

TUBERCULOSE AVIAIRE

RÉSUMÉ

La tuberculose aviaire est une maladie importante des oiseaux qu'il s'agisse d'oiseaux de compagnie, exotiques en captivité, domestiques ou sauvages. Elle est le plus souvent causée par Mycobacterium avium (sérotypes 1, 2 et 3) et M. genavense. M. avium est la principale cause de maladies des volailles.

Les signes cliniques de la maladie dépendent des organes affectés. La forme chronique est la plus fréquente et est caractérisée par une faiblesse et un amaigrissement progressif chronique. La diarrhée est fréquente. Quelques oiseaux peuvent présenter des signes respiratoires et parfois la mort peut survenir brutalement. Certains oiseaux peuvent développer des lésions oculaires granulomateuses.

Mycobacterium tuberculosis est moins fréquemment la cause d'une infection chez l'oiseau, et quand une telle infection survient, elle est souvent la conséquence d'une contamination à partir du propriétaire ; les symptômes sont différents de ceux observés lors d'infections par d'autres espèces de mycobactéries.

Le complexe Mycobacterium avium et M. intracellulare peuvent aussi infecter de nombreuses espèces animales différentes comme le porc, les bovins, les cervidés, les moutons, les chèvres, les chevaux, les chats, les chiens et des espèces exotiques. Mycobacterium genavense a aussi été signalée chez un chien et un chat immunodéprimé. L'apparition de la maladie chez l'oiseau est en général plus rapide avec Mycobacterium genavense qu'avec M. avium.

Chez l'homme, M. avium et Mycobacterium genavense sont capables d'induire une maladie progressive réfractaire à tout traitement, notamment chez les patients immunodéprimés. Toutes les opérations impliquant la manipulation de cultures vivantes ouvertes ou de matériels provenant d'oiseaux infectés doivent être exécutées sous une hotte de sécurité adéquate.

Le diagnostic de la tuberculose chez les oiseaux dépend de la mise en évidence de Mycobacterium spp. chez les oiseaux morts, ou la détection d'une réponse immunitaire, cellulaire ou humorale, chez les oiseaux vivants.

Identification de l'agent pathogène : *soit les signes cliniques sont observés dans un troupeau, soit des lésions typiques de tuberculose sont présentes chez les oiseaux à l'autopsie ; la mise en évidence de bacilles acido-alcool-résistants sur des frottis ou des coupes faites à partir d'organes affectés est alors suffisante pour un diagnostic positif. Si des bacilles acido-alcool-résistants ne sont pas trouvés, mais des signes ou des lésions typiques sont présents chez les oiseaux, la culture de l'organisme doit être entreprise. Les organismes acido-alcool-résistants isolés doivent être identifiés sur des critères biochimiques, sérologiques, chromatographiques (chromatographie liquide à haute performance [HPLC pour high performance liquid chromatography]) ou par des tests basés sur la détection des acides nucléiques.*

Test tuberculinique et épreuves sérologiques : *ces tests sont normalement utilisés pour déterminer la prévalence de la maladie dans un troupeau, ou pour détecter les oiseaux infectés. Quand ils sont utilisés pour détecter la présence de la tuberculose dans un troupeau, ils seront renforcés par l'autopsie des oiseaux qui donnaient des réactions positives.*

Chez les volailles domestiques, le test tuberculinique dans les barbillons a été le test de choix. Ce test est moins utilisé chez les autres espèces d'oiseaux. Un meilleur test, surtout pour les oiseaux aquatiques, est l'épreuve d'agglutination du sang total avec un antigène coloré (Rozanska). Il est

plus fiable et a l'avantage de donner un résultat en quelques minutes, alors que l'oiseau est encore maintenu. Les tests ne sont pas fiables pour les oiseaux en cage.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : aucun vaccin n'est disponible pour utilisation chez les oiseaux. Une préparation antigénique coloré avec du vert malachite à 1 % est disponible pour l'épreuve d'agglutination du sang total. La tuberculine aviaire PPD (Purified Protein Derivative) est la préparation de référence pour l'emploi dans le test tuberculinique des volailles domestiques.

A. INTRODUCTION

Plusieurs espèces de mycobactéries peuvent être impliquées dans l'étiologie de la tuberculose aviaire. Le complexe *Mycobacterium avium* (sérotypes 1, 2 et 3) et *M. genavense* en sont les causes les plus fréquentes (25). D'autres espèces, telles que *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*, *M. tuberculosis* et *M. bovis* sont moins fréquemment impliquées dans la tuberculose aviaire (25). Le complexe *M. avium* et *M. intracellulare* sont capables d'infecter une large gamme d'espèces animales différentes comme les porcs, les bovins, les cervidés, les moutons, les chèvres, les chevaux les chats, les chiens et des espèces exotiques (26, 27).

Le complexe *M. avium* comprend 3 sous-espèces : *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *sylvaticum* et *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (28). Cette dernière est l'agent causal de la maladie de Johne, ou paratuberculose, chez les ruminants et d'autres espèces de mammifères (voir chapitre 2.1.11., « Paratuberculose »). Bien que des infections expérimentales avec *M. a. paratuberculosis* aient été réalisées avec succès chez les volailles (11), rien ne prouve que ce micro-organisme soit impliqué dans l'étiologie de la tuberculose aviaire.

