

Etudes de la spécificité et de la sensibilité relatives aux tests tuberculiques de la technique de dosage d'interféron gamma pour le diagnostic de la tuberculose bovine en Dordogne

FAYE S. (1), BOSCHIROLI M.L. (2), MOYEN J.L. (1), BENET J.J. (3), GARIN-BASTUJI B. (2), GARES H. (1).

(1) Laboratoire départemental d'analyse et de recherche de la Dordogne (LDAR24) - 161 avenue Winston Churchill - 24660 Coulounieix-Chamiers

(2) Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) - LERPAZ, Unité des zoonoses bactériennes - 23 avenue du Général De Gaulle - 94706 Maisons-Alfort

(3) Ecole nationale vétérinaire d'Alfort (ENVA) - Unité des maladies contagieuses - 7 avenue du Général De Gaulle - 94704 Maisons-Alfort

RESUME - Bien que la France ait été déclarée indemne de tuberculose bovine (TB) en 2001 (UE), le taux d'élevages infectés de TB dans certains départements comme la Dordogne est remonté de façon préoccupante au cours des dernières années. Le dépistage réglementaire actuel de la TB est encore basé sur une intradermotuberculation simple (IDS) et / ou une IDC (comparative). Leurs principaux inconvénients sont la subjectivité dans l'interprétation des résultats, le manque de spécificité de l'IDS, de sensibilité de l'IDC et un long délai (obligatoire entre deux tests) de suspension de la qualification du cheptel.

Un test de diagnostic alternatif, le dosage d'interféron gamma (IFN γ) a donc été étudié selon les conditions de terrain de la Dordogne. Ainsi, malgré l'absence de *gold standard*, des études de sensibilité et spécificité comparées (aux tests tuberculiques) du test IFN γ basé sur le kit Bovigam[®] avec les dérivés protéiques purifiés aviaires et bovins (PPDA = A et PPDB = B), et avec les peptides recombinants ESAT6 et CFP10 ont été effectuées dans le but de déterminer un seuil de décision pour lequel, les sensibilité et spécificité relatives du test seront optimales.

Les résultats ont montré que pour la validation du mode opératoire, il serait intéressant d'interpréter les résultats du test en tenant compte des résultats obtenus avec les PPD ainsi que les peptides recombinants, d'utiliser des seuils de positivité différents en fonction des zones ou des situations épidémiologiques rencontrées. Par ailleurs, dans certains cas particuliers, il conviendrait de se baser sur les résultats obtenus avec les antigènes recombinants. La sensibilité relative à l'IDC non négative du test étudié varie de 70 % à 72 % et sa spécificité relative à l'IDS est comprise entre 95,7 % et 98,4 %. Cependant, il est nécessaire de poursuivre ces études en prenant des plus grands effectifs afin de tirer de conclusions statistiquement fiables.

Studies of the specificity and sensitivity relative to skin tests of the dosage of the Interferon gamma technique for the diagnosis of bovine tuberculosis in Dordogne

FAYE S. (1), BOSCHIROLI M.L. (2), MOYEN J.L. (1), BENET J.J. (3), GARIN-BASTUJI B. (2), GARES H. (1).

(1) LDAR24 - 161 avenue Winston Churchill - 24660 Coulounieix-Chamiers

SUMMARY - Even though France is considered bovine tuberculosis (BTB) free since 2001 (EU), BTB-infected cattle rates increased in the last years in regions such as Dordogne. Official screening of BTB is still based on single intradermal skin test (SIST) and/or the comparative version of the test (CIST). The main inconveniences of these tests are the subjectivity of the interpretation of the result, the lack of specificity of SIST and of sensitivity of CIST and, upon declaration of an SICT non negative result, the long disqualification period imposed until the CIST is carried out.

An alternative diagnostic test, interferon gamma (IFN γ) dosage, has been studied according to the field conditions in Dordogne. Thus, in spite of the lack of gold standard, studies of sensitivity and specificity compared to skin tests of the IFN γ test based on the Bovigam[®] kit with Avian and Bovine Purified Protein Derivatives (PPDA=A and PPDB=A), and with recombinant peptides ESAT6 and CFP10, were undertaken in order to determine a decisional cut off value for which relative sensitivity and specificity of the test are optimal.

