collectes de données.

Bibliographie

1. AMENI G., ASEFFA A., ENGERS H., YOUNG D., GORDON S., HEWINSON G., VORDERMEIR M., 2007. High prevalence and severity of pathology of bovine tuberculosis are higher in Holsteins than in Zebu breeds under field cattle husbandry in central Ethiopia. *Clinical and Vaccine Immunology*, **14** (10): 1356 - 1361.
2. AMENI G., HEWINSON G., ASEFFA A., YOUNG D., VORDERMEIER M. 2008. Appraisal of Interpretation Criteria for the Comparative Intradermal Tuberculin Test for Diagnosis of Tuberculosis in Cattle in Central Ethiopia. *Clinical and Vaccine Immunology*, **15**: 1272 – 1276.
3. ASSEGED B., WOLDESENBET Z., YIMER E., LEMMA E., 2004. Evaluation of abattoir inspection for the diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle at Addis Ababa abattoir. *Trop. Anim. Health Prod.*, **36**: 537 – 546.
4. BARON E.J., PETERSON L.R., FINEGOLD S.M., 1994. Baily and Scott's diagnostic microbiology. In: 9th Ed. Mosby-Yearbook Inc., Missouri, p. 590 – 631.
5. BENET J.J., 2006. La tuberculose animale. In : Polycopie des Ecoles Nationales Vétérinaires Françaises, septembre 2006, 76p.
6. CADMUS S.I.B., ATSANDA N.N., ONI S.O., AKANG E.E.U., 2004. Bovine tuberculosis in one cattle herd in Ibadan in Nigeria. *Vet. Med.- Czech.*, **49**: 406 – 412.
7. CASSIDY J.P., 2006. The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. *Vet. Microbiol.*, **112**: 151-161.
8. CERNOCH P.L., ENNS R.K., SAUBOLLE M.A., WALLACE F.J., 1994. Laboratory diagnosis of mycobacterioses. In: ASM Press, Iowa, p. 1 – 36.
9. CLIFTON-HADLEY R.S., GOODCHILD A.V., 2005. The fall and rise of bovine tuberculosis in Great Britain. In: Thoen, C.O., Steele, J.H., Gilsdorf, M.F. (Eds.), *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. *Blackwell, New York*.

10. COSIVI O., GRANGE J.M., DABORN C.J., RAVIGLIONE M.C., FUJIKURA T., COUSINS D., ROBINSON R.A., HUCHZERMEYER H.F.A.K., De KANTOR I., MESLIN F.-X., 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging Infectious Disease.*, **4**: 59 -70.
11. DELAFOSSE A., GOUTARD F., THEBAUD E., 2002. Epidémiologie de la tuberculose et brucellose des bovins en zone péri-urbaine d'Abéché, Tchad. *Rev. Elev. Méd. Pays Trop.*, **55** : 5-13.
12. DE LA RUA-DOMENECH R., GOODCHILD A.T., VORDERMEINER H.M., HEWINSSON R.G., CHRISTIANSEN H.M., CLIFTON-HADLEY R.S., 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* **81**: 190-210.
13. DIGUIMBAYE-DJAIBE C., HILTY M., NGANDOLO R., MAHAMAT H.H., PFYFFER G.E., BAGGI F., HEWINSON G., TANNER M., ZINSSTAG J., SCHELLING E., 2006a. *Mycobacterium bovis* isolates from tuberculous lesions in Chadian zebu carcasses. *Emerg. Infect. Dis.* **12** (5): 769-771.
14. DIGUIMBAYE-DJAIBE C., VINCENT V., SCHELLING E., HILTY M., NGANDOLO R., MAHAMAT A.A., PFYFFER G., BAGGI F., TANNER M., ZINSSTAG J., 2006b. Species identification of non-tuberculous mycobacteria from humans and cattle of Chad. *Société des vétérinaires Suisses.* **5**: 225-276.
15. DOUTOUM AM., TOKO MA., 2002. Mycobactérioses bovines et saisies à l'abattoir de Farcha, N'Djaména. Mémoire de maîtrise es Sciences biologiques IUSTA, Abéché, Tchad, 34 p.
16. FENHALLS G., WONG A., BEZUIDENHOUT J., VAN HELDEN P., BARDIN P., LUKEY P.T., 2000. In situ production of gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor alpha mRNA in human lung tuberculous granulomas. *Infect. Immun.*, **68**: 2827 – 2836.
17. INSE / EDICEF, 1987. Géographie du Tchad, Cours moyen, 5^{ème} Ed. Paris, France, 47p.
18. KLEEBERG, H.H., 1984. Human tuberculosis of bovine origin in relation to public health. *Rev.sci.tech.Off.int. Epiz.*, **3**:11-32.

19. MAHO A., BORNAREL P., HENDRIX P., 1994. Abattage et motifs de saisie (dominantes pathologiques) aux abattoirs du Tchad: cas de N'Djaména, Ati, Bol, Mongo et Oum Hadjer. In : Rapport technique du LRVZ/Farcha, N'Djaména, Tchad, 17p.
20. MAHO A., MBAKASSE R.N., BOULBAYE N., 1999. Causes de saisies aux abattoirs du Tchad oriental. In: Actes des IIIèmes Journées Agro- Sylvo-Pastorales du LRVZ/F, N'Djaména, Tchad, 29 novembre – 03 décembre 1999, 319 p.
21. McILROY S.G., NEILL S.D., McCracken R.M., 1986. Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from respiratory tract of tuberculin reacting cattle. *Vet. Rec.* **118**: 718 – 721.
22. MILIANO-SUAZO F., SALMAR M.D., RAMIREZ C., PAYEUR J.B., RHYAN J.C., SANTILLAN M., 2000. Identification of TB in cattle slaughtered in Mexico. *Am. J. Vet. Res.*, **61** (1): 86 – 89.
23. Ministère de l'Élevage. Rapport national sur les ressources zoo génétiques du Tchad, 2003. N'Djaména, Tchad 74 p.
24. Ministère de l'Élevage et des Ressources Animales. Rapport annuel des statistiques Années 2004 - 2005. Direction des Statistiques, de la Programmation et du Suivi (DSPS), N'Djaména, Tchad, 40 p.
25. NARVAIZ DE KANTOR I., SANG J., THOMAS F., ADALBERT L., FABIO L., PIERRE-YVES N., HENS R., PEDRO V., KARIN W., 1998. In: Laboratory services in tuberculosis control, Part II de l'OMS, Genève, Suisse, 61 p.
26. NFI A.N. and NDI C., 1997. Bovine tuberculosis at the animal research antenna (ARZ) Bangangte, western province, Cameroon. *Bull. Anim. Hlth. Prod. Africa* **45**: 1-3.
27. NGANDOLO B. N., 1999. Détermination des paramètres sanguins chez le zébu (*Bos indicus*) centrafricain et incidence des saisons. Mémoire de Maîtrise. Bio., Ani., UB, Bangui, RCA, 49p.
28. OIE., 2001. Mycobacterial infections in domestic and wild animals. In: OIE. Paris, France, p. 7-331. 2001.
29. OLOYA J., OPUDA-ASIBO J., DJONNEB B., MUMA J.B., MATOPE G., KAZWALA R., SKJERVE E., 2006. Responses to tuberculin among Zebu cattle in the transhumance regions of Karamoja and Nakasongola district of Uganda. *Trop. Anim. Health. Prod.*, **38**: 275-283.

30. OM SURUJBALLI P., ROMANOWSKA A., EDWARD A.S., TURCOTTE C., MICHAEL E.J., 2002. A fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in sera. *Vet. Microbiol.*, **87**: 149 -157.
31. SCHELLING E., DIGUIMBAYE C., DAOUD S., DAUGLA D.M., BIDJEH K., TANNER M., ZINSSTAG J., 2000. La tuberculose causée par *Mycobacterium bovis* : résultats préliminaires obtenus chez les pasteurs nomades Foulbés et Arabes dans le Chari-Baguirmi au Tchad. *Sempervira CSRS.*, **8**: 44-55.
32. SIDIBE S.S., DICKO N.A., FANE A., DOUMBIA R.M., SIDIBE C.K., KANTE S., MANGANE O., KONATE B., KONE A.Z., MAIGA M.S., FOFANA M., 2003. Tuberculose bovine au Mali: résultats d'une enquête épidémiologique dans les élevages laitiers de la zone périurbaine du district de Bamako. *Revue Élev. Méd. Vét. Pays trop.*, **56** (3-4) : 115-120.
33. SULIEMAN M. S., HAMID M. E., 2002. Identification of Acid Fast Bacteria From Caseous Lesions in Cattle in Sudan. *J. Vet. Med. B.*, **49**: 415-418.
34. TEKLU A., ASSEGED B., YIMER E., GEBEYEHU M., WOLDESENBET Z., 2004. Tuberculosis lesions not detected by routine abattoir inspection: the experience of the Hossana municipal abattoir, southern Ethiopia. *Rev. Sci. Tech. OIE.*, **23** (3): 957-964.
35. THOEN C.O., HALL M.R., PETERSBURGH T.A., HARRINGTON B.S.R.Jr., PIETZ D.E., 1984. Application of a Modified Enzyme-Linked immunosorbent assay for detecting mycobacterial antibodies in the Sera of Cattle from Herd in which *Mycobacterium bovis* infection was diagnosed. In: Proceedings of the United States Animal Health Association, **87**: 603-610.
36. ZINSSTAG J., SCHELLING E., DAOUD S., SCHIERLE J., HOFMANN P., DINGUIMBAYE C., DOUMAGOUM M.D., NDOUTAMIA G., KNOPF L., VOUNATSOU P., TANNER M., 2002. Serum retinol of Chadian nomadic pastoralist women in relation to their livestock's Milk retinol and β -Carotene content. *In. J. Vitam. Nutr. Res.*, **72** (4): 221-228.

6.3. Molecular Epidemiology of Bovine Tuberculosis in Chad

B.N. Ngandolo¹ C. Diguimbaye-Djaibé¹ B. Müller² Lamireou Didi¹ I. Schiller⁵ J. Hattendorf² B. S. Toguebaye⁴ S. Berg⁶ J. G Hewinson⁶ Zinsstag² A. J. Akakpo³.

1. Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha (LRVZ) de Farcha:
BP: 433 N'Djaména Tchad
Tel: (+235) 252 74 75 or (+235) 252 74 76
2. Swiss Tropical and Public Health Institute:
Epidemiology and Public Health Department
PO Box CH-4002 Basle, Switzerland,
Tel: + 41 (0) 61 284 81 39
Fax: + 41 (0) 61 284 81 05
3. École Inter – État des Sciences et Médecine Vétérinaire de Dakar (EISMV),
Département de microbiologie
BP: 5077- Dakar – Sénégal.
Tel: (+221) 861 10 18 / (+221) 825 42 83
4. Université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD),
Faculté des Sciences et Techniques, Département de Biologie Animale.
Tel: (+221) 558 30 47
Fax: (+221) 824 63 18
5. PRIONICS AG WAGISTRASSE 27A
PO Box CH-8952 SCHLIEREN SWITZERLAND
Tel: + 41 44 200 20 00
Fax: +41 44 200 20 10
6. Veterinary Laboratory Agency, Weybridge, New Haw, Addlestone, Surrey KT153 NB United Kingdom

Corresponding author: NGANDOLO BONGO Naré,
Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha (LRVZ de Farcha):
BP: 433 N'Djaména Tchad
Tel: (+235) 6623 05 24
Fax: (+235) 252 37 22
Email: bongo_nov@yahoo.fr

In project to be published in Geospatial Health.

Summary

To date, no work has been performed to determine the presence of bovine tuberculosis (BTB) due to *M. bovis* in the southern part of Chad (Central Africa). In order to assess the real proportion of the disease among cattle and to have an overview of the strains circulated through this area, 120 specimens of suspected lesions were collected from 108 carcasses inspected at the private abattoir in Sarh (Southern Chad). The cultivation of bacteria on specific media was done at the Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha and the characterization of strains by spoligotyping method was done in Veterinary Laboratory Agency in England. Sixty nine out of 120 suspected lesions carried AFB which were distributed among 56 carcasses. Thirteen out of 108 suspected carcasses (12 %) were infected by *M. bovis* which 10 were from animals aged from 7 to 9 years. Overall, 15 spoligotypes belonged to 8 different patterns were identified among these *M. bovis* strains. This finding shows that most of the carcasses were infected by other bacteria and proves also how long the infected animals should be kept in herds of there origin. Spoligotypes patterns SB1453 and SB1454 should be specific to the transhumant corridor followed by the slaughtered cattle. However, the dominance of the spoligotype pattern SB0944 correlated with findings of works previously done in Cameroon, Nigeria and Western part of Chad.

Keywords: Molecular Epidemiology Bovine Tuberculosis Chad.

Introduction

Bovine tuberculosis (BTB) is a threat to animal and human health in several countries; its impact varies, depending on the continent and the economic status of countries. BTB is primarily an infectious disease of the respiratory system characterized by pathological changes in the lungs, associated lymph nodes, and some time, of the upper respiratory tract (J.M. Pollock *et al.* 2006). It is a prototype granulomatous inflammatory disease caused by an intracellular bacillus, *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), classically identified as acid-fast bacillus (AFB) (A. Teklu *et al.* 2004). *M. bovis* is also classified as a Risk 3 pathogen for public health. Many studies conducted in developing and developed countries, have shown that environment mycobacteria or Non Tuberculosis Mycobacteria (NTM) leads to granulomatous inflammatory apparently suspected as tuberculous lesions in cattle (A. Teklu *et al.* 2004, Franck BIET *et al.* 2005). These findings prove how difficult is to recognize macroscopically a specific tuberculous lesion due exactly to *M. bovis* during a meat inspection when carcasses are from transhumant cattle. However meat inspection is one of the main components to control this threat during a national control program. The presence of *M. bovis* among cattle has been reported from many African countries (Müller *et al.* 2008). In Chad, despite its recognition by a presidential law (Law N° 9 / PR / 04 / 2004) as one of the 33 legally well-known contagious disease in livestock, there is no national strategy for controlling BTB in cattle. Detection of the disease is restricted to macroscopic observations of lesions on carcasses or offal in a very restricted number of abattoirs and slaughter areas, without an adequate national protocol for post mortem inspection. A previous study conducted on lesions collected at the Société Moderne des Abattoirs (SMA) in N'Djamena (Central Western Chad), has shown that for a sample of 199 suspected cattle carcasses (from entire partial condemnation), *M. bovis* was identified in 56 (28%) (Diguimbaye-Djaibé *et al.*, 2006(a)). To date, no work has been performed to determine the presence of BTB in the southern part of Chad. The present study aims first to assess the real proportion of *M. bovis* in lesions suspected for BTB in the private slaughterhouse in Sarh and second, to gain an overview of spoligotypes of strains isolated from the southern part of the country with a brief insight of their close similarity with those previously described in Cameroon, Chad (N'Djamena) and Nigeria.

Material and Methods

From July to November 2005, 120 specimens of suspected bovine tuberculosis (BTB) lesions were collected from 108 carcasses out of 944 cows slaughtered at the private abattoir in Sarh (Southern Chad). The diagnosis of suspected BTB made in the abattoir was based on visual inspection of typical macroscopic lesions of organs and lymph nodes conducted during meat inspection as described by Herenda *et al.*, 1994.

Specimens were transported on ice (+4°C) from Sarh to the Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha (LRVZ – Farcha) in N'Djamena and processed as described previously by Diguimbaye-Djaibé *et al.*, (2006). A sample of 0.5 ml from each

homogenized specimen was sown in 8 ml of modified MGIT (5.9g of 7H9 Middle broth, 1.25g trypto-caseie soya broth, 1 litre of) sterile distilled water), containing Oleic Acid-Albumin-Dextrase-Catalase (OADC), PANTA and a supplement of glycerol or pyruvate. Cultures were incubated at 37°C (without CO₂) and checked once a week until observing a medium turbidity was observed. Cheking was done for a maximum incubation time of 8 weeks. Presence of AFB in turbid cultures was confirmed by smear stained using the Ziehl Neelsen method. A sample of 0.5 ml from each non contaminated AFB positive culture was centrifuged at maximum speed for 5 min, the supernatant was removed and the pellet re-suspended in 0.5 ml of sterile distilled water. The AFB were heat killed at 95°C to 100°C for 15 min in a boiling water bath and stored at – 20°C until sending to the Veterinary Laboratory Agency (VLA) for molecular typing. Spoligotyping was carried out as described by Kamerbeek *et al.* (1997). Spoligotypes were classified as *M. bovis* strains by the absence of the five last spacers (39 to 43) and belonging to the cluster including *M. bovis* BCG, by the absence of spacer number 30. Cluster analysis was done using STATA10 software.

Results

From 108 suspected carcasses (11.30%), an overall of 120 suspected lesions were collected. Ninety one percent (91%) of those lesions were detected in lymph nodes (Prescapsular, mammary, head associated, Popliteal) and the remainders, in different organs (lungs, livers and others (kidney)). Sixty nine out of 120 suspected lesions carried AFB. The latter were distributed among 56 animals. Overall, 15 spolitypes belonged to 8 different spoligotypes patterns were identified among these *M. bovis* strains (Figure 6.6): SB0944 (33.50%), SB1099 (13%), SB1104 (13%), SB0951 (13%), S1103 (7%), SB0850 (7%), SB1453 (7%) and SB1454 (7%). Missing of spacers 3, 9, 16 and 30 is the main common feature of all observed spoligotypes. The cattle slaughtered came from two main Chadian breeds (Tableau 6.6): Arab (40 / 108) and Mbororo b (68 / 108). 13 out of 108 suspected carcasses (12 %) were infected by *M. bovis* which were isolated mainly from prescapsular lymph nodes (5 / 13), mammary lymph nodes (5 / 13), lungs (3 / 13) and kidney (1 / 13). Suspected animals, aged from 1 to 11 years were distributed in four age groups as following: 17 in age group [1 to 3]; 33 in [4 to 6]; 55 in [7 to 9] and 4 in [≥ 10]. Ten of the isolated *M. bovis* belonged to animals aged from 7 to 9 years. All five mammary lymph nodes containing *M. bovis* strains were isolated from cows aged from 5 to 8 years.

Discussion

From the previous national report published by the Ministry of Livestock and Animal Resources concerning meat confiscation due to BTB in Sarh, it would appear that BTB is highly prevalent in this part of Chad (M.E, 1996). The apparent percentage (12%) of *M. bovis* strain found in our work shows that most of the observed lesions were due to other bacteria. However, this approach was previously described by studies done with specimens collected in other African abattoirs (M.Suliman and M. E. Hamid., 2002, Diguimaye-Djaibé *et al.*, 2006 (b)) and should be related to the animals husbandry and sanitary condition.

The high rate of *M. bovis* presence in relatively identical proportions in pre-capsular and mammary lymph nodes (5/13) shows that a significant proportion of the disease transmission in transhumant cattle probably occurs through feeding. However, inhalation of infectious agents was also shown by the presence of *M. bovis* in lung material. Although *M. bovis* transmission is reportedly low under such extensively managed systems compared to intensive ones (Costello *et al.*, 1998; Mensies and Neil, 2000; Morris *et al.*, 1994; Phillips *et al.*, 2003), practices that favour transmission, such as sharing of communal grazing sites and water from stagnant sources heavily contaminated with animal wastes, and overcrowding in night enclosures in the transhumance system (Oloya *et al.*, 2007) are always present. The animals among which all our samples were collected, are from a such farming system and their presence in the wetlands of Chad (southern part) was due to the recent climatic change, followed by pasture and water scarcity in the sahelian region. This area is nowadays overpopulated by animals coming from the sahelian part of Chad, they share the same pasture and water sources, and some pastoral farmers stay there during the whole rainy season before going down to the Central Africa Republic during the dry season, looking for better grazing condition.

Furthermore, keeping old animals in herds is a common practice among pastoral farmers in African countries and most infected animals were frequently observed among the older ones (Cosivi O, 1998). In our study, 10 out of 13 animals infected by *M. bovis* strains were aged from 7 to 9 years. Since BTB is a long duration disease, finding it in an important proportion in such an age group, proves how long these infected animals were kept in herds of their origins and excreting *M. bovis* in farming environment should be an unavoidable fact. Moreover, cows aged from 5 to 9, seem to be a risk factor for both human and animal health in Chad, as of transmitting *M. bovis* to both the milk and the pasture environment (Ayele *et al.*, 2004).

Table 6.6: Distribution of *M. bovis* strains isolated based on age, breed and tissue localization

Age group	Lesions / breed		<i>M. bovis</i> isolated according to tissue localization				Total <i>M. bovis</i> / breed	
	Arab	Mbororo	Pre scapular lymph nod	Mammary	Lung	Kidney	Arab	Mbororo
1 - 3	3	14	1	0	0	0	1	0
4 - 6	22	11	0	2	1	0	2	1
7 - 9	40	15	4	3	2	1	6	3
≥ 10	3	0	0	0	0	0	0	0
Total	108		5	5	3	1		13

At the national level, to compare the study done in N'Djamena by Diguimbaye-Djaibé *et al.*, (2006) with the present investigation, we have to be careful in term of sampling size difference and sampling methods which should overestimate all analysis. Indeed, for the study done in N'Djamena, 199 out of 727 condemned cattle carcasses detected among 10000 animals slaughtered in the abattoir, were randomly selected for purpose of culture and molecular typing. While for the present investigation, from a sample constituted by 944 animals slaughtered at the private abattoir in Sarh, specimens were collected on all suspected carcasses (108). On the one hand, the fact that more spoligotype patterns were observed in N'Djamena than Sarh is likely to be the consequence of the difference sampling size. On the other hand, cross border cattle movements seem to be frequent between Cameroon, Nigeria and Chad, via N'Djamena, because certain spoligotype patterns were isolated in these two bordering countries and N'Djamena, but not in Sarh (SB1025, SB0952 and SB1027). The spoligotype patterns SB1100, SB1101, SB1102 and SB0328 seem to be specific to the area around N'Djamena as they are absent in Sarh and other countries around Chad. The spoligotype patterns SB0328 and SB0850 (Haddad *et al.*, 2001) previously described in the Netherlands and France, and found again in N'Djamena (SB0328) and Sarh (SB0850) is likely to be the consequence of cattle imports during the colonial period. By contrast, spoligotype patterns SB1453 and SB1454 are most likely specific to the transhumant corridor followed by all the cattle involved in our study.

Therefore, finding of *M. bovis* spoligotypes with a missing spacer 30 in southern Chad as previously described in Cameroon, Nigeria and in Chad (N'Djamena), showed the spreading of this cluster in lake Chad basin. This is a proof that, thes *M. bovis* strains were from cattle doing annually trans-boundary movement between different countries located around this continental lake and Central Africa Republic (Figure 6.5). As reported by Alhaji (1976), most tuberculous cattle slaughtered in southern Nigeria came from the northern part of the national area and from Cameroon, Niger and Chad. Nowadays, certain animals bought in Sarh were conducted to Bongor and then sold in northern Cameroon (Yagoua) and Nigeria, with exception that all of those animals are apparently in good body condition (Information from animal traders of Sarh). In the same way, when taking into account the findings from the works done previously in Nigeria (Cadmus *et al.*, 2006), in N'Djamena (Diguimbaye *et al.*, 2006) and from our investigation, we are tempted to day to argue that practices such as transhumance and animal trade are likely to contribute to the import or export of these *M. bovis* strains with spoligotypes missing spacer 30 from one country to other and their possible restriction in Cameroon as wrote by NJANPOP-LAFOURCADE *et al.*, (2001) should be isolated from this debate. While, due to the close similarity of most of spoligotypes isolated during our work to *M. bovis* BGC, their European origin should be an unavoidable hypothesis (NJANPOP-LAFOURCADE *et al.*, 2001). In Chad, for purpose of improving local breeds, many others bovine breeds were also imported from Europe during the colonization period (V. Zeuh, 1993). Bovine tuberculosis was probably introduced in Chad during this period and its

spread through the country is likely to have been due to the transhumance movement. However, the dominance of strains with spoligotype SB0944 in Cameroon, Chad and Nigeria and its close similarity with *M. bovis* BCG are consistent with its European origin in the way that, at one point of time during the colonization period, each of those African countries, has imported cattle from Europe (NJAMPOP-LAFOURCADE *et al.*, 2001, CADMUS *et al.*, 2004, Zeuh 1993). To improve understanding of the role of cattle movement in the spreading of strains sharing a common evolutionary origin with *M. bovis* BCC, spoligotypes SB1453 and SB1454 in Lake Chad basin, further work is required in Central Africa and Southern Sudan.

Conclusion

This study allowed us to prove the presence of BTB among cattle in Southern Chad for the first time and to identify two main factors that are likely to be related to the endemic character of the disease in transhumant herds. Their factors are the current transhumant husbandry system and specific practices such as keeping infected old animals in the herds for a long time. To reduce the transhumant aspect of Chadian livestock husbandry, the Ministry of Livestock and Animal Resource should encourage development of sedentary farms based on grants which would allow farmers to obtain water and produce fodder. A national BTB control program based on tuberculin testing should be established by the Chadian government to detect early infection in cattle. In terms of an integrated control, sub regional institutions such as Comité Permanent Inter-Etats de Lutte contre la Secheresse dans le Sahel (CILSS), Pôle Régional de Recherche Appliquée au Développement des systèmes Agricoles (PRASAC) and Commission Economique du Betail, de la Viande et des Ressources Halieutiques (CEBEVIRHA) should be involved as partners to implement a powerful and regional intervention.

Acknowledgments

We thank the Swiss National Science Foundation, PRIONICS and Wellcome Trust for supporting this work until its achievement. Our gratitude also goes to the technical support provided by the BTB team in Zurich (Switzerland) and Veterinary Laboratory Agency, Weybridge, London (United Kingdom).

References

Alhaji I, 1976. Bovine tuberculosis in four northern states of Nigeria. PhD thesis, Ahmadou Bello University of Zaria, Nigeria, 236pp.

Ayele WY, Neil SD, Rodgers JD, Zinsstag J, Weiss MG, Pavlik I, 2004. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. *Int J Tuberc Lung Dis* 8, 924-937.

Biet F, Boschirola ML, Thorel MF, Guilloteau LA, 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* intracellular complex (MAC). *Vet Res*, 36, 411 – 436.

Cadmus S, Palmer S, Okker M, Dale J, Gover K, Smith N, Keith J, Hewinson RG, Gordon SV, 2006. Molecular analysis of human and bovine tuberculosis bacilli from a local setting in Nigeria. *Clin Microbiol*, 44, 29 – 34.

Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HF, de Kantor I, Meslin FX: Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis* 1998, 4(1): 59-70.

Costello E, Doherty ML, Monaghan ML, Quingley FC, O'Reilly PF, 1998. A study of cattle-to-transmission of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet J*, 155, 245 – 250.