La plupart des isolats de *M. a. avium* à partir d'oiseaux présentent une séquence répétitive IS901 dans leur génome et donnent un profil caractéristique à trois bandes lors d'analyse du polymorphisme de longueur des fragments après digestion par des enzymes de restriction (RFLP pour *restriction fragment length polymorphism*) (20). Des arguments existent pour associer la présence de IS901 au pouvoir pathogène chez les oiseaux (6, 15). Cette séquence répétitive est aussi présente chez *M. a. sylvaticum* qui est capable d'entraîner la tuberculose chez les oiseaux. IS901 n'a été retrouvée que dans les souches de *M. avium*, sérotypes 1, 2 et 3 (15, 20), qui sont plus pathogènes pour les oiseaux que les autres sérotypes (25). Sur la base de différences génétiques et phénotypiques, il a été proposé récemment de diviser *M. a. avium* en deux sous-espèces : *M. a. hominissuis* pour les isolats d'origine humaine ou porcine et *M. a. avium* pour les isolats d'origine aviaire (13). Les isolats dénommés *M. a. hominissuis* présentent un profil IS1245 multi-bandes et sont capables de cultiver à 24 °C et à 45 °C. En revanche, les isolats d'origine aviaire dénommés *M. a. avium* présentent le profil à 3 bandes dans l'analyse RFLP IS1245, et sont incapables de cultiver à 24 °C et 45 °C (13). Il convient de remarquer que les caractéristiques des isolats aviaires, à savoir le profil à 3 bandes dans l'analyse RFLP IS1245 et la présence IS901, ont été retrouvées chez les souches de *M. a. avium* isolées de cervidés et de bovins (14).

La tuberculose chez les oiseaux est plutôt répandue chez les poulets et chez les oiseaux sauvages élevés en captivité. Les dindes sont très sensibles, mais les canards et les oies sont relativement résistants. Les habitudes consistant à laisser les volailles errer en liberté dans la ferme et à garder les reproducteurs pendant plusieurs années, favorisent la propagation de la tuberculose parmi eux. Les individus infectés et le milieu extérieur (sol et eau) contaminé sont les principales sources de contamination (25). Les mycobactéries peuvent survivre plusieurs mois dans le milieu extérieur (25).

Dans la plupart des cas, les oiseaux infectés ne présentent pas de signes cliniques, mais ils peuvent éventuellement devenir léthargiques et émaciés. La diarrhée est fréquente chez beaucoup d'animaux infectés ainsi qu'une régression et une pâleur de la crête ou de la caroncule. En général, les oiseaux affectés sont âgés de plus d'un an. Certains oiseaux présentent des signes respiratoires et la mort peut survenir brutalement ; la dyspnée est moins fréquente ; des lésions granulomateuses oculaires (16) et des lésions cutanées ont été signalées. Dans les conditions d'élevage intensif, des morts soudaines peuvent se produire, souvent associées à des lésions sévères du foie ; de telles lésions sont facilement observées à l'examen post-mortem (25).

Les lésions primaires de la tuberculose chez les oiseaux sont presque toujours dans le tractus digestif. De telles lésions prennent la forme d'ulcères profonds remplis d'un matériel caséux contenant beaucoup d'organismes, qui sont éliminés dans la lumière de l'intestin et qui apparaissent dans les fèces. Avant que le tractus digestif ne soit ouvert, les aires ulcérées apparaissent comme des masses ressemblant à des tumeurs attachées à la paroi de l'intestin, mais quand l'intestin est ouvert la vraie nature de la masse devient évidente. Les lésions caséuses typiques sont presque toujours retrouvées dans le foie et la rate, et ces organes sont d'habitude très hypertrophiés en raison de la formation d'un nouveau tissu tuberculeux. Les poumons et les autres tissus sont ordinairement sans lésion même dans les cas avancés.

Chez la plupart des espèces d'oiseaux, les lésions tuberculeuses sont surtout retrouvées dans le tractus intestinal, le foie et la rate. Dans les autres organes, les lésions sont moins fréquentes. Des exceptions existent et chez certains oiseaux comme les pigeons, le gibier d'eau et quelques pinsons, la maladie commence en premier lieu au niveau de l'appareil respiratoire.

Il est essentiel de garder à l'esprit que *M. avium*, *M. intracellulare* et *M. genavense* sont capables de donner naissance chez l'homme à une maladie progressive réfractaire au traitement, surtout chez les individus immunodéprimés (25). Toutes les manipulations impliquant la manipulation de culture ouvertes vivantes ou de matériels provenant d'oiseaux infectés doivent être réalisées sous une hotte de sécurité adéquate (Voir Chapitre 1.1.2., « Biosécurité et Biosûreté au laboratoire de microbiologie vétérinaire et dans les animaleries »).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

S'il existe une histoire caractéristique de tuberculose dans un troupeau et que des lésions typiques sont retrouvées chez les oiseaux à l'autopsie, la détection des bacilles acido-alcoolo-résistants dans les frottis ou les sections d'organes infectés, colorés par la méthode de Ziehl-Neelsen, est normalement suffisante pour établir le diagnostic. Occasionnellement, un cas peut apparaître, probablement conséquence d'une dose infectante importante donnant naissance à une maladie aiguë accablante, dans laquelle les organes affectés, le plus souvent le foie, ont une apparence de « cuir marocain » avec de fines taches verdâtres et jaunâtres. Dans de tels cas, des organismes acido-alcoolo-résistants peuvent ne pas être trouvés, mais une inspection soigneuse révélera des faisceaux parallèles de bacilles réfringents brunâtres. La prolongation de l'étape de chauffage de la fuchsine dans la coloration de Ziehl-Neelsen à 10 min révèle habituellement qu'il s'agit vraiment de bacilles acido-alcoolo-résistants, avec exceptionnellement une haute résistance à la pénétration du colorant. Récemment, les techniques utilisant les sondes ADN et l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ont été utilisées pour identifier l'agent. Traditionnellement, *M. avium* se distingue des organismes communs non chromogènes à croissance lente par leur capacité à pousser à 42 °C (*M. a. avium*) et par des tests biochimiques tels que l'hydrolyse du Tween, la pyrazinamidase, la culture sur milieu contenant l'hydrazide de l'acide thiophène-2-carboxylique (TCH) et la réduction du tellurite. La croissance de *Mycobactérium genavense* est particulièrement lente et réclame des conditions particulière pour la culture et l'identification.