Our results show that for validating the test procedure it would be interesting to interpret the results taking into account both the values obtained using PPD and the recombinant peptides and to use different cut off values depending on a given region or epidemiological situation. Besides, in particular cases, it would be convenient to consider the recombinant peptide-values only. Sensitivity relative to no negative IDC of the test vary between 70 % and 72 % and its specificity relative to IDS is comprised between 95.7 % and 98.4 %. Nevertheless, it would be necessary to pursue these studies with a larger number of animals in order to obtain statistically reliable conclusions.

INTRODUCTION

La tuberculose bovine (TB) due à *Mycobacterium bovis* est une maladie infectieuse contagieuse et chronique largement répandue dans le monde. Bien que la France ait été déclarée indemne de TB en 2001 par l'Union européenne, les taux d'incidence de certains départements comme la Côte d'Or, les Pyrénées Atlantiques, la région de la Camargue et la Dordogne continuent à être élevés. Ce dernier a subi une augmentation de foyers de TB depuis 2003 (3 foyers ; 0,5 p. mille), le rendant jusqu'en 2006 le département le plus infecté de France (vingt-neuf foyers ; 0,6 %). Le dépistage réglementaire historique de la TB, encore utilisé à l'heure actuelle chez les bovins est basé sur des tests tuberculiques

dont l'utilisation sur le terrain rencontre des limites. En effet, l'intradermotuberculation simple (IDS, très sensible mais manquant de spécificité) est réalisée pour le dépistage de première intention. Dans le cas d'un résultat non négatif, la qualification du cheptel est suspendue. Après un délai obligatoire de six semaines, une intradermotuberculation comparative (IDC, plus spécifique) est effectuée afin de confirmer ou d'infirmer le résultat et ainsi décider, en cas de résultat positif, de l'abattage d'animaux afin de réaliser des prélèvements en vue de la mise en évidence du bacille tuberculeux, condition qui permet de déclarer le cheptel infecté de TB. Cette période de déqualification est par conséquent longue et elle engendre des pertes économiques

considérables ce qui conduit à une sous-déclaration des résultats non négatifs de l'IDS par certains vétérinaires traitants.

Durant ces dernières années, un test de diagnostic alternatif, le dosage d'interféron gamma (IFN γ), a été développé afin de déceler l'infection à *M. bovis*. Ses principaux avantages sont la détection précoce de l'infection et la possibilité de l'utiliser à de multiples reprises sans délai d'attente entre deux examens. De plus, sa réalisation et son interprétation par le laboratoire le rendent indépendant des acteurs du terrain. Bien que ce test figure dans la réglementation française, son cadre d'utilisation précis n'a pas été défini en raison de l'absence de son évaluation en France.

L'objectif de ce travail est d'estimer, malgré l'absence de *gold standard*, la sensibilité relative à l'IDC non négative et la spécificité relative à l'IDS du test de dosage d'IFN γ selon les conditions de terrain de la Dordogne. Le kit commercial utilisé est Bovigam[®] (Prionics) avec lequel des peptides recombinants, ESAT6 et CFP10 (*Statens Serum Institut*, SSI) ont été ajoutés.

Le but final de ce travail est d'évaluer si l'utilisation du test IFN γ conduit à une amélioration du programme de prophylaxie de la TB. En concertation avec la D. G. Al. (ministère de l'agriculture et de la pêche), les conditions d'inclusion de ce test dans le cadre réglementaire de la lutte contre cette maladie pourraient donc être envisagées.

1. MATERIEL ET METHODES

L'étude de sensibilité relative a été effectuée rétrospectivement à partir des résultats des analyses effectuées pendant les campagnes de prophylaxie 2006-2007 et 2007-2008 en Dordogne.

L'étude de spécificité relative a été réalisée en début d'année 2008.

