



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints> ID : 12207

To cite this version :

Buysse, Marie. *Evaluation de la PCR en temps réel pour la détection des troupeaux et des animaux infectés par Mycoplasma agalactiae*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2014, 56 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

EVALUATION DE LA PCR EN TEMPS REEL POUR LA DETECTION DES TROUPEAUX ET DES ANIMAUX INFECTES PAR MYCOPLASMA AGALACTIAE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

BUYSSE Marie

Née, le 4 juin 1989 à ROUBAIX (59)

Directeur de thèse : M. Dominique BERGONIER

JURY

PRESIDENT :

M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Dominique BERGONIER

M. Xavier BERTHELOT

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

REMERCIEMENTS

A notre Président de Jury,

Monsieur le Professeur C. Pasquier

Professeur de virologie à l'Université Paul Sabatier

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

Nous vous prions d'accepter nos hommages respectueux

A notre jury de thèse,

Monsieur le Professeur Xavier Berthelot

Professeur à l'Ecole nationale vétérinaire de Toulouse (Pathologie de la reproduction)

Qui nous a fait l'honneur de faire partie du jury de thèse,

Nous vous adressons notre plus sincère reconnaissance

A Monsieur le Docteur Dominique Bergonier

Maître de conférences à l'Ecole nationale vétérinaire de Toulouse (Pathologie de la reproduction)

Qui nous a fait participer à ces protocoles et nous a fait l'honneur d'accepter la direction de cette thèse,

Veillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements.

Au Groupement de Défense Sanitaire des Pyrénées Atlantiques, en particulier **Monsieur Julien Garrot, Madame Julie Blaziot et Madame Séverine Castet**, ainsi que toutes les autres personnes que j'ai rencontrées, pour avoir accepté ma participation à ce protocole, m'avoir fourni les informations nécessaires à la rédaction de ma thèse et m'avoir tant appris sur l'Agalactie contagieuse.

Au Laboratoire des Pyrénées, en particulier à **Monsieur Stéphane Perennes**, qui a rendu possible l'utilisation des résultats d'analyses.

A Monsieur le Docteur Pascal Lebret, pour son travail et ses explications, sans lesquelles la rédaction de cette thèse aurait été beaucoup plus compliquée.

A tous les éleveurs, qui m'ont chaleureusement accueillie dans leur élevage, malgré le temps demandé pour les manipulations.

A ma petite maman, qui m'a soutenue tout au long de ce merveilleux parcours et a su trouver les mots qui m'ont amenée au bout de mon projet,

A mon père, qui reste présent chaque instant au fond de mon cœur,

A Papi et Mamie, qui m'ont plongée dès petite dans les veaux et m'ont transmis l'amour des bêtes,

A tout le reste de la famille, sans le soutien de qui, je n'aurai jamais pu arriver où je suis maintenant, et je n'aurais jamais « mis ma main dans le cul d'une vache »

A Fermat, deux années merveilleuses au cours desquelles j'ai rencontré des personnes exceptionnelles que je ne pourrais jamais oublier, et que j'espère continuer à voir malgré des chemins différents,

A tous mes amis du tournoi de l'Adour, qui m'ont poussée à donner le meilleur de moi et ont fait de mes étés de véritables moments de bonheur et de décompression

A tous ceux que j'ai pu croiser à l'école, que ça soit par les soirées, les clubs ou via Gaiza, merci d'avoir partagé ce bout de chemin avec moi,

A tous mes anciens maîtres de stage, en particulier de la clinique vétérinaire d'Hasparren, qui m'ont tant appris et ont su me transmettre cet amour du métier,

Aux meutes 1° Bauzelle et 1° Grand Selve, sans qui cette année n'aurait jamais eu autant de valeur, et qui m'ont rappelé ce qui compte réellement,