• Culture

S'il existe une histoire caractéristique au sein du troupeau et que des lésions suggestives sont retrouvées à l'autopsie, mais qu'aucun bacille acido-alcoolo-résistant n'est observé dans les frottis ou coupes, un essai doit être fait pour isoler l'agent causal à partir du matériel d'autopsie. Le foie ou la rate sont habituellement les meilleurs organes à utiliser, mais si la carcasse est décomposée, la moelle osseuse peut s'avérer plus satisfaisante puisqu'elle pourrait être moins contaminée. Comme pour l'isolement de *M. bovis*, les échantillons prélevés de manière non stérile doivent être traités avec un détergent, de la soude ou de l'acide afin d'éliminer les micro-organismes à croissance rapide (voir Chapitre 2.4.7., « Tuberculose bovine »). *Mycobacterium avium* pousse mieux sur les milieux tels que le milieu de Lowenstein-Jensen, le milieu de Herrold, les milieux de Middlebrook 7H10 et 7H11 ou le milieu de Coletsos additionnés de 1 % de pyruvate de sodium. Il peut occasionnellement être nécessaire d'incorporer de la mycobactine, comme c'est le cas pour l'isolement de *M. paratuberculosis* et *M. silvaticum*. La croissance peut être limitée à la lisière de l'eau de condensation. Les cultures doivent être incubées pendant au moins 8 semaines. Habituellement *M. avium* produit des colonies lisses en 2 à 4 semaines, mais des variants rugueux se produisent. Des durées d'incubation plus courtes peuvent être obtenues en utilisant le système BACTEC de culture liquide.

Pour la culture de *M. genavense*, l'utilisation du système BACTEC sans additif est recommandé mais à pH 6 et avec une pression d'oxygène plus faible (18, 19). Le meilleur milieu solide est le milieu Middlebrook 7H11 supplémenté avec du sang et du charbon et à pH 6 (17).

Le typage des mycobactéries au niveau de l'espèce et de la sous-espèce exige un laboratoire spécialisé. Les tests biochimiques conventionnels pour l'identification des espèces sont longs et ne font pas la distinction entre *M. avium* et *M. intracellulare*. Ainsi, un groupe de diverses mycobactéries incluant les deux espèces, est-il habituellement classé sous la dénomination de complexe *M. avium* (MAC). La séroagglutination, qui repose sur la spécificité d'un résidu sucré des glycopeptidolipides de surface, permet la classification des organismes MAC en 28 sérovars. Des méthodes de typage plus sophistiquées dirigées vers des cibles spécifiques des parois cellulaires sont à présent disponibles, telles que la méthode immuno-enzymatique (ELISA) avec des anticorps monoclonaux contre les principaux sérovars, et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC pour *high performance liquid chromatography*). Les sérovars 1 à 6, 8 à 11 et 21 sont actuellement attribués à *M. avium* et les sérovars 7, 12 à 20 et 25 à *M. intracellulare*. Cependant, aucun accord n'est obtenu pour les autres sérovars,

et certains isolats ne peuvent pas être typés (9). La tuberculose chez les oiseaux est habituellement causée par *M. avium* types 1, 2, ou 3. Si un de ceux-ci est trouvé, il peut être considéré comme étant la cause de la maladie. Si l'isolat n'est pas un de ceux-ci, une identification plus poussée doit être effectuée. Cependant, il faut tenir compte du fait que les lésions tuberculeuses superficielles chez les oiseaux en cage, surtout les psittacidés, peuvent être causées par *M. tuberculosis*. Dorénavant, si des colonies rugueuses de mycobactéries sont isolées à partir de tels oiseaux, elles doivent être testées pour une croissance à 42 °C. Si l'isolat ne se développe pas à 42 °C, *M. tuberculosis* doit être suspecté.

- **Méthodes de reconnaissance des acides nucléiques**

Des tests génétiques fiables et spécifiques pour la détermination de l'espèce sont actuellement disponibles (22). Des sondes d'hybridation des acides nucléiques commercialisées sont devenues un « gold standard » pour la distinction entre les cultures de *M. avium* et de *M. intracellulare* ; *M. genavense* peut aussi être identifié avec ces tests. Une autre sonde qui couvre MAC en totalité a aussi été développée, des souches MAC authentiques ont été décrites qui ne réagissent pas avec les sondes spécifiques de *M. avium* et *M. intracellulare* (23). Ces tests utilisent une sonde ADN simple brin complémentaire de l'ARN ribosomal de l'organisme cible et marquée par chemiluminescence. Les hybrides ADN-ARN marqués sont mesurés avec un luminomètre. Des méthodes moléculaires variées ont été rapportées pour l'identification des cultures de mycobactéries, incluant MAC. Une PCR multiplex pour faire la distinction entre *M. avium*, *M. intracellulare* et le complexe *M. tuberculosis* présente certains avantages (4). Le séquençage de l'ARNr 16S (10) ou avec l'amplification par PCR suivie par soit l'hybridation avec la sonde spécifique d'espèce soit l'analyse par des enzymes de restriction (5, 24, 29) peuvent aussi être utilisés. Bien que certaines de ces méthodes détectent théoriquement l'agent directement dans les échantillons de tissu, aucune d'entre elles n'a été validée pour cet usage. L'identification moléculaire de MAC est donc actuellement réalisée sur des organismes préalablement isolés par culture. Le séquençage du gène *hsp65* est considéré également comme utile pour distinguer les sous-espèces de *M. avium* (30).

En ce qui concerne le génotypage intra-espèces, l'électrophorèse en champ pulsé d'un grand fragment de restriction de l'ADN s'est avérée être d'une sensibilité élevée (12). Aussi, un nombre d'éléments mobiles d'ADN ont-ils été identifiés pour être exploités dans ce but. La séquence d'insertion IS1245, qui est en fait spécifique de *M. avium*, a été démontrée être la plus discriminante pour l'analyse des souches apparentées (2, 7). Une méthode normalisée consistant en l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) de l'IS1245 a été récemment proposée (31). L'infection des oiseaux était provoquée par un sous-ensemble particulier de souches de *M. avium* qui sont caractérisées par un profil RFLP hautement conservé avec IS1245 et IS901, spécifique, en plus des sérovars 1, 2 ou 3 (20).