Diguimbaye-Djaibé C, Markus H, Ngandolo R, Hassane MH, Gaby E, Pfyffer E, Baggi F, Hewinson G, Tanner M, Zinsstag J, Schelling E, 2006a. *Mycobacterium bovis* isolated from tuberculous lesions in Chadian zebu carcasses. *Emerg Infect Dis*, 12, 769 – 771.

Diguimbaye-Djaibé C, Vincent V, Schelling E, Hilty M, Ngandolo R, Mahamat H.H, Pfyffer G, Baggi F, Tanner M, Zinsstag J, 2006b. Species identification of non-tuberculous mycobacteria from humans and cattle of Chad. *Schweiz Arch Tierheilk* 148: 251-256.

Haddad N, Ostry A, Karoui C, Masselot M, Thorel MF, Hughes SL, et al., 2001. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in France from 1997 to 2000. *J Clin Microbiol* 39, 3623-3632.

Herenda D, Chambers PG, Ettriqui A, Seneviratna P, da Silva TJP, 1994. Manual on meat inspection for developing countries. Food and agriculture organization of the United Nations (FAO), Rom, Italy.

Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, Van Agterveld M, Van Soolingen D, Kuijper S, Bunshoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, Van Embden J, 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium* for diagnosis and Epidemiology. *J Clin Microbiol* 35, 907 – 914.

Menzies FD, Neil SD, 2000. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet J* 160, 92-106.

Morris RS, Pfeiffer DU, Jakson J, 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet Microbiol* 40, 153-177.

Müller B, Hilty M, Berg S, Carmen M, Garcia-Peloya, Dale J, Boschioli ML, SIMEON Cadmus S, Ngandolo BNR, Diguimbaye-Djaibé C, Kazwala R, Bonfoh B, Betty M. Janpop-Lafourcade, Saraoui N, Djamel G, Aserffa A, Meseret HM, Razanamparany VR, Ramarokoto H, Djonne B, Oloya J, Machado A, Mucavele C, Skjerve E, Porteals F, Rigouts L, Anta M, Annéle M, Källenius G, Van Helden PD, Hewinson, Zinsstag J, Gordon SV, Smith N, 2009. African 1; An Epidemiologically Important Clonal Complex of *Mycobacterium bovis* Dominant in Mali, Nigeria, Cameroon and Chad. *J bacteriol* 191, 1951-1960.

Njanpop-Lafourcade BM, Inwald J, Annick O, Durand B, Hughes S, Thorel MF, hewinson G, Haddad N, 2001. Molecular typing of *mycobacterium bovis* isolates from cameroon. *J Clin Microbiol* 39, 222-227.

Oloya J, Kazwala R, Lund A, Opuda-Asido J, Memelash B, kjerne E, Johansen TB, Djønne B, 2007. Characterization of *mycobacteria* from slaughter cattle in pastoral regions of Uganda.

Philips CJC, Foster CRW, Morris PA, Teverson R, 2003. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Res Vet Sci* 74, 1-15.

Pollock JM, Rodgers JD, Welsh MD, McNair J, 2006. Pathogenesis of bovine tuberculosis: the role of experimental models of infection. *Vet Microbiol* 112, 141-150.

Sulieman MS, Hamid ME, 2002. Identification of Acid Fast Bacteria from caseous lesions in cattle in Sudan. *J Vet Med* 49, 415 – 418.

Teklu A, Asseged B, Yimer E, Gebeyehu M, Woldesenbet Z, 2004. Tuberculosis lesions not detected by routine abattoir inspection: the experience of the Hossana municipal abattoir, southern Ethiopia. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 23, 957-964.

Zeuh V, 1993. Maîtrise de la reproduction et amélioration génétiques des ruminants. Universités Francophones. *Actualités Scientifiques*, 181-186.

6.5. Comparative Assessment of Fluorescence Polarization and Tuberculin Sskin Testing for Diagnosis of Bovine Tuberculosis in Chadian Cattle

Bongo Naré Richard Ngandolo¹, Borna Müller², Colette Diguimbaye-Djaïbe¹, Irene Schiller³, Beatrice Marg-Haufe³, Monica Cagiola⁴, Michael Jolley⁵, Om Surujballi⁶, Ayayi Justin Akakpo⁷, Bruno Oesch³, Jakob Zinsstag^{2†}

¹ Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha, N'Djaména, Chad

² Swiss Tropical Institute, Basel, Switzerland

³ Prionics AG, Schlieren-Zurich, Switzerland

⁴ Istituto Zooprofilattico dell'Umbria e delle Marche, Perugia, Italy

⁵ Diachemix LLC, Grayslake, USA

⁶ Animal Diseases Research Institute, Canadian Food Inspection Agency, Nepean, Ontario, Canada

⁷ Ecole Inter-Etats des Sciences et de Médecine Veterinaires (EISMV), Dakar, Senegal

† Corresponding author. Mailing address: Swiss Tropical Institute, Socinstrasse 57, P.O. Box, CH-4002 Basel, Switzerland. Phone: 0041 61 284 81 39. Fax: 0041 61 284 81 05. E-mail: Jakob.Zinsstag@unibas.ch.

Published in Preventive Veterinary Medicine (89) 2009 81-89

Abstract

Effective surveillance of Bovine Tuberculosis (BTB) in developing countries where reliable data on disease prevalence is scarce or absent is a precondition for considering potential control options. We conducted a slaughterhouse survey to assess for the first time the burden of BTB in Southern Chad. Altogether, 954 slaughter animals were consecutively sampled and tested using the Single Intra-dermal Comparative Cervical Tuberculin (SICCT) test, a recently developed Fluorescence Polarization Assay (FPA) and routine abattoir meat inspection after slaughter. Gross visible lesions were detected in 11.3% (CI: 9.4 - 13.5%) of the animals examined and they were mostly located in the lymph nodes and the lung. Significantly more Mbororo zebus (15.0%) were affected by lesions than Arab zebus (9.9%; OR = 2.20, CI: 1.41 - 3.41; $p < 0.001$). Of all animals tested, 7.7% (CI: 6.2 - 9.6%) reacted positively to SICCT if OIE guidelines were applied. However, Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis using *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) infected animals as the positive population and lesion negative animals as the negative population, revealed a better SICCT performance if the cut-off value was decreased to > 2 mm. SICCT reactor prevalence rose to 15.5% (CI: 13.3 - 18.0%) and FPA did not perform better than SICCT, when this setting adapted cut-off was applied.

Keywords:

Bovine tuberculosis; *Mycobacterium bovis*; Diagnosis; Tuberculin; Fluorescence Polarization Assay; developing countries; Chad; Africa.

Introduction

Bovine Tuberculosis (BTB) is a considerable threat in many respects. It causes economic loss by its effects on animal health and productivity and by international trade restrictions (Zinsstag *et al.*, 2006b). BTB has also a large impact on animal wellbeing in wildlife populations and hence entire ecosystems (Renwick *et al.*, 2006). Moreover, infected wildlife serves as an animal reservoir and hampers BTB eradication programs in several countries (Corner, 2006). BTB is also of concern for public health as it can cause zoonotic disease in humans, e.g. through close contact to infected animals or consumption of contaminated raw milk (Cosivi *et al.*, 1998; Ayele *et al.*, 2004). In Africa, the disease is present virtually on the whole continent with only very few countries being able to apply control measures due to the lack of financial resources. Moreover, laboratory and technical capacity is very limited in most countries with diagnosis of tuberculosis relying exclusively on microscopy (Cosivi *et al.*, 1998; Ayele *et al.*, 2004; Zinsstag *et al.*, 2006a).

In a representative survey in the Chari-Baguirmi and Kanem region in Western Chad, Schelling *et al.* found 17% of transhumant nomadic cattle to be positive by Single Intra-dermal Comparative Cervical Tuberculin (SICCT) testing (Schelling *et al.*, 2000). A subsequent study at the abattoir of N'Djaména in Chad revealed that 7.3% of the animals had gross visible BTB suspect lesions with Mbororo zebu breeds being more affected than Arab zebras. The differential susceptibility was even more significant, when only confirmed *Mycobacterium bovis* infected animals were considered (Diguimbaye-Djaïbe *et al.*, 2006a). Spoligotyping (Kamerbeek *et al.*, 1997) demonstrated a homogeneous population structure of the isolated bacteria with the most predominant strains showing the same patterns as previously identified in studies from Northern Cameroon and Nigeria (Njanpop-Lafourcade *et al.*, 2001; Cadmus *et al.*, 2006; Diguimbaye-Djaïbe *et al.*, 2006a).

Current ante mortem diagnosis of BTB mainly relies on SICCT testing, which although imperfect could not yet be replaced by any other more accurate or satisfactory diagnostic method (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006). Also the γ -Interferon (γ -IFN) test (Bovigam[®], Prionics) has gained increasing importance for BTB diagnosis in cattle (Gormley *et al.*, 2006).

SICCT and the γ -IFN test are both based on cell mediated immune (CMI) responses against tuberculosis infection. Tuberculosis in cattle is characterized by an early Th1 type CMI response, whilst humoral immune responses develop as disease progresses. CMI responses can wane and animals become anergic, and SICCT as well as γ -IFN tests have been shown to give false negative results in such disease stages (Welsh *et al.*, 2005; Pollock *et al.*, 2005; de la Rua-Domenech *et al.*, 2006). Importantly, anergic animals are thought to be heavily diseased and highly infective (Pollock *et al.*, 2005). In low income countries, where control measures are absent, the predicted higher prevalence of such animals might considerably affect disease spread and persistence (Pollock *et al.*, 2005; de la Rua-Domenech *et al.*, 2006; Palmer and Waters, 2006). Thus, development of a diagnostic test targeting late stage diseased animals is of specific importance for high-incidence countries with restricted resources for BTB surveillance and control.

Anergic animals may be detected by serological tests if the host's immune response shifts from a predominant CMI response to an antibody-based response. In this context, a number of diagnostic tests have been developed, however sensitivity and/or specificity was low compared to SICCT (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006). Fluorescence polarization (FP) constitutes an alternative technique for antibody detection with a shown potential for diagnostic purposes (Jolley and Nasir, 2003). An assay for the detection of *Mycobacterium bovis* antibodies has been described some years ago, utilizing fluorescein-labelled MPB70 protein as antigen (Lin *et al.*, 1996; Surujballi *et al.*, 2002; Waters *et al.*, 2006; Jolley *et al.*, 2007). The assay has recently been modified by employing a polypeptide-based tracer derived from MPB70 protein, named F-733. Jolley *et al.* previously provided a more detailed description of the test and have evaluated its performance for the assessment of the BTB herd status in various settings (Jolley *et al.*, 2007). However, this study provided no ROC analysis for cut-off selection and only poorly assessed FPA test sensitivity and specificity for the identification of infected animals.

The present study aimed at the comparison of SICCT testing and FPA for the diagnosis of BTB in naturally infected cattle, in an African setting. Moreover, our results revealed first insights into the prevalence of BTB in Southern Chad.

Materials and Methods

Animals

In the absence of a sampling frame, a total of 954 slaughter animals were sampled during three intervals of approximately one month between July and November 2005 at abattoirs in Southern Chad. Sample size calculation for diagnostic test comparison was based on a prevalence of 17%, a standard error of the estimate < 10% and a difference in sensitivity to be detected of 10% (sensitivity of the SICCT test was assumed to be 82%, level of confidence of 95%, power of 80%; www.openepi.com, 2004). The far majority of animals (n = 944) was sampled at the abattoir of Sarh and a few (n = 10) at the abattoir of Moundou. The study area was located approximately 500 km from N'Djaména, where a previous slaughterhouse survey was conducted (Diguimbaye-Djaïbe *et al.*, 2006a). The animals were raised in a long distance transhumant livestock production system with frequent trans-border movements of herds between the Central African Republic and Chad (Ben Yahmed, 2006). Because of the regional farming system, focusing primarily on milk production (Dicko *et al.*, 2006), relatively small amounts of animals (surplus males and old cows) are usually sold from the same herd to different traders, which in turn, sell on their animals to different butchers. Therefore, we assume that the tested animals can be considered a representative sample from a large number of different herds and an extensive area of Southern Chad. However, because of poor documentation and the multiple selling-on the origin of the animals could not be traced. All available animals were subjected to this study. The reticence of some butchers limited the number of animals that could be sampled to approximately one third of the animals slaughtered during our presence at the abattoir. Different zebu breeds were frequently

intermixed in the same cattle herds. Most likely, none of the animals has ever undergone tuberculin skin testing. Four types of phenotypic breeds were encountered: Arab (n = 658), Mbororo (n = 286), Bogolodjé (n = 7) and cross-breeds (n = 3) of which only the former two were used for statistical analysis.

Physical examination of animals

All 954 animals were physically examined before slaughter. Body condition was categorized by assigning one of the following three scores: 1 – good body condition, 2 – bad body condition, 3 – very bad body condition. Classification of the animals was based on the bodyweight and external characteristics (dermatosis, etc.). Lymph adenopathy was assessed by examination of the left and right pre-scapular and superficial inguinal lymph nodes and categorized by assigning different scores of hyperplasia: 1 – normal, 2 – medium hyperplasia of the lymph node, 3 – severe hyperplasia of the lymph node.

Fluorescence polarization assay (FPA)

Blood collection for the FPA was performed before tuberculin injection for SICCT testing (see below) in order to avoid any potential impact on the FPA results. In our study, a polypeptide-based tracer derived from MPB70 protein, named F-733 was used for FPA in a microtiter (GENios Pro) and single tube format (SENTRY 100) (Jolley *et al.*, 2007).

a. GENios Pro/Microtiter plate format:

Blood samples from all 954 animals were subjected to GENios Pro FPA. The assay was performed as a direct assay using fluorescein labelled F-733 tracer followed by a confirmatory inhibition assay using fluorescein labelled F-733 tracer in combination with a large excess of unlabeled 733 peptide as described by Jolley *et al.* (Jolley *et al.*, 2007). Assay buffer (0.01 M sodium phosphate pH 7.5, containing 9 g/l sodium chloride, 1 g/l sodium azide and 4 g/l lithium dodecyl sulfate) at a volume of 100 µl and 100 µl of serum sample were applied into microtiter plate wells (96-well flat bottomed black microtiter plates, Greiner, catalogue no. 7.655 209), mixed thoroughly for 5 min on a microplate shaker and incubated for 25 min at room temperature. After background reading, 10 µl of F-733 tracer solution (125 nM in 0.01% sodium phosphate buffer, pH 7.5, containing 9 g/l sodium chloride, 1 g/l sodium azide and 100 mg/l bovine gamma globulin) was added, mixed thoroughly for 5 min on a microplate shaker and incubated at room temperature for 5 min. Subsequently, the background-subtracted FP of the tracer was determined. For the confirmatory assay, the assay was performed using unlabeled peptide (10 µl, added to 90 µl of buffer) instead of 100 µl of buffer. The samples were analyzed in duplicates without inhibitor and retested in duplicate with inhibitor. All FP measurements were performed with the GENios Pro™ (Tecan AG) microplate reader.

b. SENTRY 100/Single tube format:

Blood samples from all 954 animals were subjected to SENTRY 100 FPA; however, valid test results were available for 953 animals. Assay buffer (0.01 M sodium phosphate pH 7.5, containing 9 g/l sodium chloride, 1 g/l sodium azide and 1 g/l lithium dodecyl sulfate) at a volume of 900 µl and 100 µl of the serum sample were added to borosilicate glass test tubes (Culture tubes, Durex, 10x75 mm; VWR cat.no: 47729-568) and mixed vigorously for 5 sec. After 2 hours of equilibration at room temperature, background reading was performed and 10 µl of F-733 tracer solution (125 nM in 0.01% sodium phosphate buffer, pH 7.5, containing 9 g/l sodium chloride, 1 g/l sodium azide and 100 mg/l bovine gamma globulin) was added. The reagents were mixed thoroughly for 5 s and equilibrated for 30 min at room temperature. FP measurements were made using the SENTRY 100 fluorescent polarization instrument (Diachemix LLC, USA). Calibration was performed according to manufacturer's instructions. Three negative and one positive control were included in each batch of sera tested.

Comparative intra-dermal tuberculin skin testing

Valid SICCT test results were available for 930 animals. To be able to perform SICCT on slaughter animals, an arrangement was made with the slaughterhouse management to maintain animals three day prior to slaughter in the animal confinement area of the slaughterhouse. The skin test was performed using bovine (50'000 IU/ml) and avian (25'000 IU/ml) tuberculin produced by the licensed and authorized Istituto Zooprofilattico dell'Umbria e delle Marche, Perugia, Italy. SICCT testing was effected by intra-dermal injection of 0.1 ml of bovine Purified Protein Derivative (PPD-B) and 0.1 ml of avian PPD (PPD-A) on 2 different sites of the previously shaved mid-neck; this resulted in a dose of 5000 IU of PPD-B and 2 500 IU of PPD-A per animal. Importantly, PPD injection was performed after blood collection for FPA testing in order to avoid any potential impact on the FPA results. Reading of the skin swelling was performed with a caliper, 72 h later. The outcomes were interpreted as recommended by the OIE [Council Directive 64/432/EEC (International Office of Epizootics (OIE), 2006)]: The result was considered positive if the increase in skin thickness at the PPD-B injection site was more than 4 mm greater (> 4 mm) than the reaction shown at the PPD-A injection site, inconclusive if skin swelling at the PPD-B injection site was between 1-4 mm greater than at the PPD-A injection site and negative if skin swelling was equal or less at both sites.

Meat inspection

After slaughter, all 954 animals underwent standard meat inspection including organ and lymph node palpation, visual inspection and incision of organs and lymph nodes according to standard procedures (Herenda *et al.*, 1994). Meat inspection was done by local meat inspectors at the abattoirs of Sarh and Moundou, Chad. Gross visible lesions were detected in altogether 108 of the 954 sampled animals.

Specimen collection, processing and culture

From all 108 animals exhibiting gross visible lesions, lesion containing tissue specimens from all visibly affected organs and lymph nodes were collected and transported on ice to the Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootéchniques de Farcha in N'Djaména, Chad. Samples were stored at -20°C prior to processing. Extracted lesions were homogenised as previously described (Diguimbaye-Djaïbe *et al.*, 2006a). The samples were decontaminated with N-acetyl-L cysteine sodium hydroxide (0.5% NALC 2% NaOH) and inoculated into two Middlebrook 7H9 medium flasks containing OADC and PANTA (polymyxin, amphotericin B, nadilixic acid, trimethoprim, azlocillin) and either glycerol (0.75%) or pyruvate (0.6%). Samples were put into culture until growth was detected or at least for 8 weeks. Presence of Acid-Fast Bacilli (AFB) was examined by Ziehl-Neelsen staining and microscopy. Manipulations were carried out as described previously (Diguimbaye-Djaïbe *et al.*, 2006a).

Culture inactivation and DNA extraction

Bacterial growth was detected in cultures of 102 animals; cultures of 50 animals showed presence of AFB by Ziehl-Neelsen staining. An aliquot of the corresponding cultures was subjected to heat-killing. For each culture containing AFB, 0.5 ml of the bacterial suspension was centrifuged for 5 min at maximum speed, the supernatant was removed and the pellet re-suspended in 0.5 ml of sterile distilled water. The samples were inactivated by incubation at 95-100°C for 15 min in a boiling water bath and stored at -20°C until further processing. Samples were shipped to Switzerland for genetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) and Non-tuberculous Mycobacterial (NTM) strains. DNA extraction from thermo-lysates occurred by means of the InstaGene™ Matrix (catalogue no. 732-6030; Bio-Rad).

Light Cycler® PCR

DNA extracts from the 50 animals showing growth of AFB in culture were subjected to Light Cycler® PCR for identification of MTBC and NTM strains as previously described by Lachnik *et al.* (2002) with some modifications. A PCR-mix was made, containing 2.5 mM MgCl₂, a pair of primers at a concentration of 0.5 µM, each and two pairs of Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) probes at a concentration of 0.2 µM, each, for the detection of Mycobacteria and MTBC species. In order to prevent carry-over contaminations, 0.1 U of Uracil-N-Glycosylase (UNG) was added and the mix was incubated at room temperature for 30 min. For each sample, 13 µl of the PCR-mix were combined with 2 µl of a commercially available ready-to-use hot start reaction mixture (Light Cycler® Fast Start DNA Master Hybridization Probe; catalogue no. 03 003 248 001; Roche Diagnostics) containing Fast Start *Taq* polymerase, reaction buffer, deoxynucleoside triphosphates and 10 mM MgCl₂. For each sample, 5 µl of DNA extract was mixed with 15 µl of the amplification mix in a glass capillary. Amplification started with a DNA denaturation step of 10 min

at 95°C, followed by 60 cycles of PCR, with each cycle consisting of denaturation (10 s at 95°C), “touchdown” annealing (10 s at 60°C), and extension (45 s at 72°C). Samples were thereupon cooled for 2 min at 40°C.

Primers and probes

Following primers and probes were used for DNA amplification and hybridisation: A 1000-bp fragment was amplified using Mbak-f283 (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA GGA-3') (sense) and Mbak-r264 (5'-TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA-3') (antisense) primers. Following FRET probes were used: For the detection of MTBC species, Mbak TB-F (5'-TCC CAC ACC GCT AAA GCG CTT TCC-3' fluorescein) (antisense) as an anchor probe and Mbak TB-705 (5' Light Cyler Red 705-CCA CAA GAC ATG CAT CCC GTG GTC C- 3') (antisense) as a sensor probe, and for the detection of *Mycobacteria* spp., Mbak GE-F (5'-CTT AAC TGT GAG CGT GCG GGC GAT ACG G- 3' fluorescein) (sense) as an anchor probe and Mbak GE-640 (5' Light Cyler Red 640-CAG ACT AGA GTA CTG CAG GGG AGA CTG G-3') (sense) as a sensor probe. As indicated, sensor probes were labelled with Light Cyler Red 640 or Light Cyler Red 705 as an acceptor for FRET, and all anchor probes were labelled with fluorescein.

Statistical analysis

Logistic regression was performed using Intercooled STATA version 9.2 (StataCorp LP). Statistically significant covariates for lesion occurrence, were identified by multiple logistic regression. Non-parametric Receiver Operating Characteristic (ROC) analyses were done in STATA. The roctab and roccomp procedures were used for the sensitivity and specificity calculations for each possible cut-off point, for the calculation of the area under the ROC-curve (AUC), for the comparison of AUCs between the tests and for the production of the ROC plots. Ideal cut-off values for the diagnostic tests were defined as the points from the ROC plot with the largest distance from the diagonal line (sensitivity = 1-specificity) (Gardner and Greiner, 2006); this corresponds to the point with the largest Youden index ($J = \text{sensitivity} + \text{specificity} - 1$) (Greiner *et al.*, 2000). For practical reasons, for GENios Pro and SENTRY 100, the next multiple of ten with the same sensitivity was considered as ideal cut-off and used for test evaluation. For cut-off selection using the misclassification-cost term (MCT), the point with the smallest MCT value ($\text{MCT} = (C_{FN}/C_{FP})P(1-\text{Se}) + (1-P)(1-\text{Sp})$) was chosen, with C_{FN} and C_{FP} being the cost of false-negative and false positive diagnosis, respectively and P being the disease prevalence in the target population (Greiner *et al.*, 2000). We were unable to accurately estimate C_{FN}/C_{FP} but the cost of false-negative diagnosis is likely to exceed the cost of false positive diagnosis. Therefore, MCT values for each possible cut-off point and different ratios of C_{FN}/C_{FP} were calculated and compared, assuming a disease prevalence of 10% and 15%.

Results

Animals and lesions

The animal population sampled at abattoirs in Southern Chad (n = 954) consisted mainly of young males and old females in a relatively bad body condition. The majority belonged either to the Arab (n = 658) or Mbororo (n = 286) breed. Interestingly, there was a difference in the sex-ratio between the two zebu breeds (n = 944; $X^2 = 24.1$; $p < 0.001$) with a higher proportion of males in Mbororo compared to Arab cattle. Of 954 animals screened, 108 (11.3%; CI: 9.4 - 13.5%) exhibited gross visible lesions, which were mostly located in the pre-scapular lymph nodes, the mammary lymph nodes and the lungs (Table 6.7). In a multiple logistic regression model with lesion occurrence as outcome variable, age and breed were identified as statistically significant explanatory variables (Table 6.8). All visible lesions were put in culture; AFB could be detected in cultures of 50 animals. Using real-time PCR, NTM and MTBC strains could be detected in cultures of 13 and 20 animals, respectively; 3 of altogether 30 animals with confirmed Mycobacterial infections showed a mixed infection of NTM and MTBC strains.

Table 6.7: Distribution of gross visible lesions.

	Total number	% of animals with lesions
Animals with lesions	108	100%
Lymph node lesions	98	91%
Pre-scapular lymph nodes	64	59%
Mammary lymph nodes*	37	34%
Head associated	8	7%
Popliteal lymph nodes	1	1%
Organ lesions	22	20%
Lung	17	16%
Liver	8	7%
Others	3	3%

* Altogether, 29 (36.7%) of the female animals showed visible mammary lymph node lesions

Table 6.8: Logistic model for lesion occurrence

Explanatory variable	OR	95% CI	p
Sex	0.97	0.57 - 1.64	0.9
Breed	2.20	1.41 - 3.41	<0.001
Age	1.24	1.11 - 1.38	<0.001
Body condition	1.02	0.66 - 1.59	0.93
Lymph adenopathy	0.66	0.43 - 1.00	0.05

Pseudo R² = 0.0467

SICCT

Diagnostic tests were evaluated on the basis of confirmed MTBC infections and lesion occurrence. Using lesion positive and lesion negative animals as positive and negative population, respectively, the ability of SICCT to detect gross visible lesions was assessed. Performance of SICCT for the detection of lesions was poor, reflected by a low AUC (0.60; CI: 0.54 - 0.66; Table 6.9). Using an alternative gold standard definition, confirmed MTBC infected animals were used as the positive population and lesion negative animals were used as the negative population. In this case, SICCT achieved better results (AUC = 0.80; CI: 0.71 - 0.88; Table 6.9; Figure 6.6). We defined the point from the ROC curve with the largest distance from the diagonal line (sensitivity = 1-specificity) as ideal cut-off point (Gardner and Greiner, 2006). Using this approach, we estimated the best cut-off value to be an increase in skin fold thickness greater than 2 mm (> 2 mm). Sensitivity and specificity of SICCT using our suggested cut-off value and the OIE standard cut-off were 65.0%

(CI: 43.3 - 81.9%) / 86.7% (CI: 84.2 - 88.9%) and 20.0% (CI: 5.7 - 43.7%) / 93.1% (CI: 91.1 - 94.6%), respectively (Table 6.9; Figure 6.).