INTRODUCTION	9
I. MATERIELS ET METHODES	10
I.1: CONTRIBUTION A L'ÉVALUATION DE LA PCR EN TEMPS REEL APPLIQUEE AU LAIT DE TANK	10
A. SELECTION DES ELEVAGES	10
B. REALISATION DES PRELEVEMENTS EN ELEVAGE	10
C. ANALYSE DES LAITS (LABORATOIRE DES PYRENEES ET DES LANDES)	11
1. <i>Echantillons réalisés</i>	11
2. <i>Inclusion des laits</i>	11
3. <i>PCR en temps réel</i>	11
4. <i>Méthodes statistiques</i>	12
I.2: UTILISATION DE LA PCR EN TEMPS REEL POUR LA REFORME CIBLEE	12
A. SELECTION DES ELEVAGES	12
B. EXAMENS ET PRELEVEMENTS REALISES DANS LES ELEVAGES	13
1. <i>Examens cliniques</i>	13
2. <i>Prélèvements</i>	13
3. <i>Suivi des troupeaux au cours de la campagne 2013</i>	14
4. <i>Mesures de biosécurité</i>	14
C. PRINCIPES DE REFORME ET DE SUIVI	14
D. TECHNIQUES ANALYTIQUES	15
1. <i>PCR en temps réel sur le lait</i>	15
2. <i>Trousses Elisa utilisées sur le sang</i>	15
II. RESULTATS.....	17
II.1. CONTRIBUTION A LA VALIDATION DE LA PCR EN TEMPS REEL SUR LE LAIT DE TANK	17
A. REPRESENTATION GRAPHIQUE DE LA VARIABILITE OBTENUE	17
1. <i>Ensemble des valeurs</i>	17
2. <i>Variabilité de l'échantillon de surface « S »</i>	18
3. <i>Variabilité de l'échantillon au fond du tank « F »</i>	18
4. <i>Echantillons de tank</i>	19
B. REPETABILITE ET REPRODUCTIBILITE : EXEMPLE	19
C. REPETABILITE ET REPRODUCTIBILITE : ENSEMBLE DES VALEURS	21
1. <i>Répétabilité et reproductibilité de premier ordre (R1)</i>	21
2. <i>Reproductibilités de deuxième et troisième ordres (R2 et R3)</i>	22
D. VALEURS PAR FRACTION	23
II.2. UTILISATION DE LA PCR EN TEMPS REEL POUR LA REFORME CIBLEE	25
A. SYMPTOMATOLOGIE	25
B. RESULTATS DES PCR SUR LAITS DE TANK	25
C. RESULTATS DES PCR SUR PRELEVEMENTS INDIVIDUELS DE LAIT	26
1. <i>Résultats globaux</i>	26
2. <i>Cheptel n° 1</i>	26
3. <i>Cheptel n° 2</i>	27
4. <i>Cheptel n° 3</i>	27
5. <i>Cheptel n° 4</i>	28
6. <i>Cheptel n° 5</i>	28
D. RESULTATS DES SEROLOGIES	29
1. <i>Trousse Elisa P48 (Idexx)</i>	29
2. <i>Trousse Elisa à antigène total (LSI)</i>	32
E. COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS EN PCR ET EN SEROLOGIE	35
F. REFORMES DES BREBIS	35
G. SUIVI DES TROUPEAUX SUR LA CAMPAGNE 2013-2014	35
III. DISCUSSION	36