Récemment, O'Grady *et al.* ont réalisé et étudié la RFLP en utilisant des sondes dérivées de IS901, IS1245 et IS1311 pour étudier l'épidémiologie moléculaire des infections à *M. avium* et *M. intracellulare*, en particulier pour acquérir une compréhension des sources d'infection chez l'homme (14).

Si des conditions de typage spécialisées ne sont pas disponibles, la probabilité que l'organisme isolé soit la cause de la maladie peut être établie avec les tests de pathogénicité. Il est préférable que ceux-ci soient effectués sur les espèces d'oiseaux étudiés, mais à défaut, une poule domestique ou une caille japonaise peut être utilisée. Les oiseaux jeunes adultes sont les meilleurs. Un inoculum est préparé en mettant un petit carré de papier d'aluminium et des billes de verre dans un récipient à vis, qui est ensuite stérilisé et pesé. Une anse de culture est ensuite placée sur le papier d'aluminium et le tout est repesé. Enfin, une solution saline normale stérile en quantité suffisante est additionnée pour obtenir une suspension de la culture à 0,1 mg/ml. Puis les oiseaux sont inoculés par voie intraveineuse avec 1 ml de la suspension. Si l'organisme est virulent, l'oiseau mourra en 5 à 6 semaines et l'oiseau aura alors des lésions étendues remplies de bacilles acido-résistants.

2. Méthodes immunologiques

Les tests en vue de l'exportation dépendent des conditions imposées par chaque pays importateur. En général, la tuberculation ou l'hémagglutination (antigène coloré) sont les tests les plus fréquemment utilisés dans le cas d'exportation de volailles.

a) Le test à la tuberculine

Le test le plus largement utilisé chez les volailles domestiques, et le seul test pour lequel il existe un réactif de référence international, est le test à la tuberculine. La tuberculine est le dérivé protéique purifié aviaire de référence (PPD, *Purified Protein Derivative*). Les oiseaux sont testés par inoculation intradermique dans le barbillon avec 0,05 ml ou 0,1 ml de tuberculine contenant environ 2 000 unités internationale (UI), en utilisant une aiguille très fine d'environ 10 mm × 0,5 mm. Le test est lu après 48 h et une réaction positive est un gonflement au point d'inoculation, allant d'un petit nodule ferme d'environ 5 mm de diamètre à un gros œdème s'étendant à l'autre barbillon et à la base du cou. Avec l'habitude, même des barbillons très petits sur des oiseaux immatures peuvent être inoculés avec succès. Cependant, chez les oiseaux immatures un peigne peut être utilisé, bien que les résultats ne soient pas aussi fiables. Le test à la

tuberculine des barbillons chez les dindes est beaucoup moins fiable que chez les volailles domestiques. L'inoculation au niveau des ailes a été recommandée comme étant plus efficace, mais il n'est pas encore aussi bon que chez les oiseaux domestiques. Les autres oiseaux peuvent aussi être testés au niveau des ailes, mais les résultats ne sont généralement pas satisfaisants. Les aires de la peau dénudée des canards Muscovy et de certaines espèces de faisans peuvent être utilisées, mais la fiabilité est douteuse et l'interprétation difficile. Le test au niveau des pattes des oiseaux aquatiques a aussi été décrit ; le test n'est pas très sensible et il est souvent compliqué par des infections au point d'inoculation.

Chez les faisans, le test à la tuberculine peut être réalisé dans l'un ou l'autre des deux sites. Dans la première, 0,05 ml ou 0,1 ml de tuberculine sont injectés dans la peau de la paupière inférieure. Un résultat positif est indiqué par un gonflement marqué au site de l'injection après 48 h. Alternativement, 0,25 ml de tuberculine sont injectés dans les muscles thoraciques et les oiseaux sont observés pendant 6 à 10 h. Les oiseaux infectés montreront des signes de dépression et seront séparés du troupeau, et il peut y avoir des cas de morts soudaines. Aucun signe clinique ne sera provoqué chez les oiseaux non-infectés.

b) Épreuve à l'antigène coloré

• Préparation de l'antigène

Un antigène coloré avec du vert malachite à 1 % est utilisé pour une épreuve rapide d'agglutination sur lame du sang total (21). La souche utilisée pour la préparation de l'antigène coloré doit être lisse et non agglutinée en suspension saline. Elle doit se conformer aux caractéristiques des espèces de *M. avium*.

Une souche qui détectera l'infection avec n'importe quel sérotype est recommandée pour être utilisée au lieu d'un sérotype spécifique qui est le plus probablement rencontré (en Europe le sérotype 2 pour les volailles domestiques, sérotype 1 pour les oiseaux aquatiques). Il peut être préférable d'utiliser une souche hautement spécifique pour le sérotype qu'il détecte. La spécificité des souches peut être déterminée seulement en les testant comme antigènes, bien qu'en général un antigène sérotype 2 détectera toujours une infection à sérotype 3 et inversement. Les souches sérotype 1 paraissent détecter plus souvent un large spectre d'infection et détecteront souvent aussi des infections à mycobactéries mycobactine-dépendantes ou *M. silvaticum*. Il n'y pas de raison de ne pas utiliser une culture contenant plus d'une souche de *M. avium*, pourvu qu'elle montre les propriétés désirées de sensibilité et de spécificité. La cohérence des résultats entre les lots serait plus facile avec l'utilisation de cultures pures.

Les organismes doivent être cultivés dans un milieu liquide convenable, tel que le milieu de Middlebrook 7H9 contenant du pyruvate de sodium à 1 % pour une meilleure culture. Une bonne culture doit être obtenue en 7 jours environ. Une culture liquide est utilisée comme semence pour la préparation de l'antigène en vrac.