We found a tuberculin reactor prevalence of 7.7% (CI: 6.2 - 9.6%) for the OIE cut-off and 15.5% (CI: 13.3 -18.0%) for our suggested cut-off (> 2 mm). Mbororo zebus showed for both cut-off values significantly more often a positive SICCT outcome than Arab zebus ($n = 920$; $X^2 = 4.65$ and 4.03 , $p < 0.05$). Average SICCT reactor prevalence was already high for animals aged two years or less (5.2% or 10.4% depending on the cut-off used; Figure 6.7). SICCT reactor prevalence continuously increased with age and reached its top in animals aged 5 or 6 years (12.6% or 23%). With higher age, prevalence decreased again (Figure 6.7).

Table 6.9: Test performance and characteristics for SICCT, Geniospro and Sentry 100

Cut-off	SICCT		GENios Pro	SENTRY 100
	> 4mm**	> 2mm	>= 40	>= 20
Apparent prevalence	7.7% (6.2 - 9.6%)	15.5% (13.3 - 18.0%)	11.1% (9.3 - 13.3%)	3.5% (2.4 - 4.8%)
<i>Lesion positive - Lesion negative</i>				
Sensitivity	13.9% (8.6 - 21.7%)	32.4% (24.3 - 41.7%)	18.5% (12.3 - 26.9%)	11.1% (6.5 - 18.4%)
Specificity	93.1% (91.1 - 94.6%)	86.7% (84.2 - 88.9%)	89.8% (87.6 - 91.7%)	97.5% (96.2 - 98.4%)
Positive predictive value	20.8% (13.1 - 31.6%)	24.3% (18.0 - 31.9%)	18.9% (12.6 - 27.4%)	36.4% (22.2 - 53.4%)
Negative predictive value	89.2% (86.9 - 91.1%)	90.7% (88.5 - 92.5%)	89.6% (87.4 - 91.5%)	89.6% (87.4 - 91.4%)
AUC	0.60 (0.54 - 0.66)		0.57 (0.51 - 0.63)	0.58 (0.52 - 0.64)
<i>MTBC positive - Lesion negative</i>				
Sensitivity	20.0% (5.7 - 43.7%)*	65.0% (43.3 - 81.9%)	50.0% (29.9 - 70.1%)	30.0% (14.5 - 51.9%)
Specificity	93.1% (91.1 - 94.6%)	86.7% (84.2 - 88.9%)	89.8% (87.6 - 91.7%)	97.5% (96.2 - 98.4%)
Positive predictive value	6.6% (1.8 - 15.9%)*	10.7% (6.3 - 17.4%)	10.4% (5.8 - 18.1%)	22.2% (10.6 - 40.8%)
Negative predictive value	98.0% (96.7 - 98.7%)	99.0% (98.0 - 99.5%)	98.7% (97.6 - 99.3%)	98.3% (97.2 - 99.0%)
AUC	0.80 (0.71 - 0.88)		0.67 (0.52 - 0.82)	0.70 (0.58 - 0.82)

N = 20 for MTBC positive population; N = 108 for lesion positive population; N = 821 for lesion negative population

* 95% binomial exact confidence intervals are indicated if (estimated value) x (sample size) ≤ 5, otherwise Wilson confidence intervals are shown

** OIE standard cut-off

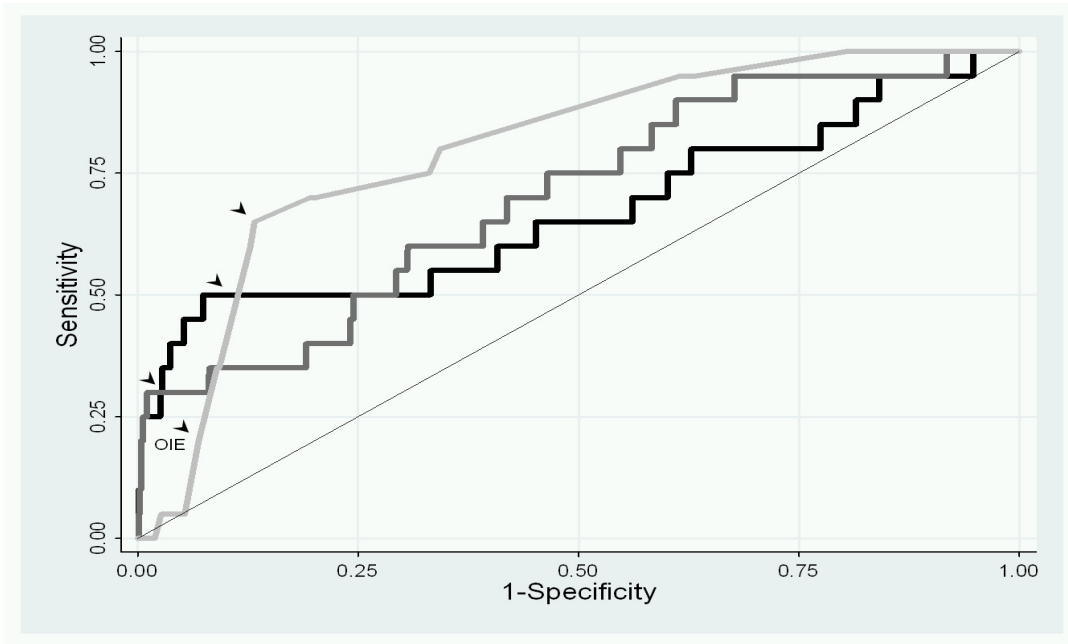


Figure 6.6: ROC curves for three diagnostic tests: GENios Pro (black), SENTRY 100 (dark grey) and SICCT (light grey).

Animals with confirmed MTBC infections were considered positive and animals without lesions negative. Arrowheads correspond to the cut-off points selected in this study (the point corresponding to the OIE standard cut-off for SICCT is indicated).

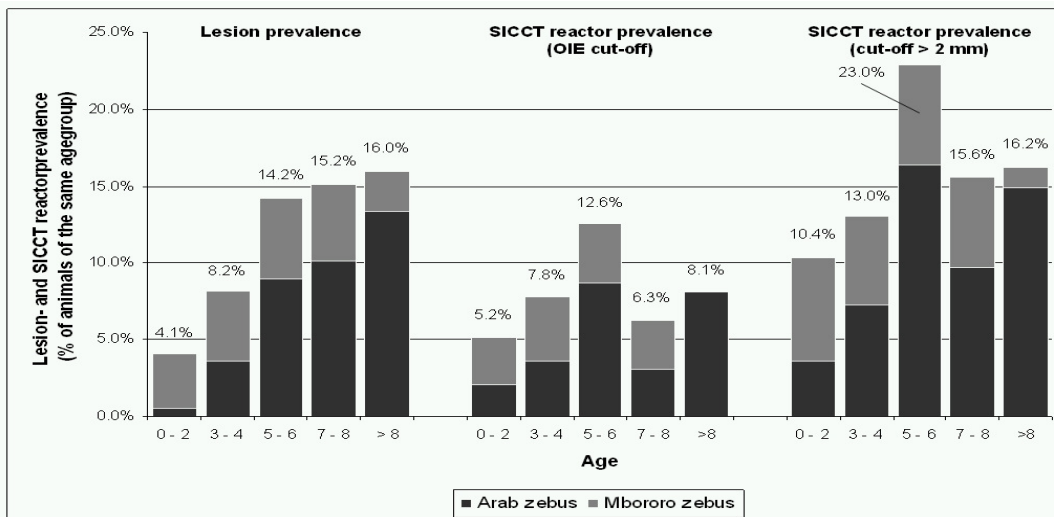


Figure 6.7: Lesion prevalence and SICCT reactor prevalence using the OIE and cut-off > 2 mm for different age groups.

The prevalence is given in percent of the number of animals of the same age group. The total percentage of positive animals is indicated and the contribution of Arab (dark grey) and Mbororo (light grey) zebu is displayed.

FPA

We evaluated two different FPA methods for the diagnosis of BTB, which were designated GENios Pro and SENTRY 100 according to their distinct detection systems. Low AUCs illustrated that both FPA tests were inappropriate for the detection of animals with gross visible lesions (Table 6.9). ROC analysis for the detection of MTBC infected versus lesion negative animals suggested that the best cut-off point was at 43.3 Δ mP for GENios Pro and between 13.2 Δ mP and 26.3 Δ mP for SENTRY100 (Figure 6.6). We therefore classified all animals with a GENios Pro result higher or equal to 40 Δ mP (≥ 40 Δ mP) and animals with a SENTRY 100 result of 20 Δ mP or more (≥ 20 Δ mP) as test positive. Using these cut-off values, sensitivity and specificity of GENios Pro and SENTRY 100 were 50.0% (CI: 29.9 - 70.1%) / 89.8% (CI: 87.6 - 91.7%) and 30.0% (CI: 14.5 - 51.9%) / 97.5% (CI: 96.2 - 98.4%), respectively.

Comparison of FPA and SICCT

Comparison of SICCT, GENios Pro and SENTRY 100 on the basis of their ROC plots (Figure 6.6) and associated AUCs (Table 6.9) suggested that SICCT generally performed better than both FPA tests. However, the confidence intervals for all AUCs were overlapping and no statistically significant differences could be identified. In fact, most of the confidence intervals for the sensitivities, specificities, positive predictive values (PPV) and negative predictive values (NPV) of the different tests were overlapping and did rarely show any statistically significant differences (Table 6.9). This was most likely due to the small sample size for the confirmed MTBC infected animals ($n = 20$). Although not at statistically significant levels, our observed data suggested higher sensitivities of the FPA tests compared to SICCT at the OIE cut-off for only somewhat smaller (GENios Pro) or even higher (SENTRY 100) specificities (Table 6.9). SICCT test performance was considerably improved when our suggested cut-off (> 2 mm) was used (Table 6.9, Figure 6.6). However, from the comparison of the test sensitivities for fixed specificities (Table 6.10) and the ROC curve (Figure 6.6) it appeared that FPA performed better than SICCT in the high specificity areas.

Table 6.10: Test Sensitivities for fixed Specificities

		Specificity			
		MTBC infected - Lesion negative			
		80%	85%	90%	95%
Sensitivity	SICCT	70.0%	66.4%	40.3%	5.0%
	Geniospro	50.0%	50.0%	50.0%	40.0%
	Sentry100	40.0%	35.0%	35.0%	30.0%

Predictions derived from actual data

Discussion

Animals and lesions

This is the first ever carried out study on the occurrence of bovine tuberculosis in Southern Chad. The region is bordering on Northern Cameroon and the Central African Republic. The animal population encountered at the abattoir is as would be expected for a cattle production system focussing on milk and herd growth, with priority for slaughter given to surplus males and old cows. The different proportion of males in the two zebu breeds could indicate different livestock management strategies for different breeds.

In our previous study in N'Djaména the overall proportion of lesions was significantly lower compared to the present study in Sarh (7.3%, CI: 6.8%-7.8% vs 11.3%, CI: 9.4% - 13.5%) (Diguimbaye-Djaïbe *et al.*, 2006a). Also, the percentage of Mbororo animals encountered was lower in N'Djaména (26.0%; CI: 25.1% - 26.8%) compared to Sarh (30.0%; CI: 27.2% - 33.0%). Since Mbororo animals showed a significantly higher lesion prevalence in both settings, the higher abundance of Mbororo cattle in Sarh may at least in part account for the different overall prevalence between the two settings. Surprisingly, and very unlike published in other surveys (Asseged *et al.*, 2004; Teklul *et al.*, 2004; Palmer and Waters, 2006), routine abattoir meat inspection at Sarh abattoir identified the pre-scapular lymph nodes to be most often affected in animals with lesions (Table 6.7). This suggested that many of these lesions did not result from infection with *M. bovis*. Indeed, SICCT testing provided a sensitivity of only 32.4% (CI: 24.3 - 41.7%; using cut-off > 2 mm) for the detection of animals with lesion but performed significantly better 65.0% (CI: 43.3 - 81.9%) for the detection of MTBC infected animals (Table 6.9). Moreover, in 10 out of 30 Mycobacterial infections confirmed by real-time PCR, NTMs were detected without co-infecting MTBC strains. Taken together, these results suggest that a considerable amount of lesions could have been caused by other bacteria than *M. bovis*. Similarly, in two other recent studies from Chad and Uganda, NTMs were isolated from more than 40% of the animals exhibiting lesions (Diguimbaye-Djaïbe *et al.*, 2006b; Oloya *et al.*, 2007). Considering the unusual frequency of pre-scapular lymph node lesions detected, we were in particular interested whether *M. bovis* and other lesion causing bacteria might have infected distinct cattle organs. We re-evaluated the

performance of SICCT for the detection of lesions stratified by the lesion location. Although not at statistically significant levels, SICCT performance for the detection of lung lesions was better than its ability to detect pre-scapular lymph node lesions (AUC = 0.72, CI: 0.58-0.68 vs. AUC = 0.57, CI: 0.50-0.65). This suggested that such lesion causing non-MTBC bacteria might more often affected locations outside the lungs. Similar findings were also reported in a recent study from Mali (Müller *et al.*, 2008).

A relatively high amount of mammary lymph nodes were detected in our survey. This is of public health concern as it could also indicate an increased risk of zoonotic transmission through raw milk consumption. The finding could also explain the relatively high amount of young animals with lesions (Figure 6.7).

SICCT and FPA

In the present survey, evaluation of SICCT and FPA was based on animal sampling from a slaughterhouse population; this was advantageous for several reasons. First, random herd and animal selection in a transhumant livestock production area is organizationally very difficult to accomplish. Although not representing a completely random sample, due to the local livestock production system (see Material and Methods 2), we believe that the sampled animals originated from an extensive area of the southern Chadian region and from a close-to-random sample of herds in that region. Importantly, our approach allowed us to most efficiently identify animals with gross visible lesions. Random slaughter in transhumant cattle herds, most likely, would have been unacceptable for the cattle holders. However, meat inspection, culture of lesions and the molecular characterization of isolated bacteria was necessary to unambiguously identify *M. bovis* infected cattle. Importantly, there was no evidence of previous animal SICCT testing in Southern Chad. Therefore, cattle from this region most likely never underwent SICCT testing. This is of particular importance as preceding tuberculin skin testing has been shown to potentially influence subsequent test outcomes (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006).

Our results suggest that the optimal cut-off for SICCT (> 2 mm) testing in Southern Chad is lower than the OIE standard cut-off. This finding is of practical relevance and demonstrates the importance of optimising test cut-offs in the target population. In fact, similar results were found in a study in Ethiopia (Ameni *et al.*, 2008) and are likely to apply to other countries in sub-Saharan Africa. In SICCT reactor prevalence studies in Uganda and Tanzania, lower cut-offs than the OIE standard cut-off have been used, however without detailed justification (Oloya *et al.*, 2006; Cleaveland *et al.*, 2007). Using our adapted cut-off, reactor prevalence rose to 15.5% (CI: 13.3 - 18.0%; (Table 6.9)), indicating a previous underestimation of the disease prevalence in Chad as former studies in other regions of the country were applying higher cut-offs for test interpretation (Schelling *et al.*, 2000; Delafosse *et al.*, 2002).

We defined the ideal cut-off as the point from the ROC plot with the largest distance from the diagonal line (sensitivity = 1-specificity) (Greiner *et al.*, 2000; Gardner and Greiner, 2006). By using

this definition, equal weights were given to sensitivity and specificity and it facilitated comparison of different diagnostic tests (Greiner *et al.*, 2000). In order to take disease prevalence and the cost of misclassifications into account the calculation of the misclassification-cost term (MCT) can be useful for cut-off selection (Greiner *et al.*, 2000). We were not able to accurately quantify the cost of false negative (C_{FN}) and false positive (C_{FP}) diagnosis as required for this method. However, because a single infected and undetected cow can infect many others and because the economic losses associated with BTB are mostly due to losses in meat production, milk production and increased reproduction efforts (Zinsstag *et al.*, 2006b) we can suppose that the cost of a false negative diagnosis is likely to exceed the cost of a false positive result by several folds. Assuming a disease prevalence of 15% (10%) for the calculation of the MCT, the same ideal cut-off point (> 2 mm) would be identified for SICCT if the ratio of C_{FN}/C_{FP} was between 1.2 and 7 (2 and 11). The selected cut-off values for both FPA tests also gave satisfactory results for these estimates. This suggests that our chosen cut-off values may be acceptable for a broad range of reasonable C_{FN}/C_{FP} ratios. However, in-depth cost analysis is required to address potential benefits from reduced cut-off values in Africa.

It could be argued that the lesion negative animal population used for diagnostic test evaluation may still contain *M. bovis* infected cattle since no tuberculous lesions are visible at early stages of BTB. Consequently, such animals could have distorted our analysis. In order to increase the certainty that the lesion negative animal population indeed was uninfected we repeated all ROC analyses with a negative animal population that did not show lesions and that in addition showed a Δ PPD value (Δ PPD-B - Δ PPD-A) equal to or less than zero (≤ 0) (for repeated ROC analysis of FPA) or that was in addition negative for both serological tests (for repeated ROC analysis of SICCT). In doing so, 303 and 96 animals were additionally removed from the lesion negative population, respectively. For all three diagnostic tests, the shape of the ROC curve did not distinctly change compared to the initial analysis and AUCs differed by less than 1% (data not shown). This suggests that possible *M. bovis* infected lesion negative animals were present at a negligible frequency and did not falsify our analyses.

The low number of PCR confirmed infections with MTBC strains ($n = 20$) was problematical for the evaluation of the diagnostic tests. Consequently, AUCs and other performance measures of the different tests differed rarely at statistically significant levels. This is a frequent problem in diagnostic test evaluation. To overcome the problem of the unknown true disease status of lesion negative animals and the low number of confirmed MTBC infected animals, other statistical methods such as latent class analysis may offer alternative approaches for diagnostic test evaluation (Enoe *et al.*, 2000). Latent class analysis was beyond the remit of this study; however, we are currently trying to develop an approach for Bayesian ROC estimation of multiple tests in absence of a gold standard test.

In a previous study of Jolley *et al.* (2007), GENios Pro results were repeated for positive and suspect positive animals using an inhibition assay (see Materials and Methods). In our analysis,

application of this confirmatory inhibition test lead to an increase of specificity to 99,4% for the detection of lesions at the cost of a lower sensitivity of 10.4% for the detection of lesions and 42.1% for the detection of confirmed MTBC infected animals. Jolley *et al.* have also shown a high specificity of the test close to 100% but higher values for the sensitivity (61.5% for the detection of PCR confirmed *M. bovis* infections). This discrepancy could be due to a relatively small sample size in both studies (Jolley *et al.*, 2007).

We were interested to see whether confirmed MTBC infected but SICCT anergic animals could be detected by FPA. Using the OIE cut-off and our suggested cut-off, 4/20 and 13/20 MTBC infected animals were detected by SICCT leaving a considerable amount of 16/20 or 7/20 SICCT anergic animals, respectively. GENios Pro detected 2 of the 16 or 7 anergic infected animals and SENTRY 100 only 1. Although the number of confirmed cases was too small to allow any conclusions, there was no indication that anergic animals were more likely to be detected by FPA.

We would like to encourage further research and development for BTB diagnosis in Africa as most of the current work mainly aims at improving diagnostic techniques for industrialized countries. Yet, the majority of cattle affected by BTB originate from the developing world, which can not apply conventional control measures (Cosivi *et al.*, 1998). Current research into improved diagnostic tests does therefore probably not efficiently target the major global burden of BTB.

Acknowledgements

We would like to thank Prof. Erik C. Böttger, Dr. Boris Böddinghaus, Dr. Burkhard Springer and the technicians of the Swiss National Centre for Mycobacteria in Zurich for providing technical support and laboratory facilities. We are indebted to the cattle holders who were collaborating with us within this project. Our work has received financial support from the Swiss National Science Foundation (project no. 107559).

References

Ameni, G., Hewinson, G., Aseffa, A., Young, D., Vordermeier, M., 2008. Appraisal of interpretation criteria for the comparative intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis in central Ethiopia. *Clin. Vaccine Immunol.*

Asseged, B., Woldesenbet, Z., Yimer, E., Lemma, E., 2004. Evaluation of abattoir inspection for the diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle at Addis Ababa abattoir. *Trop. Anim Health Prod.* 36, 537-546.

Ayele, W.Y., Neill, S.D., Zinsstag, J., Weiss, M.G., Pavlik, I., 2004. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 8, 924-937.

Ben Yahmed, D., 2006. *Atlas du Tchad*. Editions J.A, Paris.

Cadmus, S., Palmer, S., Okker, M., Dale, J., Gover, K., Smith, N., Jahans, K., Hewinson, R.G., Gordon, S.V., 2006. Molecular analysis of human and bovine tubercle bacilli from a local setting in Nigeria. *J. Clin. Microbiol.* 44, 29-34.

Cleaveland, S., Shaw, D.J., Mfinanga, S.G., Shirima, G., Kazwala, R.R., Eblate, E., Sharp, M., 2007. *Mycobacterium bovis* in rural Tanzania: risk factors for infection in human and cattle populations. *Tuberculosis. (Edinb.)* 87, 30-43.

Corner, L.A., 2006. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. *Vet. Microbiol.* 112, 303-312.

Cosivi, O., Grange, J.M., Daborn, C.J., Raviglione, M.C., Fujikura, T., Cousins, D., Robinson, R.A., Huchzermeyer, H.F., de K., I, Meslin, F.X., 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 59-70.

de la Rua-Domenech, R., Goodchild, A.T., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Christiansen, K.H., Clifton-Hadley, R.S., 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* 81, 190-210.

Delafosse, A., Goutard, F., Thébaud, E., 2002. Epidémiologie de la tuberculose et de la brucellose des bovins en zone périurbaine d'Abéché, Tchad [Epidemiology of bovine tuberculosis and brucellosis on the Periphery of Abeche, Chad]. *Rev. élev. méd. vét. pays trop.* 55, 5-13.

Dicko, M.S., Djitéye, M.A., Sangaré, M., 2006. Les systèmes de production animale au Sahel. *Secheresse* 17, 83-97.

Diguimbaye-Djaïbe, C., Hilty, M., Ngandolo, R., Mahamat, H.H., Pfyffer, G.E., Baggi, F., Hewinson, G., Tanner, M., Zinsstag, J., Schelling, E., 2006a. *Mycobacterium bovis* isolates from tuberculous lesions in Chadian zebu carcasses. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 769-771.

Diguimbaye-Djaïbe, C., Vincent, V., Schelling, E., Hilty, M., Ngandolo, R., Mahamat, H.H., Pfyffer, G., Baggi, F., Tanner, M., Zinsstag, J., 2006b. Species identification of non-tuberculous mycobacteria from humans and cattle of Chad. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 148, 251-256.

Enoe, C., Georgiadis, M.P., Johnson, W.O., 2000. Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown. *Preventive Veterinary Medicine* 45, 61-81.

Gardner, I.A., Greiner, M., 2006. Receiver-operating characteristic curves and likelihood ratios: improvements over traditional methods for the evaluation and application of veterinary clinical pathology tests. *Veterinary Clinical Pathology* 35, 8-17.

Gormley, E., Doyle, M.B., Fitzsimons, T., McGill, K., Collins, J.D., 2006. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. *Vet. Microbiol.* 112, 171-179.

Greiner, M., Pfeiffer, D., Smith, R.D., 2000. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev. Vet. Med.* 45, 23-41.

Herenda, D., Chambers, P.G., Ettriqui, A., Seneviratna, P., da Silva, T.J.P., 1994. Manual on meat inspection for developing countries. Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations Rome, 1994, Rome, 1994.

International Office of Epizootics (OIE), 2006. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2004. Paris.

Jolley, M.E., Nasir, M.S., 2003. The use of fluorescence polarization assays for the detection of infectious diseases. *Comb. Chem. High Throughput. Screen.* 6, 235-244.

Jolley, M.E., Nasir, M.S., Surujballi, O.P., Romanowska, A., Renteria, T.B., De la Mora, A., Lim, A., Bolin, S.R., Michel, A.L., Kostovic, M., Corrigan, E.C., 2007. Fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in bovine sera. *Vet. Microbiol.* 120, 113-121.

Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., Van Embden, J., 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35, 907-914.

Lachnik, J., Ackermann, B., Bohrsen, A., Maass, S., Diephaus, C., Puncken, A., Stermann, M., Bange, F.C., 2002. Rapid-cycle PCR and fluorimetry for detection of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3364-3373.

Lin, M., Sugden, E.A., Jolley, M.E., Stilwell, K., 1996. Modification of the *Mycobacterium bovis* extracellular protein MPB70 with fluorescein for rapid detection of specific serum antibodies by fluorescence polarization. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 3, 438-443.

Müller, B., Steiner, B., Bonfoh, B., Fane, A., Smith, N.H., Zinsstag, J., 2008. Molecular characterisation of *Mycobacterium bovis* isolated from cattle slaughtered at the Bamako abattoir in Mali. *BMC. Vet. Res.* 4, 26.

Njanpop-Lafourcade, B.M., Inwald, J., Ostry, A., Durand, B., Hughes, S., Thorel, M.F., Hewinson, G., Haddad, N., 2001. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Cameroon. *J. Clin. Microbiol.* 39, 222-227.

Oloya, J., Kazwala, R., Lund, A., Opuda-Asibo, J., Demelash, B., Skjerve, E., Johansen, T.B., Djonne, B., 2007. Characterisation of mycobacteria isolated from slaughter cattle in pastoral regions of Uganda. *BMC Microbiol.* 7, 95.

Oloya, J., Opuda-Asibo, J., Djonne, B., Muma, J.B., Matope, G., Kazwala, R., Skjerve, E., 2006. Responses to tuberculin among Zebu cattle in the transhumance regions of Karamoja and Nakasongola district of Uganda. *Trop. Anim Health Prod.* 38, 275-283.

Palmer, M.V., Waters, W.R., 2006. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: what policy makers need to know. *Vet. Microbiol.* 112, 181-190.

Pollock, J.M., Welsh, M.D., McNair, J., 2005. Immune responses in bovine tuberculosis: towards new strategies for the diagnosis and control of disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108, 37-43.

Renwick, A.R., White, P.C., Bengis, R.G., 2006. Bovine tuberculosis in southern African wildlife: a multi-species host-pathogen system. *Epidemiol. Infect.* 1-12.

Schelling, E., Diguimbaye, C., Daoud, S., Daugla, D.M., Bidjeh, K., Tanner, M., Zinsstag, J., 2000. La tuberculose causée par *Mycobacterium bovis*: résultats préliminaires obtenus chez les pasteurs nomades foubés et arabes dans le chari-baguirmi au Tchad. *Sermpervira* 8, 44-55.

Surujballi, O.P., Romanowska, A., Sugden, E.A., Turcotte, C., Jolley, M.E., 2002. A fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in cattle sera. *Vet. Microbiol.* 87, 149-157.

Teklul, A., Asseged, B., Yimer, E., Gebeyehu, M., Woldesenbet, Z., 2004. Tuberculous lesions not detected by routine abattoir inspection: the experience of the Hossana municipal abattoir, southern Ethiopia. *Rev. Sci. Tech.* 23, 957-964.