L'ensemble des résultats obtenus pour ces deux études va nous permettre de déterminer les seuils (*cut-off*) de validation du test IFN γ afin de définir des valeurs optimales de spécificité et sensibilité relatives.

1.1. TEST IFN γ

1.1.1. Stimulation cellulaire et dosage d'IFN γ Macro-méthode

La stimulation cellulaire constitue la première étape de l'analyse. Pour la macro-méthode, le volume de sang utilisé est de 1500 μ l. Ainsi, chaque échantillon sanguin est stimulé avec 1/ 100 μ l de tuberculines aviaires (PPDA=A) et bovines (PPDB=B) du kit Bovigam[®] (PPD Csl), 2/ 100 μ l de deux immunogènes spécifiques du bacille, les peptides recombinants ESAT6 et CFP10 (en individuel et / ou en mélange (Mix)), 3/ 100 μ l d'un témoin d'immuno-compétence (témoin positif de la culture cellulaire), le PWM (*PokeWeed Mitogen*) (seulement pour la campagne de prophylaxie 2007-2008) et 4/ 100 μ l d'un témoin négatif de la stimulation cellulaire (N), le tampon PBS (*Phosphate Buffer Saline*).

Ensuite, le dosage d'IFN γ par la méthode immuno-enzymatique (EIA) en sandwich est réalisée pour chaque plasma surnageant (notice du kit Bovigam[®]). Des témoins négatifs (TN) et positifs (TP) de l'EIA ainsi qu'un traceur (contrôle externe au kit de concentration et de valeur connues) sont ajoutés.

1.1.2. Micro-méthode

La différence entre macro- et micro-méthode se situe au niveau de la stimulation cellulaire qui pour la micro-

méthode, est réalisée en double et ses volumes sont réduits. En effet, seuls 250 μ l de sang sont incubés avec 25 μ l de stimulant. Macro- et micro-méthodes donnent des résultats similaires (Schiller I., communication personnelle). Les peptides recombinants (R) sont systématiquement employés en individuel et mélange.

1.1.3. Interprétation des résultats

La méthode de validation de l'analyse par les différents témoins (sauf le PWM) est indiquée dans la notice Bovigam[®]. Pour l'interprétation des résultats, un mode de calcul et un seuil de positivité sont également décrits par le fabricant : $DO_B - DO_A > 0,10$. Pour les peptides recombinants, la valeur est : $DO_R - DO_N > 0,10$. Pour le PWM, la valeur retenue est $DO_{PWM} - DO_N > 0,40$ (seuil défini suite à des essais réalisés préalablement).

Le mode de calcul décrit dans le kit Bovigam[®] ne prend pas en compte les absorbances des témoins (TP et TN), et donc les variations d'absorbance dues aux conditions l'analyse (prévu dans la norme NF U 47-019).

Nous avons donc utilisé un calcul tenant compte des valeurs de DO obtenues pour les TP et TN par plaque d'analyse dans le résultat final (tableau 1). Les *cut off* ont également été redéfinis afin d'obtenir des valeurs correspondant aux seuils de 0,10 et de 0,04 (seuil étudié par Buddle B. *et al.* (2001)). En effet, nous savons que théoriquement $DO_B - DO_A = 0,10$ (seuil haut) ou $DO_B - DO_A = 0,04$ (seuil bas) et la médiane $DO_{TP} - DO_{TN} = 2,40$ dans nos deux études.

Ainsi, $(DO_B - DO_A) / (DO_{TP} - DO_{TN}) = 0,10 / 2,40 = 0,04$. Les seuils pour ce nouveau mode de calcul sont donc de 0,04 (seuil haut) et de 0,02 (seuil bas). Il est intéressant d'étudier les résultats de l'utilisation de ce dernier en parallèle avec les tests tuberculiques pour les cheptels à risque.

Tableau 1 : différents types de résultats obtenus avec les PPD et avec les R en utilisant le calcul normalisé au seuil 0,04.