L'antigène pour les épreuves d'agglutination est mieux cultivé sur milieu solide, tel que le milieu de Löwenstein-Jensen ou le milieu de Middlebrook 7H11, contenant du pyruvate de sodium à 1 % au lieu du glycérol, en utilisant des boîtes de Roux ou des grands flacons. L'utilisation de milieu solide permet au maximum la détection de n'importe quelle contamination, et les antigènes cultivés dans certain milieu liquide ne sont pas agglutinés par les anticorps spécifiques. La culture liquide doit être diluée (sur la base d'expérience) pour donner des colonies discrètes sur milieu solide. Celui-ci donne habituellement le meilleur rendement, et augmente à nouveau la chance de détecter des contaminations. Environ 10 ml d'inoculum sont d'ordinaire suffisants pour permettre de laver la surface totale, et produire assez d'humidité pour conserver dans les flacons l'air proche de 100 % d'humidité.

Les flacons sont incubés à 37 °C, et une bonne culture doit être obtenue en 14 à 21 jours avec la plupart des souches. L'antigène est récolté par l'addition de billes de verre stériles et 2 fois le volume de solution saline normale stérile (contenant 0,3 % de formol) comme pour l'inoculation des flacons. Le flacon est ensuite agité doucement pour enlever toute la culture et le produit de lavage est collecté dans un flacon stérile et ré-incubé à 37 °C pendant 7 jours. Les bacilles tués sont ensuite lavés 2 fois avec une solution saline normale stérile avec 0,2 % de formol par centrifugation et resuspension. Cette suite d'évènement est plus sûre que la méthode originale dans laquelle le lavage était effectué avant l'incubation qui tue les organismes. Enfin les organismes sont à nouveau centrifugés et resuspendus dans une solution saline normale stérile avec 0,2 % de formol et 0,4 % de citrate de sodium, à une concentration d'environ 10¹⁰ bactérie/ml. Ceci correspond à 10 fois la concentration équivalente au tube n°4 de l'échelle de McFarland.

Les cultures pour l'antigène doivent être examinées quotidiennement pour les contaminations pendant les 5 premiers jours d'incubation. La suspension faite à partir des cultures lavées est aussi réexaminée au microscope (pour les contaminants probables tels que les levures) et revérifier par culture pour s'assurer que le formol a tué les mycobactéries.

- **Validation de l'antigène**

Les cultures doivent être vérifiées par coloration de Gram pour la présence d'organismes autres que les mycobactéries.

Un ou plusieurs lots d'antigène agglutinant doivent être testés pour l'efficacité chez des oiseaux tuberculeux infectés naturellement ou artificiellement par comparaison avec une préparation de référence d'activité connue. L'activité rapportée à celle de la préparation de référence ne doit pas différer significativement de celle déclarée sur l'étiquette. Chaque flacon d'antigène doit être testé avec du sérum de poulet normal (pour détecter l'auto-agglutination) et du sérum de poulet positif vis-à-vis de *M. avium* de basse et haute teneur en anticorps. Ceci doit être fait, autant que possible, en comparant avec un lot précédent d'antigène coloré. Ces flacons donnant des réactions d'agglutination satisfaisantes avec l'antisérum peuvent être regroupés et l'antigène est alors coloré. Ceci est fait par addition de 3 ml d'une solution de vert malachite à 1 % pour 100 ml de suspension. Si possible, l'antigène coloré doit alors être vérifié en utilisant du sang total juste comme l'antigène non coloré avait été testé avec le sérum. L'antigène agglutinant peut être conservé pendant au moins 6 mois dans un réfrigérateur à 4 °C et beaucoup plus longtemps si congelé à -20 °C ou plus bas. Si un lot n'a pas été utilisé pendant une longue période il doit être revérifié surtout pour l'agglutination.

Le seul test de sécurité est la culture de l'antigène non lavé après 7 jours d'incubation, pour s'assurer que tous les bacilles sont morts.

- **Protocole**

L'épreuve d'agglutination à l'antigène coloré a été utilisée avec de bons résultats, surtout chez les oiseaux aquatiques domestiques et ornementaux. Une goutte (0,05 à 0,1 ml) de l'antigène est mélangée avec le même volume de sang total frais, obtenu par ponction veineuse, sur une porcelaine blanche ou une tuile en émail. Le mélange est agité pendant 2 min et observé pour l'agglutination. L'agglutination peut être grossière, et dans ce cas elle est évidente, ou très fine, et dans ce cas elle peut être le plus clairement vue comme une accumulation d'antigène coloré au vert malachite autour du bord de la goutte, laissant au centre une couleur rouge sang normale. Cette épreuve est surtout utilisée pour trier les grands troupeaux pour faire un choix immédiat, et a donc des avantages sur le test à la tuberculine pour le contrôle de la maladie, même chez les volailles domestiques. Il a aussi été suggéré qu'elle était plus fiable que le test à la tuberculine chez les volailles domestiques.

Note sur la limite de l'utilisation

Il semble que ni le test à la tuberculine avec la tuberculine aviaire ni l'épreuve d'agglutination à l'antigène coloré n'aient de valeur dans les cas d'infections à *M. tuberculosis* chez les oiseaux en cage.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Aucun vaccin n'est disponible.

La tuberculine aviaire est une préparation faite à partir de produits de culture de *M. avium* traités par la chaleur. Elle est utilisée par injection intradermique pour révéler l'hypersensibilité retardée comme un moyen d'identifier les oiseaux infectés avec ou sensibilisés par la même espèce de bacille tuberculeux.

Des lignes directrices pour la production de vaccins vétérinaires sont données au Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices données ici et dans le Chapitre 1.1.8. sont volontairement générales et doivent être complétées par les exigences nationales et régionales.