Waters, W.R., Palmer, M.V., Thacker, T.C., Bannantine, J.P., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Greenwald, R., Esfandiari, J., McNair, J., Pollock, J.M., Andersen, P., Lyashchenko, K.P., 2006. Early antibody responses to experimental *Mycobacterium bovis* infection of cattle. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 648-654.

Welsh, M.D., Cunningham, R.T., Corbett, D.M., Girvin, R.M., McNair, J., Skuce, R.A., Bryson, D.G., Pollock, J.M., 2005. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology* 114, 101-111.

Zinsstag, J., Kazwala, R.R., Cadmus, S., Ayanwale, L., 2006a. *Mycobacterium bovis* in Africa. In: Thoen, C.O., Steele, J.H., Gilsdorf, M.J. (Eds.), *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. Blackwell Publishing.

Zinsstag, J., Schelling, E., Roth, F., Kazwala, R.R., 2006b. Economics of bovine tuberculosis. In: Thoen, C.O., Steele, J.H., Gilsdorf, M.J. (Eds.), *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. Blackwell Publishing.

7. Discussion Générale

La réalisation des activités relatives aux objectifs fixés dans le cadre de la présente étude nous, ont permis d'obtenir des résultats dont la valorisation fait intervenir des questions ayant trait:

- à la susceptibilité de l'animal hôte à l'agent causal de la TBB,
- à l'identification des différents stades évolutifs de l'infection tuberculeuse chez le zébu en relation avec les différents facteurs de risque liés à son endémicité dans les élevages transhumants,
- au rôle du système d'élevage transhumant dans la dynamique de la propagation de la maladie dans un pays continental dont la végétation subit une altération galopante eu égard au réchauffement actuel de la planète,
- à l'identification des méthodes de diagnostic rapides et fiables permettant un contrôle efficace de la TBB sur le territoire national de la République du Tchad.

En raison de son important réseau hydrographique ainsi que des conditions favorables à l'élevage dont il dispose, le territoire tchadien situé au sud du Sahara constitue une zone d'accueil d'importants cheptels venus de la partie centrale du Tchad, mais aussi des pays limitrophes. Ces animaux sont généralement élevés par différents groupes ethniques dont certains (Peuhls ou Mbororo) se sont installés sur le territoire national au fil des ans, et le nom attribué à une race animale est généralement celui d'une ethnie qui s'est intéressé spécifiquement à son élevage. C'est le cas dans l'espèce bovine où les races locales Arabe et Mbororo, qui constituent plus de la moitié du cheptel bovin national, ont été ainsi nommées. La distinction entre les deux races tant au niveau des marchés à bétail locaux que dans les structures de Santé et d'hygiène vétérinaire (abattoirs), est basée jusqu'à ce jour, sur la reconnaissance des caractères phénotypiques particuliers (144). Dans la série des études effectuées sur la TBB au Tchad, il été révélé à différent niveau de diagnostic, la question de l'importance de bovins suspectés ou diagnostiqués tuberculeux au sein de la race Mbororo. Ce qui a conduit à la formulation d'une hypothèse sur la probable existence d'une différence génétique entre les deux races bovines en ce qui concerne leur susceptibilité à la tuberculose.

Au cours de notre étude, les génotypes de 205 individus pour un total de 21 micro-satellites ont été analysés. Le nombre d'allèles mis en évidence par locus était compris entre 4 et 14. Le nombre minimum [9] d'allèles a été révélé au sein de la race Mbororo au niveau du locus BM1824 et le maximum [11] au sein de la race Arabe, au niveau des leuci TGLA122, ETH185 et MM12. Ces résultats, montrent le polymorphisme des populations bovines Arabes et Mbororo en ce qui concerne les 21 leuci étudiés. Les nombres moyens de tous les allèles étaient de 9,3 ($\pm 2,5$) et 8,3 ($\pm 2,1$) pour des génotypes appartenant aux races Arabe et Mbororo respectivement, sachant que les marqueurs destinés aux études de diversité devraient séparer au moins 4 allèles par population. Il a été également mis en évidence des allèles particuliers (141) dont la fréquence a été relativement basse (2,8%) montrant ainsi leur faible influence sur les différences de fréquences alléliques entre les populations étudiées. L'hétérozygotie moyenne observée a été de 0,684

($\pm 0,106$) au sein de la race Arabe *versus* $0,672(\pm 0,133)$ chez les bovins de race Mbororo. L'hétérozygotie moyenne attendue a été de $0,709 (\pm 0,113)$ et de $0,707(\pm 0,127)$ pour les populations Arabe et Mbororo respectivement. En effet, le nombre moyen des allèles par locus et l'hétérozygotie attendue ont été montrés comme deux mesures informatives nécessaires à l'évaluation de la diversité génétique des populations (54,132). Le nombre moyen d'allèles par locus mise en évidence au cours de la présente étude a été moins de 11,5 par micro-satellites comme révélé chez les races bovines d'Afrique de l'Ouest et du Centre, et l'hétérozygotie attendue mise en évidence chez 9 espèces (*Bos indicus*) étaient comprise entre $0,703 - 0,744$ (60). Nos approximations ont coïncidé avec la partie inférieure de cet intervalle. Eu égard aux différents facteurs (procédure d'échantillonnage, inégalité en nombre de bovins entre les deux races locales échantillonnées et hétérogénéité d'âge entre les deux sexes) qui pourraient influencer sur l'évaluation de la diversité génétique, nous ne pouvons pas donner un garanti en ce qui concerne le caractère "hasard" des échantillonnages faits au sein des populations bovines des races Arabe et Mbororo. Cependant, les analyses statistiques effectuées avec les données issues de l'étude génétique des deux populations ont prouvé que les échantillons utilisés lors de notre étude ne reflètent pas génétiquement les différentes populations. Toutefois, la différence observée entre les prévalences de la TBB dans les deux populations (56) suscite bien la formulation de l'hypothèse supportant l'existence d'une différence génétique entre les races Arabe et Mbororo, et la recherche d'une diversité moléculaire ne serait qu'une évidence. Les résultats de notre étude ne supportent pas cette hypothèse et semblent être inattendus. Des effets de l'échantillonnage pourraient être à la cause de la diminution des différences existantes entre les races. Par ailleurs, il est aussi important de signaler l'important métissage entre les deux races locales qui pourrait homogénéiser la fréquence des allèles entre les populations. Il vient de constater que l'échantillonnage est l'étape la plus importante dans n'importe quelle étude de diversité et ne pourrait rester sans effet sur la détermination du statut tuberculeux des bovins au sein d'un troupeau transhumant ne bénéficiant d'aucun contrôle sanitaire régulier.

Cependant, l'absence d'une politique d'assainissement des troupeaux par utilisation combinée du test de tuberculination suivie de l'abattage systématique des animaux réagissant et la culture des pasteurs nomades axée sur l'élevage de prestige tenant même à la conservation des animaux malades dans les fermes jusqu'à leur vieillissement ou leurs mort par suite de maladie, ont favorisé la persistance de la TBB dans l'élevage transhumant au Tchad. Lors de notre étude, l'analyse par classe d'âge des bovins échantillonnés a montré une prédominance des veaux et des vaches respectivement dans les classes d'âge [1 an – 3 ans] et [7 ans – 9 ans]. Il vient de constater qu'en plus de la variable race déjà suspectée, la gestion des élevages transhumants portant sur la variation des indicateurs démographiques comme le sexe et l'âge ne pourraient rester sans impact sur un échantillonnage effectué au niveau du marché à bétail et destiné pour les diagnostics d'hypersensibilité retardée et de mise en évidence des lésions tuberculeuses. En effet, au cours de la présente étude, qu'il s'agisse des résultats issus de l'IDC (10,3%) ou bien de

l'IPM (11,8%), la fréquence importante des bovins de race Mbororo comparée aux bovins de race arabe, a été une fois de plus signalée parmi les réagissants (13,6% *versus* 8,9%) et les porteurs de lésions suspectées tuberculeuses (14,6% *versus* 10,6%), en dépit de l'absence de diversité génétique entre les deux populations. Ces résultats sont en conformité avec ceux des travaux préalablement effectués au Tchad (40). Toutefois, concernant les deux méthodes de diagnostic de la TBB, nous avons constaté une variation des résultats en fonction de l'âge. Il a été enregistré spécifiquement plus de réagissants dans la classe d'âge [4 ans – 6 ans] et des réactions douteuses dans la tranche d'âge allant de 4 ans à 9 ans. Ces réactions douteuses pourraient être liées aux effets des autres maladies intercurrentes pouvant entraîner une baisse de réactivité de l'organisme (11) mais aussi de la faible sensibilité de l'IDC lorsque le seuil de positivité standard a été celui de l'OIE (5). Par ailleurs, il a été constaté que la fréquence des lésions détectées et suspectées tuberculeuses à l'abattoir a été croissante proportionnellement à l'âge des animaux abattus. Cependant, l'observation microscopique des frottis issus des broyats n'a pu révéler des BAAR que dans 47,7% des animaux suspectés à l'IPM et les lésions porteurs de bacilles ont été plus enregistrées chez des bovins âgés de 4 à 10 ans. Les résultats issus du DPM (IPM et microscopie) nous ont permis de montrer que les animaux infectieux seraient beaucoup plus présents dans cette tranche d'âge comparée à ceux de la classe d'âge [1 an - 3 ans]. En effet, l'intensité importante d'une réaction allergique a peu de probabilité de signaler un processus en début d'évolution et donc des lésions discrètes; inversement, un animal à la réactivité allergique faible, voir nulle, peut être porteur de lésions importantes qu'il a été infecté depuis longtemps. L'anergie au test tuberculique et l'effet bactéricide de la caséification sont les conséquences de l'influence du facteur "temps" sur la fiabilité des résultats issus du test IDC et du DPM lorsqu'ils sont utilisés de façon isolée. La combinaison de ces deux méthodes de diagnostic de la TBB nous a permis de mettre en évidence quatre statuts de bovins tuberculeux qui pourraient se retrouver dans notre échantillon d'étude. Il s'agit des statuts IDC+ / DPM-, IDC+ / DPM+, IDC± / DPM+ et IDC- / DPM+, dont les fréquences respectives (30/64, 11/64, 11/64 et 12/64) ont été toutes importantes dans la classe d'âge [7 ans - 9 ans]. Au vu de la variabilité des statuts des bovins suspectés de tuberculeux ainsi définis au sein de la population bovine destinée à la consommation par le biais du test IDC et des DPM, ainsi que leur classe d'âge cible identifiée ([7 an - 9 ans]), qu'en est-il de la proportion réelle de la TBB à *M. bovis* au sein de notre population d'étude et de son impact sur l'élevage transhumant et sur la santé publique au sud du Tchad?

En effet, le rapport statistique du Ministère de l'Élevage et des Ressources Animales de l'année 1996, avait déjà signalé l'importance de la TBB dans la région de Sarh et de Moundou à travers les saisies aux abattoirs quand bien même aucune investigation relative à la mise en évidence de l'agent infectieux de la maladie n'avait été entreprise au niveau local. Au cours de notre étude, au total 120 échantillons de tissus ont été collectés sur 108 carcasses bovines saisies au niveau de l'abattoir. Après traitement (décontamination) et mise en culture sur milieux liquide (MIGIT modifié), toutes les cultures contenant des bacilles (BAAR) ont été dénaturées et diagnostiquées

par les méthodes de PCR en temps réel pour la mise en évidence du complexe *M. tuberculosis*, en suite par le spoligotyping pour la caractérisation de l'espèce *M. bovis*. Huit spoligotypes différents caractérisés à partir de 15 prélèvements et repartis entre 13 carcasses (12%) ont été identifiés. Il s'agit des spoligotypes suivants: SB0944 (33,50%), SB1099 (13%), SB1104 (13%), SB0951 (13%), S1103 (7%), SB0850 (7%), SB1453 (7%) et SB1454 (7%). Ces derniers ont été caractérisés principalement à partir des prélèvements faits au niveau des ganglions (pré scapulaires, mammaires, ganglion de la tête, Popliteal) et des organes (pomme, foie et reins). Treize carcasses sur 108 suspectées à l'abattoir (soit 12%) étaient effectivement infectées par le *M. bovis*, ce qui signifie que la majorité de nos suspicions furent des lésions provoquées par des infections dues aux autres mycobactéries. Cette approche avait été déjà signalée au cours des précédentes études effectuées sur des prélèvements collectés dans d'autres abattoirs africains (128, 41) et pourrait être liée aux conditions d'élevage et d'hygiène sanitaire des bovins issus des élevages transhumants. Sur un total de 13 carcasses infectées, le *M. bovis* a été isolé sur cinq carcasses issues des vaches à partir des ganglions mammaires. Ce résultat démontre que la consommation du lait de vache non pasteurisé constitue bien un risque de contamination humaine par la TBB. Il a été également constaté, que sur 13 carcasses infectées par le *M. bovis*, 9 provenaient des bovins âgés de 7 à 9 ans. Cet intervalle d'âge correspond à la classe d'âge cible des quatre statuts des bovins tuberculeux mis en évidence à l'issue de la combinaison du test IDC et du DPM. Étant une maladie chronique, la mise en évidence de la TBB à *M. bovis* sur des carcasses provenant des bovins âgés, constitue la preuve que ces derniers ont été longtemps maintenus dans les élevages et pourraient par conséquent excréter l'agent infectieux dans leurs troupeaux d'origine. Le caractère endémique de cette pathologie dans l'élevage transhumant tchadien pourrait trouver sa cause dans le long maintien des animaux excréteurs de l'agent infectieux (*M. bovis*) dans les troupeaux. D'autres facteurs pourraient aussi jouer un rôle important en ce qui concerne l'endémicité de la TBB dans les élevages transhumants au Tchad. La répartition géographique des spoligotypes *M. bovis* isolés lors de notre investigation nous a montré qu'aussi bien à l'échelle nationale ou sous régionale, le mouvement du bétail jouerait un important rôle dans la propagation de la maladie d'une localité à une autre. Au niveau national, quand bien même il a été prouvé la spécificité de deux spoligotypes à la région de Sarh (SB1453 et SB1454) et de quatre autres à la zone de N'Djamena (SB1100, SB1101, SB1102 et SB0328, (40)), la mise en évidence au cours de la présente étude du spoligotype SB0944, précédemment isolé au Cameroun, au Nigéria et au Tchad (N'Djamena) constitue la preuve de sa large dissémination dans le bassin du Lac Tchad. Le manque du spacer 30 signalé sur tous ces spoligotypes ainsi que d'autres caractéristiques qu'ils partagent avec le spoligotype du *M. bovis* BCG prouve d'une part leur spécificité régionale et d'autre part leur origine européenne (17, 40, 92). Cependant, le seul facteur qui pourrait favoriser la propagation d'un spoligotype d'une localité à une autre (ou d'un pays à un autre) dans l'élevage africain est le mouvement du bétail (2). Pour une bonne compréhension du facteur mouvement de bétail dans la dissémination des souches *M. bovis* dans

le bassin du Lac Tchad, la mise en évidence des spligotypes des souches *M. bovis* du RCA et du sud Soudan sera d'un intérêt capital. Il vient de constater que la mise sur pied d'une stratégie de lutte et de contrôle de la TBB au sein de l'élevage transhumant devrait faire partie des prérogatives de la Direction des Services Vétérinaires (DSV) du Tchad, surtout que cette pathologie a été placée en haute priorité au niveau national (10). Toutefois, il est à noter que, la mise sur pied d'une stratégie de lutte et d'un plan d'éradication efficace d'une épizootie chronique ne pourrait être effective que par l'identification et l'évaluation des méthodes de diagnostic appropriées, utilisables dans le contexte d'un programme de lutte régionale.

La chronicité de la TBB chez l'animal s'accompagne dans le temps par la mise en place respective d'un système de défense immunitaire de type cellulaire puis de type humoral. Les méthodes de diagnostic de la maladie actuellement mises au point diffèrent en fonction du stade évolutif de celle-ci dans l'organisme et, la mise en évidence de l'hypersensibilité retardée puis de la présence des anticorps anti TBB constitue les deux preuves de l'infection tuberculeuse due à *M. bovis* dans le cadre de sa détection précoce et tardive, respectivement. La méthode de diagnostic ante mortem de la TBB relative à la mise en évidence de l'hypersensibilité retardée chez le bovin, actuellement la mieux adaptée à la détection des troupeaux transhumants infectés est basée sur la réalisation de l'épreuve du test IDC. Cette dernière quand bien même peu satisfaisant, ne pourrait pas encore être remplacé par une autre méthode de diagnostic plus précise du même genre (36) et les animaux développant une anergie à l'IDC (preuve de chronicité) ne peuvent être détectés dans les troupeaux que par l'utilisation des tests sérologiques. La FPA est une technique mise au point pour la mise en évidence des anticorps (64) et un essai pour la détection des anticorps anti *M. bovis* a été précipitamment décrit (75, 129, 137) puis récemment modifié par utilisation d'une dérivée protéique du MPB70 appelée F-733 (65). Au cours de notre investigation, l'évaluation de l'IDC et du FPA a porté sur des données collectées sur des bovins n'ayant précédemment subi aucune épreuve de tuberculination et destinés à l'abattage. Il est à noter que l'hypothèse d'une probable influence d'un éventuel précédent test de tuberculination sur les résultats issus de notre épreuve d'IDC est à écarter et la caractérisation des isolats obtenus à partir des lésions collectées à l'abattoir nous ont permis d'identifier sans ambiguïté les bovins infectés par le *M. bovis*, preuve d'une infection tuberculeuse. En effet, ces résultats ont une fois de plus montré qu'un grand nombre des lésions ne provenaient pas des infections dues au *M. bovis*. Ceci pourrait s'expliquer par la faible sensibilité de l'IDC (32,4%) à détecter de façon globale, les lésions présentes chez des bovins par rapport à sa sensibilité (65,0%) à détecter les Membres du Complexe *Mycobacterium tuberculosis* lorsque notre standard de mesure optimal (> 2 mm) a été appliqué. Ces résultats ont également prouvé que le standard de mesure utilisé (> 2 mm) est plus fiable que celui de l'OIE (> 4 mm) dans le contexte tchadien, mais aussi témoigne de la nécessité et de l'importance de l'optimisation des standards de mesure de test tuberculinique dans des populations cibles. Des résultats similaires ont été signalés en Ethiopie (5) et sont susceptibles de s'appliquer dans d'autres pays d'Afrique sub-saharienne. Lors des études similaires effectuées en

Ouganda et en Tanzanie, des seuils standards de mesures plus bas que celui de l'OIE ont été également utilisés mais sans justification détaillée (22, 94). En utilisant notre seuil standard de mesure (> 2 mm), la prévalence des réagissants détectés au sein de notre population d'étude a été de 15%, se rapprochant ainsi du résultat obtenu en combinant les résultats issus de l'IDC et du DPM (14%). Ce qui montre que les investigations précédentes faites dans les autres régions du pays avaient sous estimé la prévalence de la maladie (MCMT) lors que des seuils standards de mesure plus élevés avaient été utilisés (32, 120), quand bien même la présence des mycobactéries non tuberculeuses ne pourraient rester sans influence sur les résultats.

Cependant, en vue de confirmer si les animaux infectés par les MCMT et qui n'avaient développé aucune allergie vis à vis du test IDC pourraient être identifiés par le test FPA, les résultats obtenus en utilisant les deux standards de mesures (OIE: > 4 mm, et celui de l'étude > 2 mm) ont été évalués à cet effet. Quatre bovins infectés par les MCMT sur 20 ont été détectés par le test IDC lorsque le seuil standard de mesure de l'OIE (> 4 mm) a été appliqué. Par contre 16 sur 20 ont été détectés lorsque le seuil standard de mesure proposé par la présente étude (> 2 mm) a été appliqué. Il vient de constater que les proportions de bovins infectés par le complexe tuberculeux et anergiques au test IDC, non détectables lorsque le seuil standard de mesure de l'OIE et celui proposé par la présente étude (> 2 mm) ont été isolément utilisés, sont: 16 / 20 et de 7 / 20 respectivement. Le GENios Pro a pu mettre en évidence 2 des 16 (ou 7) bovins tuberculeux anergiques à l'IDC et le SENTRY 100 n'a pu détecter qu'un seul. Au vu de ces données, quand bien même le nombre des bovins confirmés tuberculeux semble être négligeable, il n'y a aucune évidence que les animaux anergiques à l'IDC pourraient être détectés par le test FPA. Le test IDC demeure à cet effet, le test de référence pour la détection des bovins tuberculeux dans les élevages transhumants. Toutefois, il faut noter que, seulement 12% (13/108) des carcasses suspectées au niveau de l'abattoir furent réellement infectées par le *M. bovis*. Ceci reste un problème fondamental de santé publique en ce sens que, une carcasse infectée par le *M. bovis* et saisie de manière partielle pourrait être destinée à la l'alimentation de plusieurs familles. Par ailleurs, la pathologie bactérienne due aux mycobactéries non tuberculeuses demeure un problème entier de santé publique vétérinaire et le diagnostic de la TBB dans les troupeaux transhumants devrait à l'avenir tenir compte de l'influence des MNT aussi bien au niveau ante que post mortem. La mise en évidence précise de la tuberculose à *M. bovis* à ces deux niveaux de diagnostic ne semble pas être évidente eu égard à l'influence des différents stades évolutifs de la pathologie dans le temps mais aussi des infections relatives aux autres mycobactéries. A cette effet, l'étude se propose de donner l'intervalle de confiance allant de 13,3 – 18,0% mise en évidence lorsque le seuil de mesure de plus de 2mm a été appliqué dans le cadre du test IDC afin de pouvoir apprécier l'importance des infections liées aux mycobactéries (au sens large) dans les élevages transhumants, et que la proportion des animaux infectés par le *M. bovis* parmi ces dernières serait autour de 13 / 30. Toutefois lorsqu'on se réfère au Complexe *M. tuberculosis*, cette proportion est beaucoup plus important (20 / 30). Par ailleurs l'importance des pathologies dues

aux mycobactéries non tuberculeuses déjà signalée ci-haut, mérite bien d'être soulignée car ces dernières pourraient bien faire partie des maladies émergentes négligées tant du point de vu santé vétérinaire que santé publique.

8. Conclusions Générales, Recommandations et Perspectives

8.1. Conclusions Générales

Cette étude fait suite aux travaux de Schelling et Coll (120) et ceux de Diguimbaye et Coll., (40) dont les perspectives nécessitaient la poursuite des investigations relatives aux diagnostics et à l'épidémiologie de la TBB dans d'autres contés du Tchad. Elle nous a permis d'estimer la prévalence de la TBB dans une zone à forte concentration humaine et de prouver sa présence au sein d'un échantillon destiné à la consommation. Cette prévalence donne un aperçu de la situation épidémiologique réelle de la maladie dans les élevages transhumants de la zone méridionale du pays, et l'importance des suspicions ainsi que des cas confirmés tuberculeux parmi les bovins âgés de plus de 6 ans, témoigne de la chronicité de la TBB dans le cheptel bovin transhumant au sud du Tchad. Aucune différence génétique n'a été prouvée entre les deux principales races bovines en dépit de l'importance des bovins réagissants et des porteurs de lésions tuberculeuses une fois de plus constatée au sein de la race Mbororo suite au test IDC et au DPM, respectivement. Pour le contrôle anté mortem de la TBB, les résultats issus de la présente étude montre que le taux de détection réel des réagissants à l'IDC au sein des élevages issus du système transhumant dépend du choix du seuil de mesure qui dans ce cadre précis à été revu en baisse par rapport au standard de l'OIE. Cependant, la question de la détection des cas anergiques à l'IDC reste encore entière car le test FPA utilisé comme test auxiliaire lors de nos investigations n'a donné aucune satisfaction. Malgré l'importance des lésions dues aux autres mycobactéries dont l'apparence fait croire à une infection tuberculeuse, l'isolement de la souche *M. bovis* à partir des suspicions faites au niveau de l'abattoir de Sarh témoigne de l'efficacité des séances de nécropsie effectuées à cet effet. Toutefois l'absence des prélèvements qui devront être effectués au niveau des ganglions mésentériques des poumons parmi les prélèvements faits à l'abattoir lors de notre échantillonnage, suscite une question en ce qui concerne les organes à cibler dans le cadre des inspections post mortem relatives à la suspicion des lésions tuberculeuses animales. Les spoligotypes des souches *M. bovis* caractérisées nous ont permis d'avoir une idée sur l'origine et le mécanisme de la propagation de la TBB au niveau national, mais aussi au niveau de la sous région d'Afrique Centrale. Ces souches partagent avec le *M. bovis* BCG une caractéristique commune qui est le manque du spacer 30, montrant ainsi leur origine européenne liée aux importations du bétail durant la période coloniale. Le large spectre des souches de spoligotype SB944 constitue la preuve d'une dissémination liée au mouvement de transhumance ou de commerce du bétail sur pied tant au niveau national que régional. La mise en évidence de ces spoligotypes vient compléter la base des données nationales des souches *M. bovis* préalablement établies par Diguimbaye et coll., (40). La détermination du sens réel du dynamique de propagation de la TBB dans le bassin du Lac Tchad est liée à la réalisation d'une nouvelle carte de transhumance des pasteurs nomades eu égard au récent changement climatique qui a été à l'origine de la dégradation d'importantes superficies de plantes fourragères au niveau du sahel,

modifiant ainsi le circuit ancien. Elle est aussi liée à la description du circuit commercial du bétail sur pied entre les états membres de la Commission du Bassin du Lac Tchad (CBLT) et ceux de la zone CEMAC. La connaissance de ces deux facteurs sera d'un intérêt majeur quant à la gestion de la biodiversité des souches tuberculeuses animales dans le contexte sous régional et même continental.

8.2. Recommandation et Perspectives

Nous recommandons au Gouvernement de la République du Tchad d'inclure dans les stratégies nationales de lutte contre la pauvreté, la politique de sédentarisation des pasteurs nomades à travers la création des points d'abreuvement du bétail et la vulgarisation des cultures fourragères afin de limiter les mouvements du cheptel qui semblent être un facteur clé dans la dissémination des épizooties et autres pathologies, précisément la TBB. Un supplément en phosphore sera additionné aux eaux issues des forages afin d'éviter tout cas de PICA (dégradation du goût) et une stratégie basée sur l'approche pluridisciplinaire sera développée afin de limiter la surcharge des pâturages pouvant ainsi entraîner la dégradation des sols. Cette politique doit faire partie intégrante des objectifs du Plan à Moyen Terme de Recherche Agronomique du Tchad (PMTRA) et sa mise en œuvre doit faire l'objet d'une action intégrée entre les Ministères en charges de l'élevage, de l'Agriculture, de l'Environnement, de l'Eau et de la gestion de la Faunes Sauvages, actuellement unis par une "Équipe Mobile d'Intervention" dont l'un des objectifs est d'appuyer les acteurs de terrain à intervenir très rapidement en cas d'urgence relative à l'alerte des foyers des maladies à caractère épizootique.