Résultat		Expression du résultat (de DO)
PPD	POSITIF	$(DO_B - DO_A) / (DO_{TP} - DO_{TN}) > 0,04$
	NEGATIF	$(DO_B - DO_A) / (DO_{TP} - DO_{TN}) \leq 0,04$
R	POSITIF	$(DO_R - DO_N) / (DO_{TP} - DO_{TN}) > 0,04$
	NEGATIF	$(DO_R - DO_N) / (DO_{TP} - DO_{TN}) \leq 0,04$

Le résultat final du test est exprimé en tenant compte des résultats obtenus en PPD et en R (tableau 2).

Tableau 2 : différents types de résultat final (PPD \cap R (résultat en PPD et résultat en R)) du test IFN γ .

Résultat PPD	Résultat R	Résultat final du test (PPD \cap R)
POSITIF	POSITIF	POSITIF
NEGATIF	NEGATIF	NEGATIF
POSITIF	NEGATIF	DIVERGENT
NEGATIF	POSITIF	

1.2. CRITERES DE SENSIBILITE ET SPECIFICITE RELATIVES DU TEST IFN γ

1.2.1. Critères de sensibilité relative

La population cible du test IFN γ est constituée de bovins provenant de cheptels confirmés infectés de TB d'une zone en Dordogne. Les cinquante-neuf bovins (issus de vingt-sept cheptels) sélectionnés dans l'étude ont eu un résultat non négatif (non neg) en IDC selon les critères définis par Gormley E. *et al.* (2005). Notre étude concerne donc la sensibilité du test IFN γ conditionnelle à l'IDC non neg. Une IDS a également été effectuée pour ces bovins. Pour cette étude, nous avons utilisé la macro-méthode (paragraphe 1.1.1)

1.2.2. Critères de spécificité relative

Vingt cheptels provenant d'une zone en Dordogne indemne de TB à ce jour (toutes les prophylaxies négatives (notamment l'IDS) et aucun foyer déclaré depuis plusieurs années) ont été sélectionnés, soit cinq cents bovins. Pour cette étude, nous avons utilisé la micro-méthode (paragraphe 1.1.2.)

2. RESULTATS

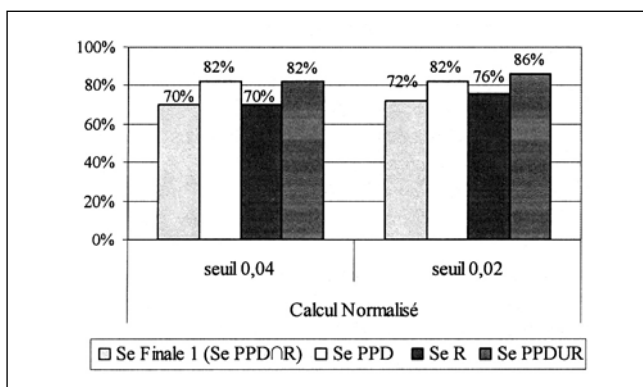
2.1. SENSIBILITE RELATIVE

Pour neuf animaux, la DO correspondant à la réponse à A était élevée (>1,7 unité DO) en même temps que celle de B et avec une différence de DO entre B et A comprise entre -0,50 et 0,1. Dans ce cas, l'application du calcul $(DO_B - DO_A) / (DO_{TP} - DO_{TN})$ risque au final de rendre négatif ou divergent un prélèvement provenant d'un animal infecté. En effet, cinq animaux sur neuf ont été considérés infectés* après abattage (*au minimum des lésions évocatrices de tuberculose découvertes à l'abattoir ou un résultat positif en culture ou en histologie ou en PCR). De plus, ils ont tous une IDS non négative.

Il convient donc dans ce cas particulier de se baser sur la seule valeur de DO obtenue avec les peptides recombinants. Ainsi, cinquante bovins seulement, provenant de vingt-cinq cheptels, ont pu être retenus pour estimer la valeur de sensibilité relative (à l'IDC non neg) du test IFN γ (Se finale 1 (sensibilité finale ou pourcentage de résultats positifs en PPD et R, $PPD \cap R$)) actuellement utilisé en Dordogne.