III.1. CONTEXTE SPECIFIQUE DE L'AGALACTIE CONTAGIEUSE DANS LES PYRENEES-ATLANTIQUES	36
A. NECESSITE D'ASSAINIR LA SITUATION DANS LES PYRENEES-ATLANTIQUES.....	36
1. <i>Une région touchée par l'Agalactie Contagieuse</i>	36
2. <i>Un impact économique et zootechnique important</i>	36
B. INTRODUCTION DE LA PCR EN TEMPS REEL.	37
III.2. CONTRIBUTION A L'EVALUATION DE LA PCR EN TEMPS REEL APPLIQUEE AU LAIT DE TANK.....	37
A. EN ELEVAGES, UN PROTOCOLE SIMPLE POUR UNE ETUDE PRELIMINAIRE	37
B. AU LABORATOIRE, UNE ETUDE COMBINEE DE LA REPETABILITE ET DE LA REPRODUCTIBILITE	38
C. INTEGRER LA VARIABILITE DES RESULTATS OBTENUS POUR AMELIORER LA SENSIBILITE DE LA DETECTION	38
III.3. UTILISATION DE LA PCR EN TEMPS REEL ET DE LA SEROLOGIE POUR LA REFORME CIBLEE	40
A. PERTINENCE DE L'UTILISATION DE LA PCR EN TEMPS REEL	40
1. <i>Analyses de lait pour détecter les excrétrices</i>	40
2. <i>Une surveillance sur le lait de tank au cours de la campagne 2012-2013</i>	40
3. <i>La surveillance sur le lait de tank au cours de la campagne 2013-2014</i>	40
4. <i>Analyses individuelles de lait</i>	41
B. TESTS SEROLOGIQUES ET SEUILS	41
1. <i>Concordances des tests sérologiques et seuils utilisés</i>	41
2. <i>Pertinence de la sérologie dans le protocole</i>	42
3. <i>Résultats avec la trousse Idexx</i>	43
4. <i>Résultats avec la trousse LSI</i>	43
C. ELIMINATION DES BREBIS EXCRETRICES.....	43
D. BREBIS PRESENTANT DES SIGNES DE MAMMITES CHRONIQUES.	43
E. ELIMINATION DES BREBIS PRESENTANT UN RESULTAT DE SEROLOGIE POSITIF.....	44
F. CAUSES POSSIBLES D'ECHEC DU PROTOCOLE.....	44
1. <i>Insuffisance de sensibilité et entretien de l'excrétion : rôle des brebis infectées chroniquement</i>	45
2. <i>Rôle des autres animaux et de la faune sauvage</i>	45
3. <i>Recontamination du cheptel</i>	45
G. PERTINENCE D'UN PROTOCOLE D'ASSAINISSEMENT PAR ABATTAGE PARTIEL.....	46
1. <i>Un abattage total du troupeau difficile en région enzootique</i>	46
2. <i>Un ciblage essentiel des animaux excréteurs pour diminuer la prévalence</i>	46
CONCLUSION	48
BIBLIOGRAPHIE	49
ANNEXES	52