Au niveau de la Direction des Services Vétérinaires du MERA, il sera question d'initier un projet de programme de lutte Contre la TBB au sein du REPIMAT. Les stratégies de ce programme seront basées sur la détection précoce des bovins infectés par l'agent causal de la tuberculose dans les élevages transhumants et de limiter la transhumance de tous les troupeaux suspectés. Ces derniers feront l'objet des contrôles périodiques relatifs à la détection des nouvelles suspicions jusqu'à ce qu'ils soient assainis. Dans le cadre du partenariat entre le LRVZ de Farcha et le REPIMAT, en ce qui concerne le contrôle et la surveillance anté mortem de la TBB au niveau national, il sera judicieux d'associer au test tuberculitique, un test auxiliaire du genre γ -IFN susceptible de détecter tous les cas se trouvant en début d'infection. Afin de mieux gérer les bovins anergiques au test tuberculitique, le développement d'un partenariat avec les institutions de recherche du Nord relatif à la mise au point des tests de dépistage sérologique adaptés à la détection des anticorps anti TBB dans les élevages transhumants du sahel (chez les zébus) sera d'un grand apport quant à la détermination de la prévalence réelle de la tuberculose dans le cheptel bovin. La vulgarisation du document national d'inspection des viandes rouges du MERA (en cours de validation) au niveau de tous les abattoirs et aires d'abattage du Tchad constituera un préalable à l'augmentation du taux de détection des carcasses suspectes et impropres à la consommation. La mise à disposition de la "Ligne verte" du projet "Grippe Aviaire" au profit de la

collecte des prélèvements d'organes suspectés tuberculeux aux niveaux de tous les abattoirs et aires d'abattage du pays contribuera aux activités de culture des mycobactéries du LRVZ de Farcha et à l'isolement des souches *M. bovis* circulant dans les autres régions du pays. Ceci permettra de faire un bilan général des spoligotypes circulant au niveau national en relation avec ceux circulant dans les pays voisins.

Nos recommandations concernent aussi la possibilité de combiner la gestion des ressources animales aux activités de contrôle sanitaire du bétail sur pied (sur la base de l'indemnisation des cas déclarés) afin d'éviter l'endémicité de la TBB dans les élevages. Il s'agirait là d'éviter le maintien prolongé des femelles allaitantes dans les troupeaux. Celles-ci feraient l'objet d'abattages systématiques suivis d'inspection post mortem au niveau des abattoirs et aires d'abattage. Dans le cadre de la gestion des zoonoses et de la Santé en milieu nomade, nos suggestions sont aussi adressées à l'endroit de la Division d'Hygiène du Milieu et Assainissement du Ministère de la Santé Publique d'appliquer le Code d'Hygiène relative à sa stratégie de sensibilisation de la masse, sur la politique de pasteurisation du lait frais provenant des vaches avant toute consommation car des souches *M. bovis* ont été isolées au cours de notre étude au niveau des mamelles.

La mise en place d'un réseau de laboratoires dans le cadre des activités de recherche du naissant Réseau Africain de Lutte contre la TBB en Afrique constituerait une condition primordiale en ce qui concerne la centralisation des informations sur les souches *M. bovis* Africaines. Ceci permettra de mieux planifier les actions de lutte commune au niveau des différentes sous régions continentales. Comme l'ont signalé les participants à la 18^{ème} Commission Régional de l'OIE pour l'Afrique, que la meilleure façon pour les pays développés qui ont pu éradiquer les maladies infectieuses y compris les zoonoses de protéger leur statut indemne est d'aider ceux en voie de développement de cesser à être les réservoirs des pathogènes, nous exhortons à cet effet la Direction générale de l'OIE à inscrire dans sa politique en Afrique, la mise sur pied des programmes sous régionaux d'éradication de la TBB. La subvention des kits de test de détection précoce de la TBB ainsi que ceux relatifs à la mise en évidence de la présence des anticorps dus à l'infection tuberculeuse par les États membres de l'Union Européenne ainsi que les États Unis d'Amérique sera d'un grand apport quant au succès de ces différents programmes sous régionaux de lutte et d'éradication de la maladie sur le continent Africain.

9. Bibliographie

1. ADDO K.K., OWUSU-DARKO K., YEBOAH-MANU D., CAULLEY P., MINAMIKAWA M., BONSU F., LEINHARDT C., AKPEDONU P., OFORI-ADJEI D., 2007. Mycobacterial species causing pulmonary tuberculosis at the Korle Bu Teaching Hospital, Accra. Ghana Medical journal, **41**: 52 – 57.
2. ALHADJI I., 1976. Bovine tuberculosis in four northern states of Nigeria. Thèse PhD, Ahmadou Bello University, Zaria, Nigeria, 236pp.
3. AMENI G., ASEFFA A., ENGERS H., YOUNG D., GORDON S., HEWINSON G., VORDERMEIER M., 2007. High prevalence and severity of pathology of bovine tuberculosis are higher in Holsteins than in Zebu breeds under field cattle husbandry in central Ethiopia. Clinical and Vaccine Immunology, **14** (10): 1356 – 1361.
4. AMENI G., ASEFFA A., HEWINSON G., VORDERMEIER M., 2009. Comparison of different testing schemes to increase the detection *Mycobacterium bovis* infection in Ethiopian cattle. Trop. Anim. Health Prod. **42** (3): 375 – 383.
5. AMENI G., HEWINSON G., ASEFFA A., YOUNG D., VORDERMEIER M., 2008. Appraisal of Interpretation Criteria for the Comparative Intradermal Tuberculin Test for Diagnosis of Tuberculosis in Cattle in Central Ethiopia. Clinical and Vaccine Immunology, **15**: 1272 – 1276.
6. ARANAZ A., DE JUAN L., BEZOS J., ALVAREZ J., ROMERO B., LOZANO F., PARAMIO J.L., LOPEZ-SANCHEZ J., MATEOS A., DOMINGUEZ L., 2006. Assessment of diagnostic tools for eradication of bovine tuberculosis in cattle co-infected with *Mycobacterium bovis* and *M. avium* subsp. Paratuberculosis. Veterinary research, **37** (4): 593 – 606.
7. ARANAZ A., LIEBANA E., MATEOS A., DOMINGUEZ L., VIDAL D., DOMIGO M., GONZALEZ O., RODRIGUEZ-FERRI E.F., BUNSCHOTEN A.E.B., VAN EMBDEN J.D. A., COUSINS D., 1996. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. Journal of Clinical Microbiology, **34**: 2734 – 2740.
8. AYELE W.Y., NEILL S.D., ZINSSTAG J., WEISS M.G., PAVLIK., 2004. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. Int. J. Tuberc. Lung Dis. **8**: 924 – 937.
9. BARLOW N.D., 2000. Non-linear transmission and simple models for bovine tuberculosis. J. Anim. Ecol., **69**:713 – 713.

10. BENDALI, 2006. La conception et la mise en œuvre de programme d'épidémiologie efficaces dans les pays d'Afrique subsaharienne. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **25** (1): 199-209.
11. BENET J.J., 2006. La tuberculose animale. In: *Polycopie des Ecoles Nationales Vétérinaires Françaises*, 96p.
12. BERRADA J., BARJAS-ROJAS J.A., 1995. Control of bovine tuberculosis in developing countries. In *Mycobacterium tuberculosis* infection in animals and humans (C. O. Thoen & J.H. Steel, eds). Iowa State University Press, Ames, 117 – 162.
13. BLACKWELL J.M., BARTON C.H., WHITE J.K., ROACH T.I.A., SHAW M.A., WHITEHEAD S.H., MOCK B.A., SEARLE S., WILLIAMS H., BAKER A.M., 1994. Genetic regulation of Leishmanial and mycobacterial infection: the Lsh/TtylBcg gen story continues. *Immunol. Lett.*, **43**: 99-107.
14. BROEKMAN J.F., 1994. Control strategies and programme management. In J.D.H. Porter and P.W.J. McAdam (ed.), *Tuberculosis. Back to the future*. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y., 171-192.
15. BROSCH R., GORDON S. V., MARMIESSE M., BRODIN P., BUCHRIESER C., EIGLMEIER K., GARNIER T., GUTIERREZ C., HEWINSON G., KREMER K., PARSONS L.M., PYM A.S., SAMPER S., VAN SOOLINGEN D., COLE S.T., 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99**: 3684 – 3689.
16. BUDDLE B.M., WEDLOCK, DENIS M., 2006. Progress in the development of tuberculosis vaccines for cattle and wildlife. *Veterinary Microbiology*, **112**: 191 – 200.
17. CADMUS S.I.B., ATSANDA N.N., ONI S.O., AKANG E.E.U., 2004. Bovine tuberculosis in one cattle herd in Ibadan in Nigeria. *Vet. Med.- Czech.*, **49**: 406 – 412.
18. CADMUS S., PALMER S., OKKER M., DALE J., GOVER K., SMITH N., KEITH J, HEWINSON R.G., GORDON S.V., 2006. Molecular analysis of human and bovine tuberculosis bacilli from a local setting in Nigeria. *Clinical Microbiology*, **44**: 29 – 34.
19. CASSIDY J.P., BRYSON T.D., GUTIERREZ M.M., FOSTER F., POLLOCK J.M., NEILL S.D., 2001. Lymphocytes subsets in experimentally induced early-stage bovine tuberculous lesions. *J. Comp. Pathol.* **124**: 46 – 51.

- 20.** CASSIDY J.P., BRYSON D.G., POLLOCK J.M., EVANS R.T., FOSTER F., NEILL S.D., 1998. Early lesion formation in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. J. Comp. Pathol., **19**: 27–44.
- 21.** CLEAVELAND S., MLENGEYA T., KAZWALA R.R., MICHEALI A., KAARE M.T., JONES S.L., 2005. Tuberculosis in Tanzanian wildlife. J. Wildl. Dis. **41**: 446 - 453.
- 22.** CLEAVELAND S., SHAW D.J., MFINANGA S.G., SHIRIMA G., KAZWALA R.R., EBLATE E., SHARP M., 2007. *Mycobacterium bovis* in rural Tanzania: risk factors for infection in human and cattle populations. Tuberculosis (Edinb.), **87**: 30 – 43.
- 23.** COLLINS J.D, 2001. Tuberculosis in cattle: new perspectives. Tuberculosis., **81**: 17 – 21.
- 24.** COLLINS D.M., ERASMUSON S.K., STEPHENS D.M., YATES G.F., De LISTLE G.W., 1993. DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* strains by restriction fragment analysis and hybridization with insertion elements IS1081 and IS6110. J. Clin. Microbiol., **31**: 1143 – 1147.
- 25.** COLLINS D.M., STEPHENS D. M., 1991. Identification of an insertion sequence IS1081 in *Mycobacterium bovis*. FEMS Microbiol Lett., **67**: 11–15.
- 26.** Communauté Économique des États de l'Afrique de l'Ouest (CEDEAO), Club du sahel de l'Afrique de l'Ouest (CSAO) / Organisation de Coopération et de développement économique (OCDE)., 2008. Élevage et marché régionale au Sahel et en Afrique de l'ouest, Potentialités et défis. Paris: Édition CSAO / OCDE., 162 p.
- 27.** CORNER L.A.L., 2006. The rôle of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. Vet. Microbiol., **112**: 303 - 312.
- 28.** COSIVI O., GRANGE J.M., DABORN C.J., RAVIGLIONE M.C., FUJIKURA T., COUSINS D., ROBINSON R.A., HUCHZERMEYER H.F.A.K., De KANTOR I., MESLIN F.-X., 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Emerging Infectious Disease, **4**: 59 -70.
- 29.** COUSINS D.V., WILLIAMS S.N., LIEBANA E., ARANAZ A., BUNSCHOTEN A., VAN EMBDEN J., TREVOR E., 1998. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigation of bovine tuberculosis. J. Clin. Microbiol., **36**: 168 – 178.
- 30.** DEGOMMIER J., 1957. New technique for staining the tubercle bacillus in fluorescence microscopy. Ann. Inst. Pasteur Paris., France, **92**: 692 - 694.

31. de KANTOR I.N., RITACCO V., 2006. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. *Vet. Microbiol.* **112**: 111–118.
32. DELAFOSSE A., GOUTARD F., THEBAUD E., 2002. Epidémiologie de la tuberculose et brucellose des bovins en zone péri-urbaine d'Abéché, Tchad. *Rev. Elev. Méd. Pays Trop.*, **55** : 5 - 13.
33. DELAFOSSE A., TRAORE A., KONE B., 1995. Isolement de souches de mycobactéries pathogènes chez des bovins abattus à l'abattoir de Bobo-Diouasso, Burkina Faso. *Revue Eélev. Méd. Vét. Pays*, **48** (4): 301 – 306.
34. DELAHAY R.J., de LEEUW A.N.S., BARLOW A.M., CLIFTON-HADLEY R.S., CHEESEMAN C.L., 2002. The Status of *Mycobacterium bovis* infection in UK wild mammals. A review. *Veterinary Journal*, **163**: 1-16.
35. DELAHAY R.J., SMITH G.C., BARLOW A.M., WALKER N., HARRIS A., CLIFTON-HADLEY R.S., CHEESEMAN C.L., 2006. Bovine tuberculosis infection in wild mammals in the south-west region of England: A survey of prevalence and a semi-quantitative assessment of the relative risks to cattle. *Veterinary Journal*, **164**: 90–105.
36. de LA RUA-DOMENECH R., 2006. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, **86**: 77–109.
37. De LISLE G.W., BENGIS R.G., SCHMITT S.M., O'BRIEN D.J., 2002. Tuberculosis in free-ranging wildlife: detection, diagnosis and management. *Rev. Sci. Tech. Off Int Epiz.* **21** (2): 317 – 334.
38. DONNELLY C. A., WOODROFE R., COX D.R., BOURNE F.J., CHEESEMAN C.L., 2006. Positive and negative effects of widespread badger culling on cattle tuberculosis. *Nature*, **439**: 843 - 846.
39. DIGUIMBAYE-DJAIBE C., 2004. La tuberculose humaine et animale au Tchad: Contribution à la mise en évidence et caractérisation des agents causaux et leur implication en santé publique. Thèse PhD, Université de Bâle, Suisse, 168 p.
40. DIGUIMBAYE-DJAIBE C., MARKUS H., NGANDOLO R., HASSANE M.H., GABY E, PFYFFER E., BAGGI F., HEWINSON G., TANNER M., ZINNSTAG J., SCHELLING E., 2006a.

Mycobacterium bovis isolated from tuberculous lesions in Chadian zebu carcasses. Em. Inf. Dis., **12**: 769 – 771.

41. DIGUIMBAYE-DJAIBE C., VINCENT V., SCHELLING E., HILTY M., NGANDOLO R., MAHAMAT A.A., PFYFFER G., BAGGI F., TANNER M., ZINSSTAG J., 2006b. Species identification of non-tuberculous mycobacteria from humans and cattle of Chad. *Société des vétérinaires suisses*, **5**: 225 - 276.

42. DOKALYO A., 2009. Deuxième recensement général de la population et de l'habitat au Tchad: les résultats sont connus. <http://www.cefod.org/spip.php>.

43. DUBOS R.J., MIDDLEBROOK G., 1947. Media for tubercle bacilli. Am. Rev. Tuberc., **56**: 334 – 345.

44. DUCHÉ J.C., BARRÉ J., 2005. Le test de transformation lymphocytaire (TTL) ou test de prolifération lymphocytaire (TPL). Dossier médico-technique, **303**: 322 -326.

45. EHRLICH P., 1882. Zur Färbung der Tuberkelbakterien. Aus dem Verein für innere Medizin zu Berlin. Deutsche Med Wochenscher, **8**:269 – 270.

46. EXCOFFIER L., LAVAL G., SCHNEIDER S., 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis Evolutionary Bioinformatics Online.

47. FAO. 2004. Secondary guidelines for development of national farm animal genetic resources management plans, Rome, Italy, pp 55.

48. FENG J., YUJING L., HASHAD M., ERWIN S., GROS P., GARRY A.L., JEO TEMPLETON W., 1996. Bovine natural Resistance Associated Macrophage Protein 1 (Nramp1) gen. Genome Res., **9**: 956 – 964.

49. FRANCIS J., 1958. Tuberculosis in Animals and Man. Cassll and Co, London.

50. GOUDET J., 1995. Fstat (version 1.2): A computer program to calculate f-statistics. Journal of Heredity **86**: 485 - 486.

51. GRANGE J.M., YATES M.D., 1994. HIV-related tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*. Eur Respir J., **7**: 1564-1566.

52. GRIFFIN J.F.T., MACKINTOSH C.G., BUCHAN G.S., 1995. Animal models of protective immunity in tuberculosis to evaluate candidate vaccines. *Trends Microbiol.*, **3**:418-424.
53. GROENEN P.M.A., BUNSCHOTEN A.E., VAN SOOLINGEN D., EMBDEN J.D.A., 1993. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel method. *Mol. Microbiol.*, **105**: 1057 – 1065.
54. HANOTTE O., JIANLIN H., 2005. Genetic characterization of livestock populations and its use in conservation decision-making. In: *The Role of Biotechnology for the characterization and conservation of crop, forestry, animal and fishery genetic resources*. FAO Workshop, Turin, Italy.
55. HAYDON D.T., CLEAVELAND S., TAYLOR L.H., LAURENSEN K., 2002. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerging infectious diseases*, **8**: 1468-1473.
56. HERENDA D., CHAMBERS P.G., ETTRIQUI A., SENEVIRATNA P., Da SILVA T.J.P., 1994. *Manual on Meat Inspection for Developing Countries*. Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations Rome, Italy.
57. HERMANS P.W.M., VAN SOOLINGEN M.D., BIK E.M., de HAAS P.E.W., DAL J.W., VAN EMBDEN J.D.A., 1991. The insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in hot-spot integration region for insertion element in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect. Immun.*, **59**: 2695 – 2705.
58. HILTY M., 2006. *Molecular epidemiology of mycobacteria: Development and refinement of innovative molecular typing tools to study mycobacterial infections*. Thèse PhD, Université de Bâle, Suisse, 157 p.
59. HOPE J.C., THOM M.L., VILLARREAL-RAMOS B., VORDERMEIER H.M., HOWARD C.J., 2005. Vaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG induces protection against challenge with virulent *Mycobacterium bovis*. *Clinical and Experimental Immunology*, 139 - 148.
60. IBEAGHA-AWEMU E. M., JANN O. C., WEIMANN C., ERHARDT G., 2004. Genetic diversity, introgression and relationships among west/central African cattle breeds. *Genetics Selection Evolution* **36**: 673-690.
61. INWALD J., HINDS J., PALMER S., DALE J., BUTCHER P., HEWINSON R.G., GORDON S.V., 2003. Genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains used for production of purified protein derivative. *Journal of Clinical Microbiology*, **41** (4): 3929 – 3932.

International Office of Epizootics (OIE), 2006. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Paris, France.

62. JACKSON R., COOKE M.M., COLEMA J.D., MORRIS R.S., 1995. Naturally occurring tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*): I. An epidemiological analysis of lesion distribution. New Zeal Vet. J. **43** (7): 306 - 314.

63. JOHNSTON A.M., 2006. The 1901 Congress of tuberculosis: John McFadyean and beyond. Vet. Microbiol., feb 25; **112** (2-4): 348 – 368.

64. JOLLEY M.E., NASIR M.S., 2003. The use of fluorescence polarization assays for the detection of infectious diseases. Comb. Chem. High Throughput. Screen, **6**: 235–244.

65. JOLLEY M.E., NASIR M.S., SURUJBALLI O.P., ROMANOWSKA A., RENTERIA T.B., De la MORA A., LIM A., BOLIN S.R., MICHEL A.L., KOSTOVIC M., CORRIGAN E.C., 2007. Fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in bovine sera. Vet. Microbiol. **120**: 113–121.

66. KAMERBEEK J., SCHOULS L., KOLK A., VAN AGTERVELD M., VAN SOOLINGEN D., KUIJPER S., BUNSCHOTEN A, MOLHUIZEN H., SHAW R., GOYAL M., VAN EMBDEN J., 1997. Journal of Clinical Microbiology, **35**: 907 – 914.

67. KAO R.R., ROBERT M.G., 1999. "A comparison of wildlife control and cattle vaccination as method for the control of the bovine tuberculosis". Epidemiol Infect, **122**: 505-519.

68. KAUFMAN S.H.E., SHAIBLE U.E., 2005. 100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of tubercle bacillus. Trends in Microbiology, **13** (10): 469 – 475.

69. KAZWALA R.R., DABORN C.J., KUSILUKA L.J., JIWA S.F., SHARP J.M., KAMBARAGE DM., 1998. Isolation of *Mycobacterium* species from raw milk of pastoral cattle of the Southern high lands of Tanzania. Trop. Anim. Health. Prod., **30** : 233 – 239.

70. KAZWALA R.R., DABORN C.J., SHARP J.M., KAMBARAGE D.M., JIWA S.F., MBEMATI N.A., 2001. Isolation of *Mycobacterium bovis* from human cases cervical adenitis in Tanzania: a cause for concerne? Int. J. Tuberc. Lung Dis., **5**: 87-91.

71. KAZWALA R.R., KUSILUKA L.J., SINCLAIR K., SHARP JM, DABORN C.J., 2006. The molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in Tanzania. *Veterinary Microbiology*, **112**: 201-210.
72. KENNEDY H.E., WELSH M.D., BRYSON D.G., CASSIDY J.P., FOSTER F.I., HOWARD C.J., COLLINS R.A., POLLOCK J.M., 2002. Modulation of immune responses to *Mycobacterium bovis* in cattle depleted of WC1(+) gamma delta T cells. *Infect. Immun.* **70**: 1488 – 1500.
73. KIROS T.,1998. Epidemiology and zoonotic importance of bovine tuberculosis in selected sites of Eastern Shewa Ethiopia. Thèse Msc, Faculty of Veterinary Medicine, Addis Ababa, University and Freie Universitat, Berlin, Germany.
74. KRIWAN D., 2007. SOP: LJ (Lowenstein Jensen) Medium. Tuberculosis Section, Bacteriology Department, Veterinary Laboratory Agency.
75. LIN M., SUGDEN E.A., JOLLEY M.E., STILWELL K., 1996. Modification of the *Mycobacterium bovis* extracellular protein MPB70 with fluorescein for rapid detection of specific serum antibodies by fluorescence polarization. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **3**: 438–443.
76. LUGTON I., PFEIFFER D., JACKSON R., MORRIS R., 1997. Stress and the Epidemiology of tuberculosis in Possums. *Epidémiol. Santé anim.*, 31 - 32.
77. LYASHCHENKO K.P., SINGH M., COLANGELI R., GENNARO M.L., 2000. A multi-antigen print immunoassay for development of serological diagnosis of infectious disease. *J. Immunol. Meth.* **242**: 91 – 100.
78. MAHO A., MBAKASSE R. N., BOULBAYE N., 1999. Causes de saisies aux abattoirs du Tchad oriental. LRVZ/F. Novembre, 1999 N'Djaména, Tchad, Actes des IIIèmes Journées Agro-Sylvo-Pastorales.
79. MALO D., SKAMENE, 1994. Genetic control of host resistance to infection. *TIG.*, **10**: 365 – 371.
80. MATHEWS F., MACDONALD D.W., TAYLOR G.M., GELLING M., NORMAN R.A., HONESS P.E., FOSTER R., GOWER C.M., VARLEY S., HARRIS A., PALMER S., HEWINSON G., WEBSTER J.P., 2006. Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in British farmland wildlife: the importance to agriculture. *Proceeding-Royal of London Biological Sciences*, **273**: 357-365.

- 81.** MENZIES F.D., NEILL S.D., 2000. Cattle to Cattle transmission of bovine tuberculosis. The veterinary Journal, **160** (6): 92 – 106.
- 82.** MICHEL A.L., 2002. Implications of tuberculosis in African wildlife and livestock. The domestic animal/wildlife interface. Issues for disease control, conservation, sustainable food production and emerging diseases. Ann NY Acad. Sci., **969**: 251-255.
- 83.** MICHEL A.L., COETZEE M.L., KEET D.F., MRE L., WARRE R., COOPER D., BENGIS R.G., KREMER K., VAN HELDEN P., 2008. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* isolates from free-ranging wildlife in South African game reserves. Veterinary Microbiology, **113**(4): 335 - 343.
- 84.** MICHAEL D., NEIL D.W., BRYCE M.D., 2005. INF- γ enhances bovine macrophage responsiveness to *Mycobacterium bovis*: Impact on bacterial replication, cytokine release and macrophage apoptosis. Immunology and Cell Biology., **83**: 643 -650.
- 85.** MONAGHAN M.L., DOHERTY J.L., COLLINS J.D., KAZDA J.F., QUINN P.J., 1994. The tuberculin test. Veterinary Microbiology, **40**: 111 – 124.
- 86.** MORE S.J., COLLINS J.D., GORMLEY E., GOOD M., SKUCE R.A. , POLLOCK J.M., 2005. Preface: Fourth International Conference on Mycobacterium bovis held in Dublin, Ireland during 22–26 August 2005. Veterinary Microbiology.
- 87.** MORRIS R.S., PFEIFFER D.U., JACKSON R., 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. Veterinary Microbiology **40**: 153-157.
- 88.** MÜLLER B., HILTY M., BERG S., CARMEN M., GARCIA-PELOYA, DALE J., BOSCHIROLI M.L., CADMUS S.S., NGANDOLO B.N.R., DIGUIMBAYE-DJAIBE C, KAZWALA R, BONFOH B., BETTY M., JANPOP-LAFOURCAD, SARAOUI N., DJAMEL G., ASERFFA A., MESERET H.M., RAZANAMPARANY V.R., RAMAROKOTO H., DJONNE B., OLOYA J., MACHADO A., MUCAVELE C., SKJERVE E., PORTEALS F., RIGOUTS L., ANTA M., ANNELE M., KALLENIOUS G., VAN HELDEN P.D , HEWINSON G., ZINSSTAG J., GORDON S.V., SMITH N., 2009. African 1; An Epidemiologically Important Clonal Complex of *Mycobacterium bovis* Dominant in Mali, Nigeria, Cameroon and Chad. J. bacteriol., **191**: 1951-1960.
- 89.** NEIL D.W., MARGOT A.S., GEOFFREY W., de LISTLE, BRYCE M., BUDDLE N.Z., 2002. Control of Mycobacterium bovis and the risk to human population. Microbes and infections., **4** (4): 471.