1. Gestion des semences bactériennes

a) Caractéristiques de la semence bactérienne

Les souches de *M. avium* utilisées pour préparer les cultures de la semence doivent être identifiées comme espèces par des tests appropriés. Elles doivent être sans organismes contaminants et être capables de donner un produit de qualité satisfaisante. Les souches recommandées par l'Union Européenne (UE), par exemple, sont D4ER et TB56. Il peut également être fait référence aux recommandations de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (32).

b) Méthode de culture

Le matériel à ensemer est conservé comme un stock de culture lyophilisée. Si les cultures ont été développées sur milieu solide, il sera nécessaire d'adapter l'organisme au développement en culture liquide. Ceci est le plus facilement accompli par incorporation d'un morceau de pomme de terre dans les flacons de milieu liquide (ex. milieu de Watson Reid) Quand la culture a été adaptée au milieu liquide, elle peut être maintenue par passages de 2 à 4 semaines d'intervalle (1, 8).

Le substrat de culture pour la production doit être capable de donner un produit conforme aux normes de la Pharmacopée Européenne ou autres normes internationales (3). Il doit être sans ingrédients connus pour entraîner des réactions toxiques ou allergiques.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Les souches de *M. avium* utilisées comme semences des cultures doivent être dépourvus d'organismes contaminants.

Les lots de semences doivent être efficaces dans la production d'une tuberculine ayant une activité suffisante. Les tests nécessaires sont décrits dans la section C.4 ci-dessous.

2. Méthode de fabrication

La tuberculine aviaire peut être fabriquée par les 3 méthodes suivantes :

a) La vieille tuberculine

L'organisme est cultivé dans un bouillon glyciné, tué par chauffage dans un flux de vapeur et filtré pour éliminer les cellules. Le filtrat est concentré par chauffage et stérilisé par filtration.

b) La tuberculine concentrée à chaud sur milieu synthétique (CCMS)

Comme pour la vieille tuberculine, mais le bouillon glyciné est remplacé par un milieu synthétique (milieu synthétique modifié Dorset-Henley).

c) Dérivé protéique purifié (PPD)

Comme pour la tuberculine CCMS, mais, au lieu d'être concentrée par la chaleur, la protéine contenue dans le filtrat est précipitée chimiquement (le sulfate d'ammonium ou l'acide trichloracétique [TCA] sont utilisés) lavée et remise en suspension. La tuberculine PPD est recommandée car elle donne moins de réactions faussement positives et peut être normalisée avec plus de précision. Un agent de conservation antimicrobien qui ne provoque pas l'apparition de réactions faussement positives, tel que le phénol (pas plus de 0,5 % [w/v]) peut être additionné. Les dérivés du mercure ne doivent pas être utilisés. Le glycérol (pas plus de 10 % [w/v]) ou le glucose (2,2 % [w/v]) peuvent être additionnés comme stabilisateurs. Le produit est distribué aseptiquement dans des récipients en verre neutre stériles, qui sont ensuite scellés pour prévenir les contaminations. Le produit peut être lyophilisé.

3. Contrôles en cours de fabrication

Les flacons de production, inoculés à partir des cultures de semence convenable, sont incubés pendant une période de temps approprié. Les flacons montrant des contaminations ou une culture visiblement anormale doivent être éliminés après autoclavage. Au cours de l'incubation, les cultures qui se développent en surface deviennent humides et peuvent couler dans le milieu ou au fond du flacon. Dans les tuberculines PPD, le pH du précipité dissout (appelé tuberculine concentré) doit être de 6,6 à 6,7. Le niveau de protéine du concentré PPD est déterminé par la méthode de Kjeldahl. L'azote total et l'azote précipité par l'acide trichloracétique sont habituellement comparés.

4. Contrôle des lots

a) Stérilité

Le test de stérilité est généralement réalisé selon la Pharmacopée Européenne ou d'autres lignes directrices (voir aussi le Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques »).

b) Innocuité

Pour vérifier l'absence de mycobactéries vivantes dans la tuberculine PPD, il convient d'utiliser la méthode de culture décrite ci-dessus. Cette méthode qui ne nécessite pas l'emploi d'animaux, est utilisée dans de nombreux laboratoires et son utilisation est encouragée plutôt que celle d'animaux. La méthode qui suit est celle qui était employée auparavant sur des animaux de laboratoire pour évaluer l'innocuité de la tuberculine PPD. Deux cobayes, chacun pesant pas moins de 250 g et qui n'ont pas été traités auparavant par un quelconque produit qui interférerait avec le test, sont inoculés par voie sous-cutanée avec 0,5 ml de tuberculine à tester. Aucun effet anormal ne doit apparaître dans les 7 jours.

c) Infectivité résiduelle

Les tests sur la tuberculine pour les mycobactéries vivantes peuvent être réalisés soit sur la tuberculine immédiatement avant qu'elle soit distribuée dans les récipients finaux ou sur des échantillons pris à partir des récipients finaux eux-mêmes. Un échantillon d'au moins 10 ml doit être prélevé et doit être injecté par voie intrapéritonéale ou par voie sous-cutanée chez au moins deux cobayes, en divisant également le volume à tester entre les cobayes. Il est souhaitable de prélever un échantillon plus important, 50 ml, et de concentrer les mycobactéries résiduelles par centrifugation ou filtration sur membrane. Les cobayes sont observés pendant au moins 42 jours, et examinés macroscopiquement à l'autopsie. Les lésions trouvées sont examinées microscopiquement et par culture.

Chaque récipient rempli doit être inspecté avant d'être étiqueté, et ceux montrant des anomalies doivent être éliminés.

d) Effet sensibilisant

Pour tester l'effet sensibilisant, 3 cobayes qui n'ont pas été traités auparavant par un produit qui pourrait interférer avec le test, sont chacun injectés par voie intradermique à 3 occasions avec l'équivalent de 500 UI de la préparation sous un volume de 0,1 ml. Chaque cobaye, ensemble avec chacun des 3 cobayes témoins qui n'ont pas été inoculés auparavant, est injecté par voie intradermique 15 à 21 jours après la 3^e injection avec la même dose de la même tuberculine. Les réactions des deux groupes de cobayes ne doivent pas être significativement différentes quand elles sont mesurées 24 à 28 h plus tard.

e) Activité

L'activité de la tuberculine aviaire est déterminée chez des cobayes sensibilisés avec *M. avium*, en comparaison avec une préparation de référence calibrée en UI.