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Résultats de l'ensemble des répétitions de PCR (en équivalents UFC/ml) par élevage (1 à 14) en fonction de la profondeur de prélèvement (échelle logarithmique).	17
Figure 2 : Moyennes obtenues entre les deux reproductions, en surface et au fond, pour chaque élevage, de l'échantillon « S » (4 valeurs par élevage).	18
Figure 3 : Moyennes obtenues entre les deux reproductions en surface et au fond, pour chaque élevage, de l'échantillon « F » (4 valeurs par élevage).	18
Figure 4 : Comparaison des moyennes des échantillons prélevés en surface et au fond du tank (8 résultats par élevage).	19
Figure 5 : Représentation des résultats de calcul de la répétabilité et des reproductibilités obtenus suite aux estimations de variances par l'ANOVA à un facteur. Les coefficients de variation présentés en gras correspondent à la racine carrée de la moyenne des carrés divisée par la moyenne des valeurs (après transformation logarithmique).	20
Figure 6 : Moyennes de répétabilité et de reproductibilité de premier ordre (variations liées à l'échantillonnage des laits reçus au laboratoire) pour les élevages retenus.	21
Figure 7 : Répétabilité et reproductibilités pour les élevages retenus.	22
Figure 8 : Répétabilité et reproductibilités pour les élevages retenus (ensemble des valeurs).	23
Figure 9 : Moyennes de quantification (après transformation logarithmique des équivalents UFC/ml) pour les élevages en fonction du mode d'échantillonnage.	24
Figure 10 : Moyennes de quantification (UFC/ml) pour les 10 élevages en fonction du mode d'échantillonnage.	24
Figure 11 : Résultats des PCR sur lait de tank des 5 élevages (campagne 2013).	25
Figure 12 : Répartition des brebis excrétrices (n=5) du cheptel n° 1 par millésime.	26
Figure 13 : Répartition des brebis excrétrices (n=3) du cheptel n° 2 par millésime.	27
Figure 14 : Répartition des brebis excrétrices (n=16) du cheptel n° 3 par millésime.	27
Figure 15 : Répartition des brebis excrétrices (n=14) du cheptel n° 5 par millésime.	28
Figure 16 : Répartition des brebis excrétrices (n=35) des élevages 1, 2, 3, 5 selon leur millésime de naissance par rapport à l'année de déclaration d'Agalactie Contagieuse.	28
Figure 17 : Répartition par millésime des animaux séropositifs dans l'élevage n°1 (Elisa Idexx).	29
Figure 18 : Répartition par millésime des animaux séropositifs dans l'élevage n°2 (Elisa Idexx).	30
Figure 19 : Répartition millésime d'âge des animaux séropositifs dans l'élevage n°3 (Elisa Idexx).	30
Figure 20 : Répartition par millésime des animaux séropositifs dans l'élevage n°5 (Elisa Idexx).	31
Figure 21 : Répartition des animaux séropositifs (n = 38), selon leur âge, par rapport à l'année de déclaration d'Agalactie Contagieuse (élevages 1, 2, 3 et 5).	31
Figure 22 : Répartition par millésime des animaux séropositifs et douteux dans l'élevage 1 (Elisa LSI).	32
Figure 23 : Répartition par millésime des animaux séropositifs et douteux dans l'élevage 2 (Elisa LSI).	33
Figure 24 : Répartition par millésime des animaux séropositifs et douteux dans l'élevage 3 (Elisa LSI).	33
Figure 25 : Répartition par millésime des animaux séropositifs et douteux dans l'élevage 5 (Elisa LSI).	34
Figure 26 : Pourcentages d'ovins séropositifs et de brebis PCR-positives (Idexx) pour les cinq troupeaux (les brebis PCR-positives, réformées, n'ont pas fait l'objet de sérologie).	35
Figure 27 : Nombre d'animaux n'ayant pas eu de test avec la trousse LSI ou séropositifs en LSI et négatifs en Idexx, selon les élevages.	35
Figure 28 : Evolution de l'incidence annuelle et de la prévalence de l'Agalactie Contagieuse dans les Pyrénées-Atlantiques (GDS 64).	36
Figure 29 : Répartition des brebis excrétrices, par âge du cheptel n°1.	52
Figure 30 : Répartition des brebis excrétrices, par âge du cheptel n°2.	52
Figure 31 : Répartition des brebis excrétrices, par âge du cheptel n°3.	52