90. NEILL S.D., O'BRIEN J.J., HANNA J., 1991. A mathematical model for *Mycobacterium bovis* excretion from tuberculous cattle. *Veterinary Microbiology*, **28**: 103-109.
91. NIOBE-EYANGO S.N., KUABAN C., SORLIN P., CUNIN P., THONNON J., SOLA C., RASTOGI N., VINCENT V., GUTIERREZ M.C., 2003. Genetic biodiversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from patients with pulmonary tuberculosis in Cameroon. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 2547-2553.
92. NJANPOP-LAFOURCADE B.M., INWALD J., ANNICK O., DURAND B., HUGHES S., THOREL M.F., HEWINSON G., HADDAD N., 2001. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Cameroon. *J Clin Microbiol* **39**: 222-227.
93. O'BRIEN D.J., SCHMITT SM., FITZGERALD S.D., BERRY D.E., HICKLING G.J., 2006. Managing the wildlife reservoir of *Mycobacterium bovis*: the Michigan, USA, experience. *Veterinary Microbiology*, **112**: 313 - 323.
94. OLOYA J., OPUDA-ASIBO J., DJONNE B., MUMA J.B., MATOPE G., KAZWALA R., SKJERVE E., 2006. Responses to tuberculin among Zebu cattle in the transhumance regions of Karamoja and Nakasongola district of Uganda. *Trop. Anim. Health Prod.* **38**: 275–283.
95. OMER M.K., SKJERVE E., WOLDEHIWET Z., HOLSTAD G., 2001. A cross-sectional study of bovine tuberculosis in dairy farms in Asmara, Eritrea. *Trop. Anim. Health Prod.*, **33**: 295 - 303.
96. O'REILLY L.M., DABORN C.J., 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuberc. Lung Dis.*, **76**: 1 – 46.
97. OUAGAL M., HENDRIKX P., BERKVEN D., NCHARE A., Cisse B., AKPELI P.Y., SORY K., SAEGERMAN C., 2008. Les réseaux d'épidémiologie des maladies animales en Afrique francophone de l'Ouest et du Centre. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **27** (3): 689-702.
98. PERPEZA A., 1963. Importance du farcin chez le zébu du Tchad. *Bull. Soc. Path. Exot.*, **56**: 375 – 383.
99. PHILLIPS C.J.C., FOSTER C.R.W., MORRIS P.A., TEVERSON R., 2003. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Res. Vet. Sci.*, **74**: 1 – 15.

- 100.** POLLOCK J.M., McNAIR J., BASSETT H., CASSIDY J.P., COSTELLO E., AGGERBECK H., ROSENKRANDS I., ANDERSEN P., 2003. Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identify tuberculosis-infected cattle. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 1856–1860.
- 101.** POLLOCK J.M., NEILL S.D., 2002. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet. J.*, **163**: 115 – 127.
- 102.** POLLOCK J.M., POLLOCK D.A., CAMPELL D.G., GIRVIN R.M. CROCKARD A.D., NEILL S.D., MACKIE D.P., 1996. Dynamic changes in circulating and antigen-responsive T-cell subpopulations post-*Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Immunology*, **87**: 236 – 241.
- 103.** POLLOCK J.M., WELSH M.D., 2002. The WC1 gama delta population in cattle – A possible role in resistance to intracellular infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **89** (3-4): 104 – 114.
- 104.** POLLOCK J.M., WELSH M.D., McNAIR J., 2005. Immune responses in bovine tuberculosis: toward new strategies for the diagnosis and control of disease. *Vet. Immunol. Immuopathol.*, **108**: 37-43.
- 105.** POTGIETER L.N.D., 1988. Immunosuppression in cattle as a result of bovine viral diarrhea virus infection. *Agri-Practice* **9**: 7 - 14.
- 106.** PRITCHARD D.G., 1988. A Century of bovine tuberculosis 1888 - 1988: Conquest and Controversy. *Journal of Comparative Pathology*, **99**: 357 - 388.
- 107.** PRITCHARD J. K., STEPHENS M., DONNELLY P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945-959.
- 108.** QIAGEN 2007. Qiagen: sample and assay technologies.
<http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000190>.
- 109.** RAMAROKOTO H., RASOLONAVALONA T., ANDRIANASOLO D., RATSIMBA L., RAZAFITSIAROVANA I., VINCENT V., RASOLOFO R.V., 2003. Un cas de tuberculose pulmonaire à *Mycobacterium bovis* multirésistant à Madagascar. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, **69**: 42 - 45.
- 110.** RASOLOFO R.V., MENARD D., RASOLONAVALONA T., RAMAROKOTO H., RAKOTOMANANA F., AUREGAN G., VINCENT V., CHANTEAU S., 1999. Prevalence of

Mycobacterium bovis in human pulmonary and extrapulmonary tuberculosis in Madagascar. *Int J Tuberc Lung Dis.*, **3** : 632 - 634.

111. RENWICK A.R., WHITE P.C., BENGIS R.G., 2006. Bovine tuberculosis in southern African wildlife: a multi-species host-pathogen system. *Epidemiol Infect.* 1-12.

112. RICHARD L., EVA N., SYLVIA C., JAN VAN E., CIARAN McNAMEE, RAFAEL R.D., JAMES T., ANNE F., 1999. Transcontinental Spread of Multidrug-resistant *Mycobacterium bovis*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **159** (6): 2014-2017.

113. RIGOUTS L., MAREGEYA B., TRAORE H., COLLART J.P., FISSETTE K., PORTAELS F., 1996. Use of DNA restriction fragment typing in the differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from animals and humans in Burundi. *Tuber Lung Dis.*, **77**: 264 - 268.

114. RITACCO V., LOPEZ B., De KANTOR I.N., BARRERA L., ERRICO F., NADER A., 1991. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* **50**: 365 – 367.

115. ROOK G.A., HERMANDEZ – PANDO R., 1996. The pathogenesis of tuberculosis. *Ann. Rev. Microbiol.* **50**: 259 – 284.

116. ROSS B.C., RAIOS K., JACKSON K., DWYER B., 1992. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J. Clin. Microbiol.*, **30**: 942 – 946.

117. RYAN T.J., LIVINGSTON P.G., RAMSEY D.S., de LISTLE G.W., NUGENT G., COLLINS D.M., BUDDLE B.M., 2006. Advances in understanding disease epidemiology and implications for control and eradication of tuberculosis in livestock: the experience from New Zealand. *Vet. Microbiol.* **112**: 211 – 219.

118. SAHADEVAN R., NARAYANAN S., PARAMISAVAN C.N., PRABHAKAR R., NARAYANAN P.R., 1995. Restriction fragment length polymorphism typing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, India, by use of direct-repeat probe. *J. Clin. Microbiol.*, **33**: 3037 – 3039.

119. SALMAN H. SIDDIQI, RÜSCH-GERDES S., 2006. Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT): Culture and Drug Susceptibility Demonstration Projects. OMGIT™ Procedure annual, Foundation for the Innovative New Diagnostics, 52p.

- 120.** SCHELLING E., DIGUIMBAYE C., DAOUD S., DAUGLA D.M., BIDJEH K., TANNER M., ZINSSTAG J., 2000. La tuberculose causée par *Mycobacterium bovis* : résultats préliminaires obtenus chez les pasteurs nomades Foulbés et Arabes dans le Chari-Baguirmi au Tchad. Sempervira ,Centre Suisse de Recherches Scientifiques, Abidjan, Côte d'Ivoire, **8**: 44-55.
- 121.** SECHI L. A., ZANETTI S., SANGUINETTI M., MOLICOTTI P., ROMANO L., LEORI G., DELOGU G., BOCCIA S., LA SORDA M., FADDA G., 2001. Molecular Basis of Rifampin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium bovis* Strains Isolated in Sardinia, Italy. *Antimicrob. Agents Chemother*, **45**: 1645-1648.
- 122.** SHITAYE J.E., TSEGAYE W., PAVLIK I., 2007. Bovine tuberculosis infection in animal and human populations in Ethiopia: a review. *Veterinari Medicina*, **52** (8): 317 – 332.
- 123.** SIDIBE S.S., DICKO N.A., FANE A., DOUMBIA R.M., SIDIBE C.K., KANTE S., MANGANE O., KONATE B.,KONE A.Z., MAIGA M.S., FOFANA M., 2003. Tuberculose bovine au Mali: résultats d'une enquête épidémiologique dans les élevages laitiers de la zone périurbaine du district de Bamako. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, **56** (3-4) : 115 -120.
- 124.** SKINNER M.A., PALMER N., McCARTHY A., BUDDLE B.M., 2003. Cytotoxic T-cell responses to *Mycobacterium bovis* during experimental infection of cattle with bovine tuberculosis. *Immunology* **110**: 234 – 241.
- 125.** SMITH N.H., GORDON S.V., de la RUA-DOMENECH R., RICHARD S. CLIFTON-HADLEY, HEWINSON R.G., 2006. Bottlenecks and Broomsticks: The molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. *Nature Review*, **4**: 670 – 681.
- 126.** SMYTH A.J., WELSH M.D., GIRIN R.M., POLLOCK J.M., 2001. In vitro responsiveness of $\gamma\delta$ T cells from *Mycobacterium bovis* infected cattle to mycobacterial antigens: Predominant involvement of WC1(+) cells. *Infect. Immunol.*, **69**: 89 -96.
- 127.** SNIDER D.E., 1982. The tuberculin skin test. *American Review of Respiratory Disease*, **125**: 108 – 118.
- 128.** SULIEMAN M. S., HAMID M. E., 2002. Identification of Acid Fast Bacteria From Caseous Lesions in Cattle in Sudan. *J. Vet. Med. B.*, **49**: 415-418.

- 129.** SURUJBALLI O.P., ROMANOWSKA A., SUGDEN E.A., TURCOTTE C., JOLLEY M.E., 2002. A fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in cattle sera. *Vet. Microbiol.* **87**: 149–157.
- 130.** Tchad. Rapport statistique, 1996. Ministère de l'Élevage, 96p.
- 131.** TEKLU A., ASEEGED B., YIMER E., GEBEYEHU M., WOLDESENBET Z., 2004. Tuberculous lesions not detected by routine abattoir inspection: the experience of the Hossana municipal abattoir, Southern Ethiopia. *Review of Science and Technology, Office International des Epizooties.*, **23**: 957 – 964.
- 132.** TORO M., CABALLERO., 2004. Characterisation and conservation of genetic diversity between breeds. In: Proceedings 55th EAAP Annual Meeting, Bled, Slovenia.
- 133.** USAID | STOP AI, 2009. Expédition par voie aérienne internationale des échantillons contaminés par le virus de la Grippe Aviaire. Association internationale du transport aérien (IATA), réglementation sur des matières dangereuses.
- 134.** VAN SOOLINGEN D., QIAN L., de HAS P.E.W., DOUGLAS J.T., TRAORE H., PORTAELTS F., QING H.Z., ENKHASAIKAN D., VAN EMBDEN J.D.A., 1995. Predominance of single genotype of *Mycobacterium bovis* in countries of East Asia. *J. Clin. Microbiol.*, **33**: 3234 – 3238.
- 135.** WAHLSTRÖM H., ENGLUND L., 2006. Adopting control principles in novel setting. *Veterinary Microbiology*, **112**: 265 – 271.
- 136.** WARREN R. M., STREICHER E. M., SAMPSON S. L., VAN der SPUY G. D., RICHARDSON M., NGUYEN D., BEHR M. A., VICTOR T. C., VAN HELDEN P. D., 2002. Microevolution of the Direct Repeat Region of *Mycobacterium tuberculosis*: Implications for Interpretation of Spoligotyping Data. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 4457 - 4465.
- 137.** WATERS W.R., PALMER M.V., THACKER T.C., BANNANTINE J.P., VODERMEIER H.M., HEWINSON R.G., GREENWALD R., ESFANDIARI J., McNAIR J., POLLOCK J.M., ANDERSON P., LYASHCHENKO K.P., 2006. Early antibody responses to experimental *Mycobacterium bovis* infection of cattle. *Clin. Vaccine Immunol.*, **13**: 648 – 654.
- 138.** WAYNE L. G., Kubica G.P., 1986. The mycobacteria. p 1435-1457.

- 139.** WIPPLE D.L., PALMER M.V., SLAUGHTER R.E., JONES S.L., 2001. Comparison of purified protein derivatives and effect of skin testing on results of a commercial gamma-interferon assay for diagnosis of tuberculosis in cattle. *Journal of Veterinary Diagnosis and Investigation*, **13**: 117 – 122.
- 140.** WOOD P.R., JONES S.L., 2001. BOVIGAM™: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, **81**: 147 – 155.
- 141.** WOOLLIAMS J., TORO M., 2007. Chapter 3. What is genetic diversity? In: *Utilisation and conservation of farm animal genetic resources*. Wageningen Academic Publishers, Netherlands, p55-74.
- 142.** WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 1994. Report of a WHO/FAO/OIE consultation on animal tuberculosis vaccines; 1994 Aug 3-5; Geneva, Switzerland. Geneva: The Organization; 1994. Unpub. document WHO/CDS/VPH/94.138.
- 143.** ZANELLA G., 2007. Tuberculose bovine dans une population de cerfs et de sangliers sauvages: Epidémiologie et modélisation. Thèse de Doctorat, Université Paris XI, France, 199 p.
- 144.** ZEUEH V., 1993. Maîtrise de la reproduction et amélioration génétiques des ruminants. Universités Francophones. *Actualités Scientifiques*, p181-186.

10. Annexes

10.1. Curriculum Vitae

NOM: NGANDOLO BONGO NARE

PRÉNOM:

ADRESSE: Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques (LRVZ) de Farcha.
BP: 433 N'Djaména Tchad
Tel: (+235) 252 74 75 ou (+235) 52 74 76
Fax: (+235) 252 37 22
LaboFarcha@intnet.td
Tel portable:(+235) 66 23 05 24
Mail: bongo_nov@yahoo.fr

DATE ET LIEU DE NAISSANCE: le 11 février 1970 à Moundou (Tchad)

NATIONALITÉ: Tchadienne.

ÉTAT CIVIL Marié.

FORMATIONS:

Du 22 au 27 février 2010: Formation à la Rédaction Scientifique organisée par le Système National de Recherche Agricole (SNRA) du Tchad. Formation assurée par Chantal LOISON du CIRAD.

Du 10 au 15 mai 2010: Formation en méthodes quantitatives et statistiques en écologie et épidémiologie organisée à l'École Inter-État de Sciences et Médecine Vétérinaire de Dakar (Sénégal) par le Consortium de Recherches sur la Santé de la Population et l'Écosystème "Afrique One".

Du 14 au 18 septembre 2009: Formation en Assurances Qualité dans les Laboratoires de Diagnostics Vétérinaires organisée à Douala (Cameroun) par le Réseau des Laboratoires Vétérinaires Nationaux d'Afrique du Centre et de l'Ouest (RESOLAB).

Du 15 septembre au 15 décembre 2009: Formation en Épidémiologie à l'Institut Tropical Suisse (Modélisation).

Du 15 octobre 2008 au 15 Janvier 2008: Formation en Biostatistique et Epidémiologie à l'Institut Tropical Suisse de Bâle (Suisse) avec validation des crédits point en Biostatistique, Epidémiologie Méthodes et Concepts.

Du 03 au 25 juin 2008: Formation en technique de diagnostic moléculaire (Spoligotyping, PCR (Genus typing, Deletion typing, et Variable Number Tandem Repeat (VNTR)) et méthodes de rédaction des procédures (Standard Operating Method (SOP)) et de mise en place d'un laboratoire de la Tuberculose Bovine au Veterinary Laboratory Agency (VLA) de Weybridge (Londres) en Angleterre.

Du 27 août au 13 septembre 2007: Formation en technique de diagnostic moléculaire (Spoligotyping) de la tuberculose bovine au Veterinary Laboratory Agency (VLA) de Weybridge (Londres) en Angleterre.

Du 15 septembre au 30 octobre 2007 Formation en Biostatistique et Epidémiologie à l'Institut Tropical Suisse de Bâle (Suisse).

Du 20 au 03 mars 2006: Formation en Assurance Qualité à Arusha en Tanzanie.

1992-2005: Études en Biologie à l'Université de N'Djamena, Université de Bangui et Université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD) Sénégal.

2005: DEA (Diplôme d'Études Approfondies) en Biologie animale à l'UCAD, thème "Contribution à l'étude des Myxosporidies et Myxosporidioses des poissons du lac Tchad".

1999: Maîtrise de Biologie animale: "Détermination des paramètres sanguins chez les zébus (*Bos indicus*) centrafricain et incidence des saisons" (Université de Bangui / Institut Pasteur de Bangui).

1996: Licence en Sciences naturelles à l'université de N'Djaména.

1995: Diplôme d'Études Universitaires Générales (DEUG) en Sciences Naturelles.

1992: Baccalauréat du second degré, série D, Collège Charles Lwanga (CCL) de Sarh.

EXPÉRIENCES PROFESSIONNELLES :

Octobre 2009: Chef de service Bactériologie au LRVZ-Farcha.

Avril 2006: Responsable Assurance Qualité au LRVZ-Farcha.

2000-2006: Assistant de laboratoire dans le projet "Santé des Nomades" au LRVZ de Farcha (Collecte des échantillons, traitement et analyse des échantillons au laboratoire de mycobactérie, saisie des données, Diagnostic de la tuberculose par la culture et le Polymères Chain Réaction (PCR)).

1999: Stage de formation en hématologie et biochimie à l'Institut Pasteur de Bangui (République Centrafricaine).

1998: Professeur de Biologie au Collège d'Enseignement général de Koundoul (Chari Baguirmi) dans le cadre du "Projet Taiwan".

1998: Stage au service de Virologie Recherche au LRVZ de Farcha (Initiation à la technique ELISA).

LANGUES:

Français: écrit et parlé (Bien)

Anglais: écrit et parlé (Assez bien)

Arabe tchadien: parlé (Assez bien)

Sango: parlé (Assez bien)

Wolof: parlé (passable)

CONNAISSANCES EN INFORMATIQUE ET MAÎTRISE DES LOGICIELES:

Word: saisie de texte. Assez bien (Certificat de formation au Centre de Calcul Informatique de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar).

Excel: Assez bien (Certificat de formation au Centre de Calcul Informatique de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar).

Access: Assez bien. Masque des données, saisie des données (Certificat de formation au Centre de Calcul Informatique de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar).

EPIInfo: passable.

Stata: assez bien.

Power point : assez bien

Reference Manager New v10: passable.

Zotero: passable

Logiciel R pour analyse statistique: assez bien.

Notions préliminaires de maintenance en informatique: Certificat de formation au Centre de Calcul Informatique de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar.

APPARTENANCE A DES RESEAUX DE RECHERCHES ET DE PRESTATIONS:

1- Réseau africain (Est-Ouest) de recherche sur la tuberculose:

Maroc (Université de Rabat),

Mauritanie (Institut national d'Hygiène),

Sénégal (École Inter Etats de Médecine Vétérinaire),

Mali (Institut du Sahel),

Nigeria (University of Ibadan),

Tanzanie (University of Agriculture Morogoro)

Tchad (Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farha),

2- Afrique One: an African Institution Initiative, African Research Consortium for

Ecosystem and Population Health: "Expanding Frontiers in Health".

3- Réseau des Laboratoires Vétérinaires Nationaux d'Afrique du Centre et de l'Ouest (RESOLAB).

PUBLICATIONS:

B.N. NGANDOLO C. DIGUIMBAYE-DJAIBE B. MÜLLER L. DIDI M. HILTY I. SCHILLER E. SCHELLING B. MOBEAL B. S. TOGUEBAYE A. J. AKAKPO J. ZINSSTAG 2009. Diagnostic ante et post mortem de la tuberculose bovine au sud du Tchad: cas des bovins destinés à l'abattage. Accepté pour publication de la Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux (Vol.62. N°2, 2009).

BONGO NARÉ RICHARD NGANDOLO, BORNA MÜLLER, COLETTE DIGUIMBAYE-DJAIBE, IRENE SCHILLER, BEATRICE MARG-HAUFE, MONICA CAGIOLA, MICHAEL JOLLEY, OM SURUJBALLI, AYAYI JUSTIN AKAKPO, BRUNO OESCH, JAKOB ZINSSTAG, 2009. Comparative assessment of Fluorescence Polarization and Tuberculin Skin Testing for Diagnosis of Bovine Tuberculosis in Chadian Cattle. Preventive veterinary Medicine 89: 81-89.

BORNA MÜLLER, PENELOPE VOUNATSOU, BONGO NARÉ RICHARD NGANDOLO, COLETTE DIGUIMBAYE-DJAIBE, IRENE SCHILLER, BEATRICE MARG-HAUFE, BRUNO OESCH, ESTHER SCHELLING, JAKOB, ZINSSTAG, 2009. Bayesian Receiver Operating Characteristic Estimation of Multiple Tests for Diagnosis of Bovine Tuberculosis in Chadian Cattle. PlosOne | www.plosone.org | volume 4 | Issue 12 | e8215.

C. FLURY, B.N.R. NGANDOLO, B. MÜLLE, J. ZINSSTAG & H.N. KADARMIDEEN, 2009. Molecular characterization of two common Chadian cattle breeds. AGRI, 44: 67-76.

BORNA MÜLLER, MARKUS HILTY, STEFAN BERG, M. CARMEN GARCIA-PELOYA, JAMES DALE, M. LAURA BOSCHIROLI, SIMEON CADMUS, BONGO NARÉ RICHARD NGANDOLO, COLETTE DIGUIMBAYE-DJAIBE, RUDOVICK KAZWALA, BASSIROU BANFOH, BETTY M. NJANPOP-LAFOURCADE, NAIMA SARAoui, DJAMEL GUETARNI, ABRAHAM ASERFFA, MESERET H. MEKONNEN, VOAHANGY RASOLOFO RAZANAMPARANY, HERIMANANA RAMAROKOTO, BERIT DJONNE, JAMES OLOYA, ADELINA MACHADO, CUSTODIA MUCAVELE, EYSTEIN SKJERVE, FRANCOISE PORTEALS, LEEN RIGOUTS, ANITA MICHEL, ANNÉLLE MÜLLER, GUNILLA KÄLLENIOUS, PAUL D VAN HELDEN, R. GLYN HEWINSON, JAKOB ZINSSTAG, STEPHEN V. GORDON AND NOEL H. SMITH, 2008. African 1; An Epidemiologically Important Clonal Complex of *Mycobacterium bovis* Dominant in Mali, Nigeria, Cameroon and Chad. Journal of Bacteriology, **191** (6): 1951 – 1960.

C.DIGUIMBAYE, E.SHELLING, G.E.PFYFFER, F.BAGGI, R. NGANDOLO, G.NDOUTAMIIA, M.TANNER, J.ZINSSTAG, 2004. Premiers isolements de Mycobactéries tuberculeuses chez l'homme et l'animal au Tchad. *Médecine*. 64, N°5 : 482-485.

C.DIGUIMBAYE, M.HILTY, R.NGANDOLO, H.H.MAHAMAT, G.E. PFYFFER, F.BAGGI, M.TANNER, E.SCHELLING and J. ZINSSTAG, 2006. Molecular Characterization and Drug Resistance Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Chad. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. 44, N°4:1575-1577.

C.DIGUIMBAYE-DJAIBE, M.HILTY, R.NGANDOLO, H.H.MAHAMAT, G.E.PFYFFER, F.BAGGI, G.HEWINSON, M.TANNER, J.ZINSSTAG and E.SCHELLING. *Mycobacterium bovis* isolates from tuberculous lesions in Chad Zebu carcasses, 2006. *Emerging Infectious Diseases*. 12, N°5 : 769-771.

C.DIGUIMBAYE-DJAIBE, V. VINCENT, E. SCHELLING, M. HILTY, R. NGANDOLO, H. H. MAHAMAT, G. PFYFFER, F. BAGGI, M. TANNER, J. ZINSSTAG. 2006. Species identification of non-tuberculous mycobacteria from humans and cattle of Chad. *SAT. (Schweizer Archiv für Tierheilkunde)*, Mai 2006, 148 (5) : 251-256.

ESTHER SHELLING, COLETTE DIGUIMBAYE, MARKUS HILTY, FRANCA BAGGI, RICHARD NGANDOLO et JAKOB ZINSSTAG, 2005. Epidémiologie moléculaire des premiers isolements de mycobactéries chez l'animal au Tchad. *Epidémiol. et santé anim.* 48 : 81-01.

S. Guemgo, M. Hilty, S. Nguélé Silé, B. Müller, L. Didi, R. Ngandolo, Esther Shelling, C. Diguimbaye, D. Doumagoum and J. Zinsstag. **Infant tuberculosis in N'Djamena, Chad.** *IJTLD* (sous presse).

PRÉSENTATIONS

Du 14 au 18 septembre 2009: Formation en Assurances Qualité dans les Laboratoires de Diagnostics Vétérinaires organisée à Douala (Cameroun) par le Réseau des Laboratoires Vétérinaires Nationaux d'Afrique du Centre et de l'Ouest (RESOLAB). Thème: État d'avancement de la mise en place du Système Qualité au Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha: cas de l'unité de diagnostic des mycobactéries.

Du 26 au 27 novembre 2009: Conférence annuel de la Société Suisse de Médecine Tropicale et de Parasitologie, Bâle (Suisse) sur les Diagnostics: des tests rapides aux diagnostics moléculaires. Thème: Diagnostic de la tuberculose bovine chez le bétail au Tchad.

Du 28 au 29 Octobre 2010: Conférence annuel de la Société Suisse de Médecine Tropicale et de Parasitologie, Spiez (Suisse) sur les maladies vectorielles en Suisse. Thème: Diagnostic et épidémiologie moléculaire de la tuberculose bovine au Tchad.

MEMOIRES:

1999: Détermination des paramètres sanguins chez le zébu (*Bos indicus*) centrafricain et incidence des saisons (Maîtrise en biologie animale).

2005: Contribution à l'étude des Myxosporidies et Myxosporidioses des poissons du lac Tchad. DEA en Biologie animale.

AUTRES DOCUMENTS:

Prix de recherches: **Swiss Transdisciplinarity Award 2004**. For the outstanding research project. Health of nomadic people and their animals: a challenge for the "One Medecine".

10.2. Protocole de L'Étude



FP-Tuberculosis Study in Chad

Animals:

1 000 zebu cattle at N'Djamena slaughterhouse.

Aim: to have blood and tissue samples from as many TB-positives as possible.

Plan:

- Time: animals at a high TB-prevalence slaughterhouse

Begin of sampling: June 2005

End of sampling: August 2005

- Selection of animals:

Mbororo cattle

All Arab cattle with clinical symptoms

Procedure:

1. Animal identification:

Fix ear tag

Store sample container (containing piece of skin)

2. Serum collection: Total amount of >10 ml of serum per animal:

- Take 20 ml of whole blood

- Allow coagulation of the sample for 1h

- Centrifuge the blood sample at 2 000 g for 10 min

- Pipett the supernatant (serum) into a plastic tube (10 ml)

- Store the sample at - 20 °C

3. Clinical examination:

- Body condition:

score 1: good

score 2: bad

score 3: very bad

- Prescapular lymph node: left / right: normal

+ enlarged

++ enlarged

- Inguinal lymph node: left / right:

normal

+ enlarged

++ enlarged

- Documentation (Protocol - clinical examination)

4. Comparative skin test:

- Shave skin areas from neck or shoulder

- Inject intradermally :

0.1 ml of bovine tuberculin (= 5 000 IU)

0.2 ml of avian tuberculin (= 5 000 IU)

distance between 2 injection sites at least 15 cm!