Parmi ces cinquante animaux avec un résultat non négatif en IDC, seuls quarante-trois ont eu une réaction non négative à l'IDS (soit 86 %). De même, dix-neuf des cinquante bovins (soit seulement 38 %) ont été considérés infectés* après abattage. Dix-huit sur dix-neuf ont eu un résultat positif en IFN γ et un seul a eu un résultat divergent. De plus, dix-sept animaux ont eu une réaction non négative à l'IDS.

Figure 1 : histogramme représentatif en pourcentage des sensibilités individuelles des PPD (Se PPD) et R (Se R) et de la sensibilité relative du test (Se finale 1 (Se $PPD \cap R$)) et de Se PPDUR pour le mode de calcul normalisé aux seuils 0,04 et 0,02 sur cinquante animaux avec une IDC non négative.



Les résultats obtenus (figure 1) montrent que la sensibilité individuelle des PPD (Se PPD, pourcentage de résultats positifs en PPD) est plus élevée que celle des peptides recombinants (Se R, pourcentage de résultats positifs en R) et que la sensibilité relative du test (Se finale 1).

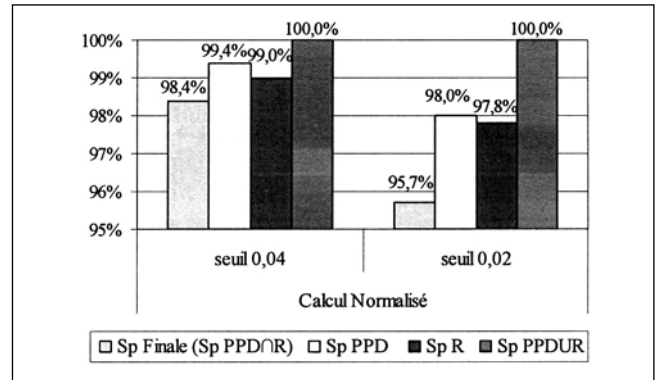
De plus, si on tenait compte du pourcentage de résultats positifs obtenus avec les PPD ou R (Se PPDUR), la sensibilité relative du test augmenterait (ex, au seuil 0,04, Se finale 1 de 70 % < Se PPDUR de 82 %, figure 1).

Par ailleurs, les diverses sensibilités étudiées (Se PPDUR, Se PPD, Se R, et Se finale 1) sont meilleures pour le seuil bas (ex, Se finale 1 de 70 % à 0,04 et de 72 % à 0,02, figure 1).

2.2. SPECIFICITE RELATIVE

En raison de résultats non validés lors de l'analyse IFN γ (manque de plasma, PWM invalide, ...), le nombre total d'animaux retenu a été réduit à quatre cent quatre-vingt-deux animaux.

Figure 2 : histogramme représentatif en pourcentage des spécificités individuelles des PPD (Sp PPD) et R (Sp R) et de la spécificité relative du test (Sp finale (Sp $PPD \cap R$)) ainsi que de Sp PPDUR pour le mode de calcul normalisé aux seuils 0,04 et 0,02 sur 492 animaux.



La figure 2 montre que la spécificité des PPD (Sp PPD (pourcentage de résultats négatifs en PPD)) est de 99,4 % pour le seuil haut et de 98,0 % pour le seuil bas. La spécificité relative du test ou spécificité finale (Sp finale : pourcentage de résultats négatifs en PPD et R) est de 98,4 % au seuil 0,04 et de 95,7 % au seuil 0,02.

Si l'on compare les seuils, les spécificités individuelles (Sp PPD et Sp R (pourcentage de résultats négatifs en R)) et la spécificité finale sont meilleures au seuil haut (figure 2).

Par ailleurs, le pourcentage de résultats négatifs obtenu avec les PPD ou R est plus élevé (Sp PPDUR de 100 %). Donc, comme il a été déjà démontré dans des travaux antérieurs, l'utilisation des peptides recombinants améliore nettement la spécificité finale du test Bovigam® (Van Pinxteren L. A. *et al.*, 2000 ; Vordermeier H. M. et Ewer K., 2006).