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques des élevages et des tanks prélevés.....	10
Tableau 2 : Récapitulatif des élevages participant au protocole.....	13
Tableau 3 : Trousses ELISA utilisées.....	16
Tableau 4 : Ensemble des coefficients de variation obtenus pour les 10 tanks retenus.	21
Tableau 5 : Répartition des brebis en fonction des symptômes mammaires observés et des résultats de PCR individuelles.	25
Tableau 6 : Résultats des PCR individuelles dans les cinq élevages.	26
Tableau 7 : Résultats des sérologies Idexx dans les cinq élevages.	29
Tableau 8 : Résultats des sérologies LSI dans les cinq élevages.	32
Tableau 9 : Répartition des brebis excrétrices, par âge du cheptel n°5.	53
Tableau 10 : Répartition des animaux positifs avec le kit Idexx, par classe d'âge dans le cheptel n°1.	53
Tableau 11 : Répartition des animaux positifs avec le kit Idexx, par classe d'âge dans le cheptel n°2.	53
Tableau 12 : Répartition des animaux positifs avec le kit Idexx, par classe d'âge dans le cheptel n°3.	54
Tableau 13 : Répartition des animaux positifs avec le kit Idexx, par classe d'âge dans le cheptel n°5.	54
Tableau 14 : Répartition des animaux positifs et douteux avec le kit LSI par classe d'âge du cheptel 1.....	54
Tableau 15 : Répartition des animaux positifs et douteux avec le kit LSI par classe d'âge du cheptel 2.....	55
Tableau 16 : Répartition des animaux positifs et douteux avec le kit LSI par classe d'âge du cheptel 3.....	55
Tableau 17 : Répartition des animaux positifs et douteux avec le kit LSI par classe d'âge du cheptel 5.....	56

INTRODUCTION

L'Agalactie Contagieuse est une maladie touchant les petits ruminants. Elle est due à plusieurs espèces de mycoplasmes : *Mycoplasma agalactiae*, principal agent chez les ovins, *Mycoplasma mycoides capri*, *Mycoplasma capricolum capricolum* voire, plus rarement, *Mycoplasma putrefaciens* chez les caprins. L'Agalactie Contagieuse est un syndrome caractérisé cliniquement par des signes mammaires (mammites entraînant une hypo- voire une agalactie), des signes oculaires (kératite et conjonctivite) et des signes articulaires (arthrite des carpes en particulier). D'autres symptômes plus rares peuvent être associés à l'Agalactie, tels que des broncho-pneumonies, des septicémies sur les jeunes ou encore des avortements (BERGONIER *et al.*, 2008).

Les animaux malades excrètent l'agent infectieux principalement dans le lait, mais aussi dans les sécrétions oculaires, respiratoires, voire fécales ou génitales. Dans les troupeaux ovins, on observe des taux d'atteinte (morbidité, mortalité) moindres que dans les troupeaux caprins ; un grand nombre d'animaux peuvent devenir des porteurs chroniques, plus ou moins asymptomatiques, après l'épisode clinique. L'excrétion mycoplasmaïque contamine alors fréquemment les congénères, jeunes ou adultes, principalement par voie galactophore (lors de la tétée pour les premiers et lors de la traite pour les brebis en lactation). Ce sont donc ces animaux qui entretiennent de façon insidieuse l'infection dans le troupeau (BERGONIER *et al.*, 2008).

De par sa grande contagiosité et le fait qu'elle entraîne de fréquentes et parfois intenses hypogalacties, régulièrement associées à d'autres symptômes en particulier chez les caprins, cette mycoplasmosse a de fortes conséquences économiques dans les cheptels, en particulier laitiers.

Au Pays basque, les premières traces écrites au sujet de l'Agalactie remontent à un peu plus de 100 ans. (TICOULET, 2001) Dans cette zone où se trouvent de très nombreux cheptels ovins, les pâtures sont souvent communes (transhumance,...), ou « entrecroisées » (mise en pension, accès aux parcelles éloignées,...). On peut parler de « zones d'élevage communautaire ». Ceci permet d'expliquer en partie la progression de la maladie.

Une prophylaxie sanitaire a été progressivement mise en place à la fin des années 1980 et n'a cessé de s'étoffer et d'évoluer depuis. Elle s'appuie en particulier sur la déclaration obligatoire des cas cliniques, le dépistage systématique et réitéré des troupeaux infectés, la gestion raisonnée des mouvements d'animaux,... L'arrêté préfectoral qui l'encadre interdit aux troupeaux infectés de transhumer. Historiquement, l'abattage total du troupeau était recommandé et appliqué, mais face aux réticences de certains éleveurs et aux enjeux génétiques ou économiques, d'autres solutions ont dûes être trouvées. C'est pourquoi le Groupement de Défense Sanitaire des Pyrénées-Atlantiques (GDS 64) a décidé de mettre en place un protocole d'évaluation de l'assainissement des troupeaux infectés par abattage partiel. La forte prévalence actuelle, qui s'oppose à une incidence devenue quasi-nulle, est en effet aujourd'hui la principale problématique qui se pose au gestionnaire de ce programme de lutte.