- Measurement of skin thickness after injection.

- Remeasurement of skin thickness after 72h.

- Examination of clinical symptoms:

Prescapular lymph node: left / right: normal

+ enlarged

++ enlarged

Inguinal lymph node: left / right:

normal

+ enlarged

++ enlarged

Exudation or edema:

at bovine tuberculin injection site

at avian tuberculin injection site

- Documentation (Protocol - tuberculin test)



FP-Tuberculosis Study in Chad

5. Interpretation of comparative skin test:

- **Positive:**

Increase in thickness at the bovine injection site more than 4 mm greater than at avian injection site.

And / or: clinical symptoms occur.

- **Inconclusive:**

Increase in thickness at the bovine injection site is from 1-4 mm greater than at avian injection site

- **Negative:**

Increase in thickness at the bovine injection site is less or equal than at avian injection site

6. Meat inspection:

- Look for gross visible lesions (granulomatous lesions) in lymph nodes

- Look for gross visible lesions (granulomatous lesions) in other organs

- Documentation (Protocol - meat inspection)

7. Culture:

- Take samples for culture of all organs with lesions

8. Histopathology:

- Take small pieces of tissues with lesions (< 1 cm thick) and fix in formalin.

- (Paraffin embedding if possible).

9. Fluorescence polarization assay:

- According to protocol -FPA.

- Documentation: raw data in excel files
original data downloaded from Sentry 100

10. Documentation (access database):

- Animal numbers

- Clinical examination

- Results of comparative skin test

- Results of FP-test

- Findings at meat inspection

- Culture results

11. Reports:

- Progress report: 30.09.2005

- Final report: 15.12.2005

12. Shipment to Switzerland:

Material: - Sera
- Organs for histopathology fixed in formalin (or: paraffin blocks)
- DNA samples from cultures
- Ear tag sample containers

Important: Formalin samples must be shipped separately from all other samples (as formalin gas damages serum samples, DNA and cultures!!!!)

Times of shipment: - Mid July 2005
- End of August 2005

10.6. Middlebrook 7H9 Medium Preparation

Introduction

In 1947 Dubos and Middlebrook formulated a medium (7H9) containing albumin and oleic acid, which enhanced the growth of tubercle bacilli, and protected the organisms against a variety of toxic agent (1). Nowadays, Middlebrook 7H9 Broth is used for the isolation, cultivation and maintenance of Mycobacterium species. In certain laboratories in Africa (LRVZ de Farcha, Chad), the addition of glycerol and pyruvate in Middlebrook 7H9 Broth enhances respectively the growth of *M. tuberculosis* and *M. bovis* (2). The addition of Sodium pyruvate, Bovine Albumin Fraction V and Glucose is a modification used by the Tuberculosis section at Weybridge (UK) which should improve better the Quality of this medium (3).

7H9 liquid medium is used almost daily in the mycobacteriology laboratory for subculturing stock strains, picking single colonies, and preparing inoculum for drug susceptibility tests and other in vitro tests (4).

Safety

Switch off workroom UV light before all proceeding. Take care that the workroom fumigation is ended before proceeding. The workroom door must be kept closed when handling and the alarm system ready to be started in case of fire. Proper protective gowns, gloves and respiratory masks while handling chemical products must be worn. Take care of burning by high temperature. Preparation of media and solution must be performed in a suitable biological safety cabinet level 2. It is obviously important to use plastic bottles or flasks whenever possible to prevent accidental breakage. This SOP involves two different levels: 7H9 media preparation (Preparation media room (*Cat 2 lab*)) and Quality Control of the prepared media (Cultivation room (*Cat 3 lab*)).

Materials

Equipments

BSC II in the cat 2 lab:

Fridges: 2 – 8°C,
Autoclave,
Temperature indicator tape (Integrate Steam),
Incubator,
Electronic balance,
pH – meter,
Timer,
Magnetic mixers,

Stir bars,
Filter (0.2 μm),
Culture sterile tube (Pyrex),
Sterile lids of culture tubes,
Pipette man,
Pipette (25ml),
Racks,
Iron basket,
Aluminium foil,
Duran glass flask (1000ml),
Towel sheet,
Labelle,
Pieces of cleaner paper sheet impregnated with 70% alcohol.

BSC I in the cat 3 lab:

Fridges: 2 – 8°C,
Freezer: - 70 °C,
Incubator,
Vortex,
Pipette man,
Pipette (1ml),
Racks,
Towel sheet,
Plythene bag,
Labelle (or marker),
Pen,
Pieces of cleaner paper sheet impregnated with 70% alcohol,
Cup containing chloride solution.

Chemical

Middlebrook 7H9 Broth base,
Tween 80 (if requested) }
Glucose } Or glycerol (2ml).
Sterile distilled water.

Documents

Batch production record.

Micro-organism

M. bovis

M. tuberculosis

Procedure

Middlebrook 7H9 Base preparation (1000ml):

- With an electric balance, weight 4.7g of Middlebrook 7H9 Broth Base.
- With an electric balance, weight 4.0g of Sodium Pyruvate.
- With an electric balance, weight 2.0g of Glucose.
- Check the water pH: 7 ± 0.1 .
- Put all those above reagents into a Duran glass flask (1000 ml) initially containing a stir bar and dissolve with 1000ml of sterile distilled water.
- If requested, add 0.5ml of Tween 80.
- Mix well until the reagents are completely dissolved with a magnetic mixer.
Check the pH: 7 ± 0.2 .

Distribution of the medium:

NB: Distribution of the medium requests two handlers: the first handler will distribute media in culture tubes and the second one will screw the culture tubes lids immediately and range them into the iron basket.

- Range empty sterile culture tubes on racks.
- With a pipetteman and a sterile pipette (25ml) take 25ml of the liquid medium and distribute 5ml in each culture tube at once.
- Screw the tubes lid after putting the medium into the tube.
- Range tubes containing medium into an iron basket.
- Cover the iron basket with sufficient piece of aluminum foil.

- Write the temperature and the time of sterilization on aluminum foil.
- Cut a piece of a temperature indicator tape and paste on the aluminum foil.

Sterilization

- Put the iron basket containing the whole media into the autoclave and then sterilize at 121 °C for a maximum time of 15mn.

Quality Control

Quality Control Method

Whenever a new batch of media is produced, a set of control must be set up following the safety way written in "Decontamination and Digestion SOP" in a room intended to such handling. For this purpose, the whole media produced must be incubated first at 37°C for 48 hours (Check for contamination) and then set aside 6 tubes into 2 rows in a universal rack (appropriate to the size of tube) (3). Label the first tubes in each row with the medium lot number (assigned by the media room). Store the remainder media at 2- 8° C until use.

- Record all the required information on the TB diagnosis media batch control record sheet.
- Divide the work area under the cabinet into two parts: one for the sterile media and one for handling the control strains and to harvest the contaminated materials.
- Place the rack of media to be sown into the bio safety cabinet level 3 along with a sheet, sheets impregnated with 70% ethylic alcohol, a polythene bag and enough sterile pipettes (1ml) to dilute the inoculate.
- Take ready for use controls (*M. bovis* and *M. tuberculosis*) maintained at -70° C. Allow them to thaw inside the bio safety cabinet in case of leakage.
- The two organisms (*M. bovis* and *M. tuberculosis*) will be diluted each at 3 different concentrations (from 10^{-1} to 10^{-3}) in 3 controls tubes containing the liquid medium for each organism following the two rows. Each set of 3 tubes must be labelled **B** and **T** respectively related to **Bovis** and **Tuberculosis** following the two rows. Also label the dilutions 10^{-1} to 10^{-3} for each tube in each row.
- Using an pipetteman system and a sterile pipette (1ml), transfer 0.3ml of the stock standard suspension of organism into the relevant 10^{-1} labelled tube of the set tube corresponding to each organism (*M. bovis* vs *M. tuberculosis*).
- Discard the latter pipette into the polythene bag and then take other pipette for taking the first dilution (10^{-1}).
- Using a vortex, mix well the first dilution.
- Transfer 0.3ml from one tube to the next along the series of tubes, remembering to vortex mix the tube and use a new pipette between each transfer step. Discard the pipette into a cup containing chloride solution (This gives a series of decimal dilutions to cover the range 10^{-1} to 10^{-3}).

- label the rack "Bio typing controls sown and the current date then put the rack of sown media (dilutions) into an incubator at 37° C.
- Spray the paper towel on the work area with 70% ethylic alcohol and switch off the bio safety cabinet, then switch on the UV light for 15 minutes.

Quality Control Expected Result

- *M. tuberculosis* turbidity positive and ZN positive for Acid Fast Bacilli (AFB) without contamination: after two weeks.
 - *M. bovis* turbidity positive and ZN positive (AFB) without contamination: after two weeks.
- If the above criteria are not met, repeat the test. If Quality Control does not give satisfactory results, check the viability of the culture if stored frozen and other procedures.

Results

- pH: 7±0.2.
- Clear pale yellow liquid.

References

Dubos, R.J. and G. Middlebrook. 1947. *Am. Rev. Tuberc.* ; 56: 334 – 345.

D Kriwan (2007). SOP: LJ (Lowenstein Jensen) Medium. Tuberculosis Section, Bacteriology Department, Veterinary Laboratory Agency.

D. Kirwan (BPU 0379). SOP: 7H9 Broth Method. Tuberculosis Section, Bacteriology Department, Veterinary Laboratory Agency.

Public Health mycobacteriology: A guide for the level III Laboratory. 1985. U.S. Department of Health and Human Services / Public Health Service / Centers for Disease Control.

10.7. Making Digestion and Decontamination Solutions (NaOH-NALC & Phosphat Buffer)

Introduction

Purpose / Scope of this SOP

The majority of the specimens caught as tuberculosis lesions during the post mortem examination at slaughterhouse or came from hospitals and sent to be confirmed to the mycobacteriology laboratory by cultivation on specific media are generally contaminated by the rapidly growing normal flora. To maximize the yield of the mycobacteria cultivation, the contaminated specimens must be treated by digestion and decontamination procedure. The N-acetyl-L-cysteine Sodium hydroxide (NALC-NaOH) is recommended as gentle solution but also is an effective digesting and decontaminating agent. The N-acetyl-L-cysteine (NALC) is also a mucolytic agent. Sodium citrate is included in the reagent to bind heavy metal ions that may be present in the specimen and which can inactivate NALC. The phosphate buffer allows washing the digested-decontaminated specimen and decreases the activity of the NALC-NaOH solution then lowers the specific gravity of the specimen before the mycobacteria are recovered by centrifugation.

Safety

The NALC-NaOH reagent contains strong alkali and causes severe burns. Take off all contaminated clothing immediately. Gloves and eye/face protection must be worn. NaOH is irritating to eyes and skin. In the event of eye or skin contact, rinse immediately with an eye wash system or tap water for at least 15 minutes and seek LRVZ de Farcha medical advice at this following phone number: **252 76 00**. If ingested, give milk, egg white or a large amount of water and seek medical advice at the above phone number: Keep out of reach of children.

Materials

Equipments

NALC-NaOH solution

A weighing machine,

Two flasks glass (1000 ml),

A flask glass (250 ml),

A test tube (500 ml),

Nalgene CRYOWARE (Cryogenic vials),

10 ml sterile Vacutanair system tube,

Membrane filter (0.45µm),

Sterile syringe (1ml),

Autoclave.

Phosphate buffer (pH 6.8):

A weighing machine,

pH test strip,

Two flasks glass (1000 ml),

A flasks glass (500 ml),

A test tube (500 ml),

Autoclave.

Chemical:

NALC-NaOH:

- Sodium hydroxide (NaOH) powder,
- Sodium citrate powder,
- N-acetylcysteine (NALC) powder,
- Sterile distilled water.

Phosphate buffer (pH 6.8):

- Dissodium phosphate hydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$) powder,
- Monopotassium Phosphate (KH_2PO_4) powder,
- Sterile distilled water.

Making Solution

NALC-NaOH:

Solution 1: (NaOH 4%):

- Test the distilled water pH.
- Using the weighing machine, weight 40g of NaOH powder.
- Using the test tube measure 1000ml of sterile distilled water and decant it into the flask glass (1000 ml).
- Dissolve 40g of NaOH powder in 1000ml of sterile distilled water contained into the flask glass (1000ml).
- Let the solution at the room temperature to be completely dissolved then store it at +4°C.

Solution 2: Sodium citrate (2.9%):

- Test the distilled Water pH.
- Using the weighing machine, weight 29 g of sodium citrate powder.
- Using the test tube measure 1000 ml of sterile distilled water and decant it into the flask glass (1000 ml).
- Dissolve 29 g of sodium citrate powder in 1000 ml of sterile distilled water contained into the flask glass (1000 ml).
- Let the solution at the room temperature to be completely dissolved then store it at +4°C.

Solution 3: Solution 1 + Solution 2:

On the day before the digestion and decontamination procedure, mix at equal volume (50ml vs 50ml) the two solutions (1 and 2), then sterilise at 121 °C in the autoclave for 30 minutes (After sterilisation, let the solutions into the autoclave until the morning).

Work solution:

The work solution must be prepared on the day of the Digestion and Decontamination procedure under the BSL 2. Dissolve 0.5g of NALC into 100ml of **solution 3** to obtain the concentration of 5% as follow:

- With a single use sterile syringe, take 5 ml of NaOH-citrate solution (Solution 3).
- Inject the NaOH-citrate solution into a 10ml sterile Vacutanair system tube and add 0.5g of NALC powder, close with the lid and mix with vortex mixer until total dissolution, then close again the syringe needle.
- With the same syringe, take out the NaOH-citrate NALC solution.
- Close the syringe needle and remove it without touching the syringe way out part.
- Remove a disposable filter from its bag and dispose it carefully to the way out of the syringe containing NaOH-citrate NALC solution.
- Filter carefully through the filter membrane the NaOH-citrate NALC solution containing in the syringe into the rest of NaOH-citrate solution.
- Mix the solution slowly by hand (The NaOH-citrate NALC solution is ready to use and it is not active after 24 hours).

Phosphate buffer (pH 6.8):

Solution 1:

- Using the weighting machine, weight 11.92g of hydrated disodium Phosphate powder ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$).
- Using a test tube measure 1000ml of sterile distillate water and decant it into the flask glass (1000ml).
- Dissolve 11.92g of hydrate disodium phosphate powder with 1000ml sterile distillate water contained into the flask glass.
- Let the solution at the room temperature to be completely dissolved then store it at +4 °C.

Solution 2:

- With the weighting machine, weight 9.07g of Monopotassium Phosphate (KH_2PO_4).
- With a test tube measure 1000ml of sterile distillate water and decant it into the flask glass (1000ml).
- Dissolve 9.07g of Monopotassium Phosphate (KH_2PO_4) with 1000ml sterile distillate water contained into the flask glass.
- Let the solution at the room temperature to be completely dissolved then store it at +4 °C.

Work solution:

On the day before the digestion and decontamination procedure, mix at equal volume (200ml vs 200ml) the two solutions (1 and 2), check the pH with pH test strip then sterilise at 121 °C in the autoclave for 30 minutes (After sterilisation, let the solutions into the autoclave until the morning).

10.9. Homogenisation of Tissues

Introduction

Purpose / Scope of this SOP

Samples taken from animal carcasses suspected as tuberculosis lesions at slaughterhouse (or tissues taken from animals giving a positive reaction to a tuberculin test) and sent to the mycobacteriology laboratory to be confirmed must be first homogenised in a sterile distillate water before decontamination and seeding procedures.

The principle of homogenisation

Animal specimens taken from tissues are usually tough and must be grinded and homogenised with sterile distillate water. Tissues are prior cut into small pieces which can be handled in the STOMACHER bags when the STOMACHER 80 machine is running for grinding. After grinding the liquid suspension obtained is ready for decontamination and seeding procedure.

Safety

Refer to the standard Safety of Decontamination procedure.

Handling must be done in a BSL 2 and equipments must be sterile. Do not handle more than 5 specimens at once (The BSL 2 is 180 cm length). The STOMACHER 80 machine must be prior placed in a special plate. If the STOMACHER plastic is damaged when the machine is running, stop the machine and move out the bags containing specimen, then replace it immediately in a new bag. In such a case, disinfect immediately the machine and the plate prior to continue with the grinding procedure.

Materials

- Special plastic shoes,
- Blue overall,
- Special plastic overall,
- Gloves,
- Respirator mask,
- Protective glasses for eyes,
- Special papers (absorbent),
- STOMACHER 80 machine,
- Two plates (one for the STOMACHER 80 machine and one for the tissues dissection),
- Petri dishes (glass) for each specimen,
- Two STOMACHER PLASTICS (the small one and the big one) for each specimen,
- Sterile pipette (10ml) for each specimen,

Durand bottle close with dispenser and containing sterile distillate water,
Small plate for forceps and scissors,
Sterile forceps for each specimen,
Sterile scissors for each specimen,
Bistoury with blade for each specimen,
Bunsen burner,
Plastic box containing chloride solution (Petri box disinfection),
Plastic recipient containing about 0.5 litre of chloride solution (Used pipettes disinfection),
Plastic bag for rubbishes,
Iron recipient containing pieces of towel sheet impregnate with 70% alcohol,
Falcon tube for each specimen,
Sterile Flask for the rest of the liquid suspension,
Falcon tube support (iron),
Falcon tube support (polystyrene),
Pieces of absorbent paper for each specimen.

Chemical

- 70% alcohol,
- Chloride (1° chlorometric),
- Sterile distilled water.

Procedure

Preparation 1 (In the Changing room):

- Wear the special plastic shoes,
- Wear the blue overall,
- Wear gloves,
- Wear respirator mask,
- Wear protective glasses for eyes.

Preparation 2 (In the laboratory BSL 2):

- Move out specimen to grind from the fridge and place it at room temperature.
- Install on the work area under the BSL 2, two Special papers (absorbent).
- Install the plate destined as STOMACHER 80 support one the middle part of the work area under the BSL 2,
- Install the STOMACHER 80 in this plate.
- On the left of the STOMACHER 80, install the plate in which the dissection must be done.

- Install just behind this last plate:
 - Sterile Petri dish (glass) protected with aluminium sheet (for 5 specimens take at least 10 sterile Petri box).
 - STOMACHER plastics.
 - Pipettes (10ml) (for 5 specimens take at least 10 pipettes (10ml)).
 - The small plate for forceps and scissors.
 - A plastic recipient containing about 0.5 litre of chloride solution.
 - Plastic bag for rubbishes.
 - Iron recipient containing pieces of paper impregnate with 70% alcohol.
 - The 70% alcohol flask.
- Labelle both falcon tube and sterile flask destined for the rest of the liquid suspension with the specimen identification number then install the falcon tube on a support prior disinfected with 70% alcohol (install the flask containing the rest of the liquid suspension in a small plate destined for such specimens).
- Write data concerning the specimen on a rapport sheet named "Homogenisation" (respecting the grinding order when more than one specimen is handled).
- Install specimen destined to be grinded on the iron support prior disinfected with 70% alcohol.

Dissection and Grinding:

- With a sterile forceps, move out the piece of the tissue from the sampling flask, and set it into the Petri dish (glass) installed in the plate destined to the dissection.
- With the same forceps, immobilize the piece of the tissue and remove all impurity then, with the sterile scissors (or sterile bistoury blade) cut into small pieces.
- With the same forceps, take one by one small pieces of tissue and put them into the small STOMACHER plastic bag.
- Immerge immediately the Petri dish used in chloride solution contained in the plastic recipient.
- Disinfect the forceps and the scissors with 70% alcohol then using the flame from the Bunsen burner, burn them sufficiently before install them in a plate destined to the used materials.
- With a piece of paper impregnate with 70% alcohol, clean the dispenser way out then throw the used piece of paper in the plastic bag for rubbishes.
- Add carefully sterile distillate water into the small STOMACHER bag containing small pieces of tissues (the quantity of the sterile distillate water must be proportional to the small pieces of the tissues, do not go beyond the half of the bag).

- Put the small STOMACHER bag into the biggest one then install the whole into the STOMACHER 80 machine so that the STOMACHER bags way out must be close with the STOMACHER 80 machine closing.

- Close the STOMACHER 80 machine closing.

Programme the grinding for 120 seconds, then start the machine by pressing on the bud mentioned "**120s**".

- After 120 seconds grinding, remove carefully the STOMACHER bags containing the liquid suspension then check it whether they are not damaged and stand it up avoiding to pour the suspension liquid in the dissection plate (in the case that the bags are damaged, put the whole in two other big STOMACHER bags then grind again).

- With a pipette (10ml) remove about 10ml of the liquid suspension and decant into the 50ml falcon tube then close the lid before installing it on the polystyrene support.

- With a pipette (25ml), decant the rest of the liquid suspension into the corresponding flask of the reserve.

- Roll up carefully the use STOMACHER bags and the used piece of paper installed in the dissection plate then throw them into the plastic bag destined to rubbishes.

- Disinfect the STOMACHER 80 machine and the dissection plate with 70% ethylic alcohol before processing the next specimen.

NB: If more than 5 specimens were processed, respect those following instructions:

- Store the first five liquid suspensions at – 20°C,

- Let the BSL 2 running for 5 minute before stopping it.

- Disinfect the STOMACHER 80 machine and the dissection plate with 70% ethylic alcohol and let them under the BSL 2 while lighted the UV lamp for 15 minutes.

- Stop the UV lamp and after 15 minutes process a new series of specimens.

- Do not process more than 15 specimens a day.

- After processing the required number of specimens (or less than this number), fumigate immediately the work room.

Results

Homogeneous liquid without pieces of tissue.

References

1- J. Gunn (2006). SOP, BA: 385TB diagnosis – Processing of tissues not submitted in transport medium. Tuberculosis Section, Bacteriology Department, Veterinary Laboratory Agency, Weybridge UK.

10.10. Decontamination

Introduction

Purpose of this SOP

This SOP describes the preparation and decontamination procedures of samples taken from animals (liquid suspension obtained from grinded tissues) or from humans (sputum) and that is suspected to be infected by *M. tuberculosis* complex members. Subsequently the samples are cultivated in liquid medium (Middlebrook 7H9) and on the solid one (Lowenstein-Jensen (LJ)) to identify Acid Fast Bacilli (AFB). Beyond the handling of liquid suspension obtained by grinding tissues and sputum specimen, modifications were done concerning digestion and decontamination procedure of other samples such as: pus and other mucopurulent specimens, gastric aspirates, bronchial washings, laryngeal swabs, urine and other body fluids (see point 6).

The majority of the specimens suspected as tuberculosis lesions during the post mortem examination at slaughterhouse or come from hospitals and sent to the mycobacteriology laboratory for confirmation of tuberculosis infection by cultivation on specific media are generally contaminated by the rapidly growing normal flora. To maximize the yield of the mycobacteria cultivation, the contaminated specimens must be treated by digestion and decontamination procedures. The mixture of N-acetyl-L-cysteine and Sodium hydroxide (NALC-NaOH) is recommended as a gentle solution that still is an effective digesting and decontaminating agent.

This SOP also includes two other methods according to the standard of Centers for Disease Control (CDC) (2):

- the first consists of making the direct smear (smear 1),

- the second method consists of making the second smear (smear 2).

This SOP describes the method of decontamination of one sample. However, it is possible to handle up to six samples at once (The Bio safety Cabin is 180 cm length).

Principle of decontamination:

Sodium hydroxide (NaOH) can function both as digestant and decontaminant. As a mucolytic agent, it is more effective at final concentration of 2%. However, as a decontaminant agent, this concentration is toxic to both contaminants and some mycobacteria.

The N-acetyl-L-cysteine (NALC) is also a mucolytic agent. In this SOP, the NALC used is diluted in 2% NaOH. When the reagent is diluted with an equal volume of specimen, it provides an effective digestion and decontamination with a final concentration of 1% NaOH, which is less toxic to mycobacteria (1).

Safety

It is up to each laboratory to take responsibility for their staff and facility regarding biological safety when working with mycobacteria. Recommendations on how to organise a laboratory and train staff are given elsewhere e.g. by World Health Organisation (WHO) and other organisations. These recommendations should be read and understood. Any person that is working with mycobacteria pathogens needs to be trained to a satisfying level. Section 2 of this booklet lists several recommendations on safety aspects that have to be considered, but additional source of information is essential.

All procedures, such as processing specimens, smear preparation, inoculum preparation, making dilutions, inoculation of media, and sub culturing must be performed in a suitable biological safety cabinet. The CDC has recommends a Biosafety Level (BSL) 2 laboratory with negative air pressure and with an appropriate ventilation system for working environment. More recently, the CDC has recommended that work involving manipulation of TB culture to be done in BSL 3 laboratory. However, this work may be done in BSL 2 laboratory, the access to the room is restricted when work is in progress, and the practices and the recommended equipment for BSL 3 are followed. This includes use of proper protective gowns, gloves and respiratory masks while handling specimens and mycobacterial cultures.

This SOP is used for a BSL 2 laboratory. All the materials used for the digestion and decontamination procedure must be decontaminated and eliminated according to the procedures used in the laboratory for decontamination and elimination of potentially infected materials.

Materials

Documentation and software

All samples are recorded on spreadsheet named "Decontamination Rapport Sheet" even the microscopic results and the data acquisition realised with the assistance of ACCESS software.

Other SOPs referred in this SOP:

Stomacher method

Preparation of NaOH-NALC-sodium citrate solution and the phosphate buffer solution (pH 6.8).

Chemical:

The NaOH-NALC-sodium citrate solution and the phosphate buffer solution (pH 6.8) are prepared the day before use (and let cool to the room temperature overnight).

NaOH-NALC-sodium citrate.....	10ml
Phosphate buffer (pH 6.8).....	30ml
Chocolate medium.....	1 plate
Chloride solution.....	1 ° chlorometric

Alcohol.....	70%
Sterile distillate water (sterilised the day before decontamination).....	5ml

Specimen to decontaminate

Suspension obtained by grinding tissues (or sputum).....	10ml
First control (sterile distillate water).....	10ml
Last control (sterile distillate water).....	10ml.

Equipments

- BSC I or II in BSL 3 laboratory,
- Centrifuge (3500 x g/minute).
- Vortex,
- Falcon tube (50ml),
- A sterile Vacutanair system tube (10 ml),
- Pipetman for pipettes,
- Sterile pipette (1, 10, 25ml),
- Nalgene CRYOWARE (Cryogenic vials),
- Sterile syringe (10 – 20ml),
- Disposable filter (0.45µm),
- Slides,
- Sterile laboratory film,
- Pieces of cleaner paper sheet impregnated with 70% alcohol,
- Diamond pencil (or indelible pencil),
- Gloves,
- Respirator mask,
- Incubator,
- Timer.