2.3. MISE EN COMMUN DES DEUX ETUDES

La spécificité relative du test Bovigam® (PPD avec R inclus) actuellement utilisé en Dordogne est estimée entre 95,7 % et 98,4 % (Sp finale) alors que sa sensibilité relative étudiée à partir de cinquante animaux avec une IDC non négative (Se finale 1) est comprise entre 70 % et 72 % (tableau 3).

Tableau 3 : sensibilités relatives (Se finales) et spécificité relative (Sp finale) du test IFN γ obtenues dans nos études.

Seuil :	0,04	0,02
Se finale 1 (à partir de 50 animaux avec IDC non neg) :	70 %	72 %
Se finale 2 (à partir de 32 animaux avec IDC pos) :	91 %	91 %
Se finale 3 (à partir de 43 animaux avec IDC et IDS non neg) :	77 %	79 %
Sp finale (à partir de 492 animaux) :	98,4 %	95,7 %

Néanmoins, parmi les cinquante animaux de l'étude de sensibilité (Se finale 1), si seulement les quarante-trois animaux avec des IDS et IDC non négatives sont étudiés, la sensibilité du test IFN γ augmente (Se finale 3 : 77 % – 79 %, tableau 3).

De plus, pour l'étude de la sensibilité, trente deux des cinquante animaux (soit 64 %) ont eu une IDC positive (réaction positive à la tuberculine bovine supérieure de 4 mm à celle à la tuberculine aviaire) (Gormley E. *et al.*, 2005). Dans ce cas, la sensibilité individuelle des PPD passe alors à 100 %, celle des R à 91 % et la sensibilité du test IFN γ augmente nettement (Se finale 2 : 91 %, tableau 3). Ainsi, tous les animaux ayant des IDC positives sont également détectés positifs avec le test IFN γ utilisant les PPD seulement. Une augmentation du pourcentage de bovins considérés infectés* après abattage (dix-huit sur trente-deux animaux soit 56 %) est également remarquée.

3. DISCUSSION

Dans notre étude, la spécificité relative du test IFN γ (Sp finale) est estimée entre 95,7 % et 98,4 % alors que celle publiée par Wood P.R. *et al.* (1991) est de 98,1 % pour un seuil élevé, et par Lauzy S. *et al.* (2001) varie de 88,8 % à 93,5 %.

La sensibilité relative du test IFN γ étudié (Se finale 1) est comprise entre 70 % et 72 %.

Par ailleurs, les valeurs estimées de sensibilité et de spécificité obtenues avec le mode de calcul du fabricant aux deux seuils (résultats non présentés dans ce texte) sont respectivement quasi identiques avec celles obtenues avec le calcul normalisé. Cependant, comme ce dernier permet d'intégrer une correction des fluctuations liées aux conditions de l'analyse, il est donc le plus intéressant.

La comparaison des deux seuils montre que la spécificité finale est meilleure au seuil 0,04 (Sp finale de 98,4 %) alors que la sensibilité finale est optimale au seuil 0,02 (Se finale 1 de 72 %). Ainsi, au seuil haut, le gain en spécificité est de +2,7 % tandis que la perte en sensibilité est de -2 %. Le seuil 0,04 pourrait donc être le plus adapté. Néanmoins, cette comparaison de variations n'est pas significative car l'étude de la spécificité concerne un nombre d'échantillons (quatre cent quatre-vingt douze animaux) nettement plus important (onze fois plus) que pour la sensibilité (quarante-trois animaux). Il conviendrait d'établir la courbe ROC pour déterminer les meilleures valeurs de sensibilité et spécificité relatives.

L'interprétation du test pourrait, cependant, être différente selon le cas rencontré. D'une part, dans le cas d'un cheptel susceptible d'être infecté par *M. bovis* (introduction, voisinage, résurgence), la sensibilité serait privilégiée par rapport à la spécificité. Le seuil 0,02 serait le plus adapté pour l'interprétation du calcul. En revanche, le seuil 0,04 permettrait de privilégier la spécificité du test en gardant une sensibilité satisfaisante.