Ne pas utiliser plus de 9 cobayes albinos, chacun pesant 400 à 600 g. Sensibiliser les cobayes par administration à chacun, par injection intramusculaire profonde, d'une dose convenable de *M. avium* inactivée ou vivante. Le test est réalisé entre 4 et 6 semaines plus tard comme suit : raser le flanc des cobayes suffisamment pour fournir un espace pour 3 à 4 injections sur chaque côté. Préparer au moins 3 dilutions de la tuberculine à contrôler et au moins 3 dilutions de la préparation de référence dans une solution tampon isotonique contenant 0,0005 % (w/v) de polysorbate 80 (Tween 80). Choisir les dilutions de sorte que les réactions produites aient un diamètre compris entre 8 et 25 mm. Répartir les dilutions à des sites d'injection randomisés selon un carré latin. Les dilutions sont injectées par voie intradermique sous des volumes de 0,1 ou 0,2 ml.

Après 24 à 28 h, les diamètres des réactions sont mesurés et les résultats sont calculés en utilisant des méthodes statistiques de référence, prenant les diamètres directement proportionnels aux logarithmes des concentrations des tuberculines. L'activité estimée doit être supérieure à 75 % et inférieure à 133 % de l'activité déclarée sur l'étiquette. Le test n'est pas valable à moins que les limites de confiance de l'erreur ($p = 0,95$) sont supérieures à 50 % et inférieures à 200 % de l'activité estimée. Si le lot manque un test d'activité, le test peut être répété une ou plusieurs fois pourvu que l'estimation finale de l'activité et des limites de confiance soit basée sur les résultats combinés de tous les tests.

Il est recommandé que la tuberculine aviaire contienne l'équivalent d'au moins 25 000 UI/ml, donnant une dose pour l'utilisation pratique de 2 500 UI/0,1 ml.

f) Spécificité

Un ou plusieurs lots de tuberculine peuvent être testés pour la spécificité ensemble avec une préparation de référence de tuberculine bovine en comparant les réactions produites chez les cobayes sensibilisés avec *M. bovis* en utilisant une procédure semblable à celle décrite dans la Section C.4.d. Chez les cobayes sensibilisés avec *M. bovis*, l'activité de la préparation de la tuberculine aviaire ne doit pas être supérieure à 10 % de l'activité de la préparation de référence de la tuberculine bovine utilisée dans le test d'activité.

g) Stabilité

Durant la conservation, la tuberculine liquide doit être protégée de la lumière et maintenue à une température de 5 ± 3 °C. Les préparations lyophilisées peuvent être stockées à des températures plus élevées (mais n'excédant pas 25 °C) protégées de la lumière. Durant l'utilisation, les périodes d'exposition à des températures plus élevées ou d'exposition directe aux rayons du soleil doivent être réduites au minimum.

Pourvu que les tuberculines soient stockées à une température entre 2 °C et 8 °C et protégées de la lumière, elles peuvent être utilisées jusqu'à la fin des périodes suivantes après le dernier test d'activité satisfaisant : tuberculines liquides PPD : 2 ans ; tuberculines lyophilisées PPD : 8 ans ; tuberculines CCMS diluées : 2 ans.

h) Agents de conservation

Les agents de conservation antimicrobiens ou autres substances qui peuvent être additionnés à une tuberculine, doivent avoir démontré qu'ils ne réduisent pas la sécurité et l'efficacité du produit. Les concentrations maximum permises pour le phénol est 0,5 % (w/v) et pour le glycérol 10 % (v/v). Le pH doit être entre 6,5 et 7,5.

i) Précautions d'emploi et mise en garde

L'expérience à la fois chez l'homme et l'animal a conduit à l'observation que la tuberculine diluée proprement injectée par voie intradermique aboutit à une réaction localisée au point d'injection sans manifestation généralisée. Même chez des personnes très sensibles, les réactions généralisées sévères sont extrêmement rares.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Un test pour l'absence de propriétés toxiques et irritantes doit être réalisé selon les recommandations de la Pharmacopée Européenne (voir aussi Section C.4.b)

b) Activité

L'activité des tuberculines doit être estimée par des méthodes biologiques. Ces méthodes doivent être utilisées pour les tuberculines CCMS et PPD ; elles sont basées sur la comparaison des tuberculines à tester avec les tuberculines de référence (voir aussi Section C.4.d).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ANGUS R.D. (1978). Production of Reference PPD tuberculins for Veterinary use in the United States. *J. Biol. Stand.*, **6**, 221.
2. BONO M., JEMMI T., BERNASCONI C., BURKI D., TELENTI A. & BODMER T. (1995). Genotypic characterisation of *Mycobacterium avium* strains recovered from animals and their comparison to human strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 371–373.
3. COUNCIL OF EUROPE (2000). Purified protein derivative (avian). *In: European Pharmacopoeia, Fourth Edition. Editions of the Council of Europe, Strasbourg, France, 1694.*
4. COUSINS D., FRANCIS B. & DAWSON D. (1996). Multiplex PCR provides a low-cost alternative to DNA probe methods for rapid identification of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 2331–2333.
5. DEVALLOIS A., PICARDEAU M., GOH K.K., SOLA C., VINCENT V. & RASTOGI N. (1996). Comparative evaluation of PCR and commercial DNA probes for detection and identification to species level on *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 2756–2759.
6. DVORSKA L., BULL T.J., BARTOS M., MATLOVA L., SVASTOVA P., WESTON R.T., KINTR J., PARMOVA I., VAN SOOLINGEN D. & PAVLIK I. (2003). A standardised restriction fragment length polymorphism (RFLP) method for typing *Mycobacterium avium* isolates links IS901 with virulence for birds. *J. Microbiol. Methods*, **55**, 11–27.