Procedure

Method

- Remove the Phosphate buffer solution (pH 6.8) from the autoclave and put it at room temperature while waiting its use.
- Remove the NaOH citrate solution and put it at room temperature while waiting its use.
- Light the UV lamp in the BSC II until 15 minutes before manipulation.
- Stop the UV light and start the BSC II and let running until 15 minutes.
- Clean the work area under the BSC II with 70% ethylic alcohol and let the disinfectant reacts until 5 minutes.
- Place on the work area under the BSC II, at least two sterile sheets to receive all substances that will drop on the work area.
- Divide the work area into two parts: one for the sterile solutions (NaOH-citrate, and Phosphate buffer) and other for handling specimens (specimens and contaminated material).
- Record all the following information on the "Decontamination Rapport Sheet": the decontamination date, the handler's name, the serial number of NaOH - citrate and Phosphate buffer stock, and the identification number of each specimen.
- Write with diamond pencil (or indelible pen) the number of each specimen on the slides for making smears (1 and 2).
- Open the box containing chocolate medium under the BSL 2, then let it opened for BSL 2 environment control until the end of the manipulation.
- Decontaminate the lid of the falcon tube with 70% ethylic alcohol before put it under the BSL 2 or opening (even the lid bottles contains different solutions).

NaOH-citrate NALC solution preparation:

- With a single use sterile syringe, take 5 ml of NaOH-citrate solution,
- Inject the NaOH-citrate solution into a 10ml sterile Vacutanair system tube and add 0.5g of NALC powder, close the tube with the lid and mix with vortex mixer until total dissolution, then close again the syringe needle.
- With the same syringe, take out the NaOH-citrate NALC solution.
- Close the syringe needle and remove it without touching the syringe way out part.
- Remove a disposable filter from its bag and dispose it carefully to the way out of the syringe containing NaOH-citrate NALC solution.
- Filter carefully through the filter membrane the NaOH-citrate NALC solution containing in the syringe into the rest of NaOH-citrate solution.
- Mix the solution slowly by hand (The NaOH-citrate NALC solution is ready to use and it is not active after 24 hours).
- Take 0.1ml of the specimen and make the smear 1.

- Prepare specimen to be decontaminated: if small quantity (less than 10ml) specimen was taken, adjust this volume until 10ml with sterile distillate water then mix with vortex mixer (If more than 10ml was taken, concentrate the specimen by centrifugation, remove the supernatant fluid then add sterile distillate water up to 10ml).
 - Add 10ml of NaOH-citrate NALC solution into the falcon tube containing the suspension obtained by grinding tissues (or sputum) and vortex (30 to 60 seconds) and then let to react until 15 to 20 minutes under the BSL 2 (the specimen volume must be equal to the NaOH-citrate NALC volume).
- (It is not authorised to move out from the laboratory except in the case of alarm signal).
- After 15 to 20 minutes of reaction, move the phosphate buffer (pH 6.8) to BSL 2.
 - Add to the mixture (specimen + NaOH-citrate NALC) 30ml of phosphate buffer (pH 6.8) shake slowly by hand (lid opposed to the lower part and so on).
 - Proceed the washing by centrifuging (3500g x / 15 minutes).
 - Carefully remove the decontaminated specimen from de centrifuge avoiding to remove the sediment from the falcon tube surface then lay it inclined on a special iron support (sediment at the lower part).
 - Let it rest until 5 minutes to allow aerosols to come down.
- Open carefully the lid of the falcon tube then slowly pour the supernatant fluid into the plastic recipient containing the chloride solution (avoid to release the sediment from the falcon tube surface).
 - With 10ml pipette, add 2ml of sterile distillate water to the sediment then mix with vortex mixer and put the tube on the special slide rack.
 - Take 0.5ml of the decontaminated specimen and put it into the Nalgene CRYOWARE (Cryogenic vials) then store at -20°C for next use and then put the remainder at -4°C waiting sowing step.
 - Close the box containing the chocolate medium (BSL 2 control) and with a small piece of sterile laboratory film seal it again.
 - Remove the remaining of NaOH-citrate NALC solution and buffer solution from the BSC II then throw them away,
 - Let the smears to dry in the BSC II (Do not light the UV when the smear is drying) (2).
After smears drying, remove them from the BSL 2 and light the UV until 15 minutes.

Other specimens

Pus and other mucopurulent specimens

If the specimen is thick or mucoid and less than 10ml in volume, digest and decontaminate with NaOH-NALC method similar to the procedure used for suspension obtained by grinding tissues and sputum specimens. If the specimen is not thick, it may be treated with 2-4% NaOH. The concentration of NaOH depends upon the contaminating bacteria expected to be present in the specimen. If the volume is over 10-20 ml, process only 10ml or first concentrate by centrifugation

at 3000xg for 15-20 minutes. In such a situation, if the specimen is thick, liquefy the specimen by adding a small quantity of NALC only (5-100mg powder) and mix well. After the concentration step, resuspend the sediment in 5ml distillate sterile water, decontaminate with NaOH and concentrate again by centrifugation. Always resuspend the sediment (pellet) in buffer to reduce the pH.

Gastric aspirate

Concentrate by centrifugation before decontaminate. Resuspend the sediment in about 5ml of distillate sterile water and decontaminate with NaOH-NALC or 2-4% NaOH as recommended for suspension obtained by grinding tissues and sputum specimens. After decontamination, concentrate again prior to inoculation of sediment in culture media. Due to the low pH, gastric aspirates should be processed as soon as possible (within 4 hours collection). If the specimen cannot be processed quickly, it should be neutralized with NaOH before transportation or storage.

Bronchial washings

All other pulmonary specimens, such as bronchial washings (BAL) may be treated as suspension obtained by grinding tissues and sputum specimens. If the specimen is up 10ml in volume, process the whole specimen. For larger volumes, concentrate the specimen by centrifugation (3000x g, 15-20 minutes). If the specimen is thick or mycoid, liquefy by adding a small quantity of NALC powder (50-100mg). After centrifugation, resuspend the sediment in 5ml sterile distillate water and decontaminate like the liquid suspension obtained by grinding tissues and sputum specimens.

Laryngeal swabs

Transfer the swab into a sterile centrifuge tube and add 2ml sterile distillate water. If necessary, break of the swab stick so the cap of the centrifuge tube can be placed on it and tightened. Add 2 ml of NaOH-NALC solution replace the cap and mix well in vortex mixer. Let stand for 15 minutes. Remove the swab by forceps, squeezing the liquid out of the swab and discarding it. Fill the tube with phosphate buffer. Mix and centrifuge at about 3000x to 3500g for 15 – 20 minutes. Discard the supernatant fluid and resuspend the sediment in 1-2ml sterile buffer. Use this suspension for smear and culture.

Urine

Isolation of mycobacteria from urine specimens has not been validated due to a very small number of urine specimens (2). Some investigators have successfully used BACTEC 460 TB and MGIT medium for isolation of mycobacteria from urine (3, 4). As a routine isolation method, a totally voided, early morning urine specimen is used for mycobacterial culture. Pooled or mid-stream urine specimens are not recommended. The specimen is concentrated by centrifugation using several 50ml centrifuge tubes (with screw caps) for at least 20-25 minutes. Resuspend the sediment in each tube with 1 – 2ml sterile distillate water and then pool together (total volume 5 – 10ml). Decontaminate the concentrated specimens with 4% NaOH for 15 – 20 minutes. After

decontamination, proceed in a manner similar to the suspension obtained by grinding tissues and sputum specimens.

Other body fluids

Body fluids, such as synovial fluid and pleural fluid are collected aseptically and thus can be inoculated into liquid medium without decontamination (with addition of PANTA). However, since sterility is not guaranteed, it is recommended these specimens should be lightly decontaminated. If the specimen volume is more than 10ml, concentrate by centrifugation at about 3000 – 3500x g for 15 – 20 minutes. Liquefy thick or mucoid specimens prior to centrifugation by adding NALC powder (50 – 100 mg). After centrifugation, resuspend the sediment in about 5ml of saline (0.85g of NaCl in 100ml of sterile distillate water) (5) and then decontaminate following the procedure similar to that for the suspension obtained by grinding tissues and sputum specimens. Isolation of mycobacteria from blood specimens has not been evaluated thoroughly (2). A few studies have been published or presented where blood was use with MGIT System after lyses centrifugation. BACTEC Myco / F lytic medium is recommended for isolation of mycobateria and fungi from blood samples.

References

Kent, P.T., and G.P. kibica, (1985). Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta.

Salman H. Siddiqi and sabine Rüsç-Gerdes, (2006). Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT): Culture and Drug Susceptibility Demonstration Prjoects. 0MGIT™ Procedure annual, Foundation for the Innovative New Diagnostics, July 2006.

Fadda G, Roe SL. Recovry and susceptibilty testing of Mycobacterium tuberculosis from extra pulmonary specimems by the BACTEC radiometric method. J Clin Microbiol. 1984; 19: 720-721.

Harris G, Rayner A, Blair J, et al. Comparaison of three isolation systems for the culture of mycobacteria from respiratory and non-respiratory samples. J. Clin Pathol. 2000; 53:615-618.

Isabel Narvaiz de Kantor, Sang Jae Kim, Thomas Frieden, Adalbert Laszlo, Fabio Luelmo, Pierre-Yves Normal, Hans Rieder, Pedro Valenzuela & Karin Weyer (1998). Laboratory services in tuberculosis control: Microscopy Part II. WHO/TB/98.258.

10.11. Sowing of Inocula on Solid and in Liquid Media

Introduction

To show the presence of mycobacteria, especially those belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex, decontaminated samples (or inocula) need at least to be sown on common diagnostic culture media such as Lowenstein Jensen (LJ), 7H11 Agar or 7H9 broths. Most species from gender *Mycobacterium* encountered from samples submitted for tuberculosis diagnosis can be cultured on LJ media. LJ + glycerol (LJG) enhances the growth of *M. tuberculosis* and *M. avium* and LJ + pyruvate (LJP) enhances the growth of *M. bovis*. The 7H11 medium is especially good for isolating *M. bovis* producing a classic colonial morphology. 7H9 broth is required for miscellaneous species, like *M. microti* that prefers to grow in liquid media rather than solid media.

All media used here contain antibiotics because; even though the samples are decontaminated with 1% NaOH some contaminants can still survive acid treatment.

This SOP describes how to sow the decontaminated samples onto solid media (LJG, LJP and 7H11 Agar) and how to inoculate liquid media (7H9). It also includes condition for the Quality Control of these media.

Safety

It is up to each laboratory to take responsibility for their staff and facility regarding biological safety when working with mycobacteria. Recommendations on how to organise a laboratory and train staff are given elsewhere e.g. by World Health Organisation (WHO) and other organisations. These recommendations should be read and understood. Any person that is working with mycobacteria pathogens needs to be trained to a satisfying level. Section 2 of this booklet lists several recommendations on safety aspects that have to be considered, but additional source of information is essential.

All procedures, such as processing of specimens, smear preparation, inoculum preparation, serial dilutions of isolates, sowing and inoculation of media and sub-culturing must be performed in a suitable biological safety cabinet.

The CDC has recommends a Biosafety Level (BSL) 2 laboratory with negative air pressure and with an appropriate ventilation system for working environment. More recently, the CDC has recommended that work involving manipulation of TB culture must be done in BSL 3 laboratory. However, this work may be done in BSL 2 laboratory, the access to the room is restricted when work is in progress, and the practices and the recommended equipment for BSL 3 are followed. This includes use of proper protective gowns, gloves, wellington boots and respiratory masks while handling specimens and mycobacterial cultures.

This SOP is used for a BSL 2 laboratory. All the materials used for the digestion and decontamination procedure must be decontaminated and eliminated according to the procedures used in the laboratory for decontamination and elimination of potentially infected materials.

In the case of a spillage inside the cabinet, soak a paper towel with 70% ethanol and place over the affected area for a contact period of 1 hour. Do not continue to use the cabinet and set up fumigation.

Performance

All media have a shelf life of three months at 2 - 8°C. The LJ media are kept at room temperature while in use. The 7H11 media in use are also left at room temperature, but placed in fridge at 2 - 8°C overnight. The 7H11 media must be covered or kept in dark conditions to prevent the formation of toxic substances.

Materials

Equipment

BSC I in a cat 3 lab.

Fridges: 2 – 8°C,

Freezer (-20°C and –80°C),

Incubator (37°C±4),

Autoclave,

Vortex,

Plate spreader,

Dispenser,

Pasteur pipettes (1ml),

Racks,

Paper towel,

Polythene bag,

Sterile syringe (1ml),

Para film,

Pieces of cleaner paper sheet impregnated with 70% alcohol,

Towels heets.

Chemical:

70% ethanol,
Chloride solution as disinfectant,
PANTA + OADC.

Media

Lowenstein Jensen base medium (LJ),
Lowenstein Jensen base + Pyruvate medium (LJP),
Lowenstein Jensen base + Glycerol medium (LJG),
Modified 7H11 medium (7H11),
8ml of Middlebrook 7H9 Broth,
Chocolate medium (BSC environment control).

Documents

Working at a safety Cabinet in the TB Biohazard room,
Diagnostic batch controls.

Organisms

Samples inocula,
Controls inocula,
M. bovis (AF 61/2122/97/VLA),
M. avium (NCTC 8559/VLA).

Procedure

Preparation for sowing:

- Turn on the airflow and the UV light in the BSC I at least 15 minutes before starting the work.
- Before starting your work in the cabinet, turn off the UV light and clean the working area with 70% ethanol and let the disinfectant dry out.
- Place at least two sterile towels sheet on the work area in the cabinet (this is to collect all substances that may drop on the work area).
- Divide the work area into two parts: one for the sterile media and one for handling of the decontaminated specimens.
- Label the media to be sown with the corresponding sample numbers and put them in a rack before transferring into the BSC.
- Record all the following information on the "Sowing Rapport Sheet": the sowing date, the handler's name, the serial number of different media stocks, the serial number of mixture PANTA+OADC stock and the identification number of each specimen.

- Put sufficient number of 1ml Pasteur pipettes in the BSC on the area destined to non-contaminated materials.
- Put the cup containing chloride solution on the area destined to decontaminated specimens.
- Open the Petri dish containing chocolate medium under the BSC then let it opened for BSC environment control until the end of the manipulation.
- From the fridge, take out the decontaminated specimen to be sown (at the most 12 at a time).
- Decontaminate the lid of each falcon tube containing the decontaminated specimens with 70% ethanol before put it under the BSC or when opening (even the lid bottles or tubes contains different solutions and media).

Sowing of samples on Solid media

Sowing on slope in test tube or Universal tube (LJ and 7H11):

- When sowing, avoid getting close to the other sterile media.
- Using a Pasteur pipette (1ml), mix the sediment well and take 0.3ml of the mixture sediment and then sow it successively at the rate of 0.1ml on a LJG, LJP slope and LJ.
- Immerse the used pipette in the chloride solution. Close the lid of the culture tube before closing the tube containing the remaining of the inocula.
- Using a new pipette, take 0.3ml of another decontaminated specimen and seed it successively on another set of LJ media (LJP, LJG and LJ) and so on.
- After sowing a maximum set of 12 decontaminated specimens, spray the racks with samples with 70% ethanol before removing them from the cabinet.
- Spray your outer gloves with 70% ethanol and put them in a polythene bag before leaving the BSC.
- Put a new pair of gloves on and transfer the sample rack to an incubator for incubation at 37°C.
- Switch off the BSC I for 15min, move out from the lab before sowing another set of 12 decontaminated specimens as describe above.

Sowing on Petri dish (7H11):

- When sowing, avoid getting close to the unsown media.
- As 7H11 is produced in petri dishes, using a single use Pasteur pipette (1ml) take 0.1ml of the inoculum and spread it on the over the surface of the medium.
- Once the petri dishes have been inoculated, wrap a strip of Para film, around the side of the petri dishes to secure them and prevent moisture loss.
- Spray the sealed petri dishes with 70% ethanol and range all the culture in a rack.
- After sowing a set of 12 decontaminated specimens, spray the rack of inocula with 70% ethanol before removing from the cabinet for incubation at 37°C.
- Spray gloves and put them in the polythene bag before living the BSC.

- Switch of the BSC for 15mn, move out from the lab before sowing another set of 12 decontaminated specimens as describe above.

Inoculation of samples in liquid media:

NB: Sometimes, liquid media are prepared without antibiotics. In such cases, adding PANTA + OADC antibiotics solution enhance the chance to avoid contamination.

- Remove the PANTA + OADC mixture from the fridge (if PANTA and OADC are not mixed, proceed the mixture under the BSL 2 before using).
- With 1ml syringe, take 0.5ml of the mixture PANTA+OADC solution and add to each Middlebrook 7H9 (Glycerine and Pyruvate) liquid medium then mix with vortex mixer,
- When inoculating, avoid getting close to the unsown media.
- With a pipette (1ml), take 0.5ml of the decontaminated specimen and inoculate suitable test tube or flask containing the Middlebrook 7H9 / Glycerol (or Pyruvat) liquid medium. Tightening the lid and mix with vortex mixer then unscrew lightly the lid of the tube (do not screw completely the lid).
- Spray the flasks or rack with samples with the inolculated culture with 70% ethanol.
- Spray your outer gloves with 70% ethanol and put them in a polythene bag before leaving the BSC.
- Put a new pair of gloves on and transfer the sample rack to an incubator for incubation at 37°C.
- Record references of the samples sown in the BSC on the **Sowing report**.
- Spray gloves and put them in the polythene bag before living the BSC.
- Switch off the BSC for 15min, move out from the lab before sowing another set of 12 decontaminated specimens as describe above.

When the work is finished and all cultures have been removed from the cabinet, expel air towards the back of the cabinet, from the bag of waste material, knot the top and spray the outside with 70% ethanol. Place this into a high temperature autoclave bag inside the cabinet and fold over the top, spray with 70% ethanol then directly autoclave at high temperature. Spray the inside of the cabinet with 70% ethanol and wipe round using suitable absorbent paper towelling.

Quality Control

The Quality of the Sowing procedure depend first on the sterility of the BSC during the handling but most on Quality of the media that should be used and the incubation conditions. Each day a new set of unknown samples are sown to media, three control samples (one NTM, one *M. bovis* and one *M. tuberculosis*) need to be sown as controls. That allows on the one hand to check one more time the media Quality after a period of storage and on the other hand to identify in parallel with the unknown samples, the growth period of each species listed above. For those purposes, media to be sown must come from the same batch production and the variation temperature of the incubator

must be checked twice a day (morning and after noon) during the whole incubation period. The BSC control (Chocolate media) must be checked after 72 hours and its outcome must be compared to those of unknown samples and controls.

If there is growth on the BSC control after 72 hours, assume that the BSC environment was contaminated during the sowing then all the cultures set up during this manipulation should be checked for environmental contamination. If contamination was observed from the unknown cultures, decontamination of the first decontaminated culture should be done (SOP Decontamination of contaminated cultures).

For both LJP and LJG media, read all growth temperature test media at day 7, 14 and 21 and then record growth as follow:

If the isolate grows in the rapid / slow differentiation media within 7 days and is Acid Fast Bacteria (AFB) after ZN staining, the isolate is considered a rapid grower and then record the result on **Rapid Grower Sheet** before computing (contamination from handling must be suspected) and this outcome must be compare to the NTM control.

In the other ways, if the isolate takes 7 to 21 days to grow, it is considered as slow grower and then record **Slow Grower Sheet** before computing (the standard suspension of organism is growing well) and the outcome must be compared to the *M. bovis* and *M. tuberculosis* controls.

In case of growth on the three controls, the media should be declared still in nice Quality.

For 7H11 media, record if any growth is observed or not at day 7, 14 and 21. *M. bovis* is most likely to grow on this media before any other. When the growth of *M. bovis* is observed on the *M. bovis* control, it is enough to confirm that the media remain in nice Quality.

Results

Growth of *M. bovis* or *M. tuberculosis* after 7 days without contamination.

	Growth (48 hours after (R ₁))	7H9+P	7H9+G	7H11	W1 (R ₂)	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	Results (R ₃)
Control BSC													
Control C ₁													
S1													
S2													
S3													
S4													
S5													
Control C ₂													
Observations													

R: result, W: week, BSC: Bio Safety Cabinet, C₁: first control, C₂: last control

References

E. Wood (2008). SOP LL template version 6: TB Diagnosis, Sowing of inocula and Diagnostic Media Controls. Tuberculosis Section, Bacteriology Department, Veterinary Laboratory Agency.

10.12. Harvesting Cultures for Storage and Biotyping

Introduction

Experience and studies have shown freezing the isolates for storage prolongs the viability of the organisms as well as preventing contamination (1). However, those destined for typing by molecular techniques should be heat-killed and inactivated before processing. This SOP describes the procedure for preparation of cultures (Mycobacterium complex) to be stored as reference and to be heat killed before characterisation with different molecular typing (Genus typing, Deletion typing and Spoligotyping).

Safety

All procedures, such as processing specimens, smear preparation, inoculum preparation, making dilutions, inoculation of media, and sub culturing must be performed in a suitable biological safety cabinet. The CDC has recommends a Biosafety Level (BSL) 2 laboratory with negative air pressure and with an appropriate ventilation system for working environment. More recently, the CDC has recommended that work-involving manipulation of TB culture must be done in BSL 3 laboratory. However, this work may be done in BSL 2 laboratory, the access to the room is restricted when work is in progress, and the practices and the recommended equipment for BSL 3 are followed. This includes use of proper protective gowns, gloves, wellington boots and respiratory masks while handling specimens and mycobacterial cultures. However, all handlers must be vaccinated (BCG).

Any paperwork to be removed from the laboratory must be heated in a laboratory oven at approximately 100°C for at least 30 minutes then remove directly from the laboratory either with a newly gloved hand if no further contact is likely or placed in a bag which is then sprayed with 70% ethanol. Take care of hot equipments (oven and autoclave). The ethanol must have dried before removal.

This SOP is used for a BSL 2 laboratory. All the materials used for the digestion and decontamination procedure must be decontaminated and eliminated according to the procedures used in the laboratory for decontamination and elimination of potentially infected materials.

In the case of a spillage inside the cabinet, soak a paper towel with 70% ethanol and place over the affected area for a contact period of 1 hour. Do not continue to use the cabinet and set up fumigation.

Materials

Equipments

BSC I in the cat 3 lab.

Fridge (+4°C),

Freezer(-20°C),
Freezer (-80°C),
Autoclave bag,
Hot block (mini: 80°C, max: 87°C),
Vortex mixer,
Tray,
Polythene bag,
Discard tins,
Eppendorff tubes (1.5ml screw topped),
Loops (10µl),
Sterile plastic pipette (1ml),
Towels sheet,
Paper sheets impregnated with 70% alcohol,
Labelle,
Racks,
Box,
Timer.

Chemical

70% ethanol,
Chloride solution,
Distilled water.

Media

7H9 + tween 80 (for short term storage),
20% glycerol stock (for long term storage).

Documents

Freezing down record Sheet,
Molecular Typing Submission Form,
Heat Killed isolate Record book,
Using of ovens and hot blocks,
Work sheet.

Micro-organisms

All colonies on solid media designed as AFB after Ziehl Neelsen staining.
All culture to be frozen down.

Procedure

Harvesting

Before harvesting:

- Light the UV lamp in the BSC until 15 minutes before handling.
- Stop the UV light and start the BSC and then let it running until 15 minutes.
- Clean the work area under the BSC with 70% ethanol and let the disinfectant reacts until 5 minutes.
- Place on the work area under the BSC, at least two sterile towels sheet to receive all substances that will drop on the work area.
- Divide the work area into two parts: one for the sterile media and other for handling decontaminated specimens (specimens and contaminated material).
- Put all the cultures to be harvested into numerical order and make sure you are clear about which colonies need to be harvested.
- Note the date and make a list of the culture reference numbers in freezing down file, on the freezing Down Record Sheets.
- Put sufficient number of Pasteur pipette (1ml), loops (10 μ l) and Eppendorff tubes (1.5ml screwed topped) in BSC on the area destined to non-contaminated materials.

- For each culture to be harvested, label 4 Eppendorff tubes (one destined for the distilled water (heat-killing), one destined for 7H9+tween 80 (short term storage) and two destined for 20% glycerol (long term storage)).
- Put the cup containing chloride solution on the area destined to decontaminated specimens.
- Open the Petri dish containing chocolate medium under the BSC, then let it opened for BSC environment control until the end of the manipulation.
- Move out from the incubator at most 12 cultures for harvesting.
- Decontaminate the lid of each culture tube with 70% ethanol before put it under the BSC or when opening (even the lid bottles contains different solutions).
- Dispense in each Eppendorff tube, 1ml of required solution or media.

Harvesting from solid media:

Working with one culture at a time.

- Use a separate loop for each Eppendorff tube.
- Open the lid of each Eppendorff tube containing either sterile distilled water or 7H9+tween (or 20% glycerol) and then using a sterile loop, take the concerned solution, put it on one colony, take one loopful of this growth then place into the concerned solution.
- Dissolve the growth into the liquid by gently rotating loop back and forth between finger and thumb. If the media are deficient of growth, use a pastette to transfer any breadcrumb colonies from the culture to the Eppendorff tubes. Discard used loops and pastettes into the cup containing chloride solution.
- Place each Eppendorff tube containing 7H9 + tween 80 (or 20% glycerol) onto the vortex mixer at full power for approximately 10 seconds (***Do not vortex the Eppendorff tubes containing distilled water. It may lodge suspension in the cap of vial and make heat killing less effective***).
- Repeat those steps below for each culture.

Heat killing

Before Heat-killing:

- Switch on the block and let the temperature attain 80°C.
- Place the distilled water Eppendorff containing the diluted growth onto it and then place the second pair of metal sample blocks on top of the blocks containing samples. Each Eppendorff tube must be covered, as the top of Eppendorff tube can be more than 10°C cooler than the bottom. The back row cannot be covered to allow for the monitoring probe, therefore do not place any Eppendorff tubes in this row.
- Set the timer for 60 minutes.
- Waiting the for heat killing, arrange the diluted solutions destined to short and long term storage respectively into the fridge (+4°C) and the freezer (- 80°C).

- When 60 minutes has elapsed, remove the samples from the heating block and place in a rack. Take care, using the lifting devices, to lift the top blocks as they will be hot. Fill in the heat killed isolate Record Block. Spray with 70% ethanol before removing from the lab.
- Place the samples into a box sequentially from the top left-hand corner to the bottom right-hand corner, in the order they appear on the work sheet. Let the samples cool at the room temperature before to store them into the freezer (-20°C).

References

J. Brown (2006). SOP LL template version 4. TB Diagnosis: Harvesting Cultures for storage and Spoligotyping. Tuberculosis Section, Bacteriology Department, Veterinary Laboratory Agency.