Une étude antérieure de sensibilité conditionnelle du test, réalisée par le LDAR24 à partir de la même population cible mais de vingt deux bovins choisis selon le critère, animaux considérés infectés* après abattage, a donné une sensibilité relative de 91 % à 95 % pour le calcul normalisé. 77 % des

animaux ont eu une réaction non négative à l'IDS et 91 % à l'IDC (résultat identiques à Costello E. *et al.*, 1997). En 2001, Wood P.R. *et al.* ont obtenu une sensibilité du test IFN γ à 88 % et de l'IDS à 75 % en Espagne. Au final, les différentes sensibilités de l'IFN γ obtenues par Wood P.R. *et al.* en 2001 varient de 81,8 % à 100 %. Bien que notre étude soit basée sur un faible effectif (vingt-deux animaux), elle montre que le test IFN γ est plus sensible que l'IDC avec le calcul normalisé (Wood P.R. *et al.*, 1991 et 2001 ; Coad M. *et al.*, 2008). Néanmoins, il conviendrait de confirmer ceci par des observations complémentaires.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Pour la validation du mode opératoire, il serait intéressant d'interpréter le résultat du test IFN γ en tenant compte des PPD et R, de retenir le mode de calcul normalisé et d'utiliser des seuils de positivité différents, en fonction des zones ou des situations épidémiologiques rencontrées.

Ainsi, la sensibilité relative à l'IDC non négative du test IFN γ étudié est estimée entre 70 % et 72 % et la spécificité relative à l'IDS est évaluée entre 95,7 % et 98,4 %. Cependant, ces premiers résultats sont simplement indicatifs. Il est nécessaire de poursuivre ces études en prenant des effectifs plus grands afin que les résultats soient statistiquement fiables.

Par ailleurs, certains cas particuliers peuvent nécessiter une interprétation différente. En effet, lorsque la DO correspondant à la réponse à A est supérieure à 1,5 unité de DO et avec une différence de DO entre B et A comprise entre -0,5 et 0,1, il convient donc de se baser sur la seule valeur de DO associée aux Ag recombinants. Ceci serait à confirmer par l'étude d'un échantillonnage plus grand.

Enfin, depuis 2006, l'utilisation du test IFN γ en Dordogne a permis de retrouver un taux satisfaisant de déclaration des IDS non négatives et de participer à la détection de nouveaux foyers en raison de la requalification rapide des cheptels suspendus.

Les auteurs remercient les sociétés Prionics et Statens Serum Institut pour leurs contributions.

- Buddle B.M., Ryan T.J., Pollock J.M., Andersen P. and Lisle G.W., 2001.** *Veterinary Microbiology*, 80, 37-46
- Coad M., Downs S.H., Durr P.A., Clifton-Hadley R.S., Hewinson R.G., Vordermeier H.M. et Whelan A.O., 2008.** *The Veterinary Record*, 162, 382-384
- Costello E., Egan J.W.A., Quigley F.C. et O'Reilly P.F., 1997.** *The Veterinary Record*, 141, 222-224
- Gormley E., Doyle M. B., Fitzsimons T., McGill K. et Collins J.D., 2005.** *Veterinary Microbiology*, 112, 171-179
- Lauzy S., Pasotto D., Amadori M., Archetti I.L., Poli G. et Bonizzi L., 2000.** *The Veterinary Journal*, 160, 17-24
- Van Pinxteren L.A.H., Ravn P., Agger E.M., Pollock J. and Andersen P., 2000.** *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7, 155-160
- Vordermeier H.M. et Ewer K., 2006.** *Veterinary. Defra*
- Wood P.R., Corner L.A., Rothel J.S., Baldock C., Jones S.L., Cousins D.B., McCormick B.S., Francis B.R., Creeper J. and Twedde N.E., 1991.** *Aust Vet J*, 68, 286-290
- Wood P.R. et Jones S.L., 2001.** *Tuberculosis*, 81, 144-1