7. GUERRERO C., BERNASCONI C., BURKI D., BODMER T. & TELENTI A. (1995). A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 304–307.
8. HAAGSMA J. & ANGUS R.D. (1995). Tuberculin production. In: *Mycobacterium bovis* Infections in Humans and Animals, Steele J.H. & Thoen C.O., eds. Iowa State University Press, Ames, USA, 73–84.
9. INDERLIED C.B., KEMPER C.A. & BERMUDEZ L.E.M. (1993). The *Mycobacterium avium* complex. *Clin. Microbiol. Rev.*, **6**, 266–310.
10. KIRSCHNER P., MEIER P.A. & BOTTGER E.C. (1993). Genotypic identification and detection of mycobacteria. In: *Diagnostic Molecular Microbiology*, Persing D.H., Smith T.F., Tenover F.C. & White T.C., eds. American Society for Microbiology, Washington DC, USA, 173–190.
11. LARSEN A.B. & MOON H.W. (1972). Experimental *Mycobacterium paratuberculosis* infection in chickens. *Am. J. Vet. Res.*, **33** (6), 1231–1235.
12. MAZUREK G.H., HARTMAN S., ZHANG Y., BROWN B.A., HECTOR J.S.R., MURPHY D. & WALLACE R.J. (1993). Large DNA restriction fragment polymorphism in the *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare* complex: a potential epidemiological tool. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 390–394.
13. MIJS W., DE HAAS P., ROSSAU R., VAN DER LAAN T., RIGOUTS L., PORTAELS F. & VAN SOOLINGEN D. (2002). Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* to bird-type isolates and *M. avium* subsp. *hominissuis* for the human/porcine type of *M. avium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 1505–1518.
14. O'GRADY D., FLYNN O., COSTELLO E., QUIGLEY F., GOGARTY A., MCGUIRK J., O'ROURKE J. & GIBBONS N. (2000). Restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium avium* isolates from animal and human sources. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, **4**, 278–281.
15. PAVLIK I., SVASTOVA P., BARTL J., DVORSKA L. & RYCHLIK I. (2000). Relationship between IS901 in the *Mycobacterium avium* complex strains isolated from birds, animals, humans, and the environment and virulence for poultry. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **7**, 212–217.
16. POCKNELL A.M., MILLER B.J., NEUFELD J.L. & GRAHN B.H. (1996). Conjunctival mycobacteriosis in two emus (*Dromaius novaehollandiae*). *Vet. Pathol.*, **33** (3), 346–348.
17. REALINI L., DE RIDDER K., HIRSCHL B. & PORTAELS F. (1999). Blood and charcoal added to acidified agar media promote the growth of *Mycobacterium genavense*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **34**, 45–50.
18. REALINI L., DE RIDDER K., PALOMINO J., HIRSCHL B. & PORTAELS F. (1998). Microaerophilic conditions promote growth of *Mycobacterium genavense*. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 2565–2570.
19. REALINI L., VAN DER STUYFT P., DE RIDDER K., HIRSCHL B. & PORTAELS F. (1997). Inhibitory effects of polyoxyethylene stearate, PANTA, and neutral pH on growth of *Mycobacterium genavense* in BACTEC primary cultures. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 2791–2794.
20. RITACCO V., KREMER K., VAN DER LAAN T., PIJNENBURG J.E.M., DE HAAS P.E.W. & VAN SOOLINGEN D. (1998). Use of IS901 and IS1245 in RFLP typing of *Mycobacterium avium* complex: relatedness among serovar reference strains, human and animal isolates. *Int. J. Tuberculosis Lung Dis.*, **2**, 242–251.
21. ROZANSKA M. (1965). Preparation of antigen for whole blood rapid agglutination test and its specificity for diagnosis of avian tuberculosis. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, **9** (1), 20–25.
22. SAITO H., TOMIOKA H., SATO K., TASAKA H. & DAWSON D.J. (1990). Identification of various serovar strains of *Mycobacterium avium* complex by using DNA probes specific for *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 1694–1697.
23. SOINI H., EEROLA E. & VILJANEN M.K. (1996). Genetic diversity among *Mycobacterium avium* complex Accu-Probe-positive isolates. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 55–57.
24. TELENTI A., MARCHESI F., BALZ M., BALLY F., BOTTGER E.C. & BODMER T. (1993). Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 175–178.

25. TELL L.A., WOODS L. & CROMIE R.L. (2001). Tuberculosis in birds. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **20**, 180–203.
26. THOREL M.F., HUCHZERMAYER H. & MICHEL A.L. (2001). *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare* infection in mammals. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **20**, 204–218.
27. THOREL M.F., HUCHZERMAYER H., WEISS R. & FONTAINE J.J. (1997). *Mycobacterium avium* infections in animals. Literature review. *Vet. Res.*, **28**, 439–447.
28. THOREL M.F., KRICHEVSKY M. & LEVY-FREBAULT V.V. (1990). Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40** (3), 254–260.
29. TRUEBA F., FABRE M. & SAINT-BLANCARD P. (2004). Rapid identification of *Mycobacterium genavense* with a new commercially available molecular test, INNO-LIPA MYCOBACTERIA v2. *J. Clin. Microbiol.*, **42** (9), 4403–4404.
30. TURENNE C.Y., SEMRET M., COUSINS D.V., COLLINS D.M. & BEHR M.A. (2006). Sequencing of hsp65 distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex. *J. Clin. Microbiol.*, **44** (2), 433–440.
31. VAN SOOLINGEN D., BAUER J., RITACCO V., CARDOSO LEO S., PAVLI I., VINCENT V., RASTOGI N., GORI A., BODMER T., GARZELLI C. & GARCIA M.J. (1998). IS1245 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates: proposal for standardization. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 3051–3054.
32. World Health Organization (WHO) (1987); Requirements for Biological Substances No. 16, Annex 1: Requirement for Tuberculins; Technical Report Series No. 745, WHO, Geneva, Switzerland, 31–59.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la tuberculose aviaire (se reporter à la liste de la partie 3 de ce Manuel Terrestre ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int)