Le GDS64 et le laboratoire des Pyrénées et des Landes utilisent pour cette prophylaxie réglementée, et ont utilisé pour la présente étude, deux outils analytiques : une PCR en temps réel spécifique de *M. agalactiae*, outil devenu le pilier du programme de lutte, et de la sérologie ELISA.

Dans ce contexte, les objectifs de notre travail ont été les suivants :

- évaluation de la PCR en temps réel appliquée au lait de tank : estimation de la répétabilité et de la reproductibilité de la quantification sur grands volumes
- utilisation de la PCR en temps réel sur les laits de tank et individuels : évaluation de l'assainissement des cheptels infectés chroniquement par abattage ciblé des brebis positives vis-à-vis de *M. agalactiae*.

I. MATERIELS ET METHODES

I.1: CONTRIBUTION A L'EVALUATION DE LA PCR EN TEMPS REEL APPLIQUEE AU LAIT DE TANK

A. SELECTION DES ELEVAGES

Pour réaliser cette étude, il était nécessaire d'avoir des laits positifs vis-à-vis de *Mycoplasma agalactiae*. Les élevages ont été sélectionnés dans les Pyrénées-Atlantiques, parmi les cheptels connus infectés, selon les résultats de PCR de la campagne en cours. Les positivités récentes (nouvelle déclaration clinique, nouvelle positivité en PCR sans clinique, rechute,...) et/ou les titres élevés (CT faibles) ont été privilégiés afin de limiter le risque de pré-sélection de laits de tank devenus bactériologiquement négatifs le jour du prélèvement. La liste de ces élevages récemment positifs en PCR nous a été fournie par le GDS 64 (tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques des élevages et des tanks prélevés.

Elevege	Date de prélèvement	Heure de prélèvement	Nombre de traites dans le tank	Température du tank	Mélange du tank lors du prélèvement	Prélèvement au fond du tank
1	19.05.2014	10h15	1	4,5 °C	Non	Oui
2	19.05.2014	12h30	1	3,5 °C	Non	Oui
3	19.05.2014	10h35	1	3,5 °C	Oui	Oui
4	19.05.2014	11h20	1	3,5 °C	Non	Oui
5	19.05.2014	11h00	1	3,5°C	Non	Oui
6	19.05.2014	12h20	1	4,5 °C	Non	Oui
7	19.05.2014	8h50	2	9,6 °C	Oui	
8	19.05.2014	9h45	1	3,6 °C	Non	Oui
9	20.05.2014	8h45	2	5,9 °C	Oui	
10	20.05.2014	8h15	2	3,5 °C	Non	
11	20.05.2014	9h25	3	2,6 °C	Non	Non
12	20.05.2014	10h20	1	3,9 °C	Non	Oui
13	19.05.2014	14h15	3	2,9 °C	Non	Non
14	19.05.2014	14h50	1	3,9 °C	Non	Oui

B. REALISATION DES PRELEVEMENTS EN ELEVAGE

Les laits de tank ont été prélevés à l'aide de pipettes graduées stériles et d'une poire aspirante. Chaque tank a été échantillonné en surface et en profondeur, l'objectif étant de prélever tout à fait au fond du tank (dans deux cas sur quatorze, le fond n'a pu être atteint ; le prélèvement a eu lieu à la profondeur maximale permise par la pipette, soit 40 cm). Vingt-cinq millilitres ont été prélevés pour chaque échantillon. Chaque prélèvement a été identifié « S » (surface) ou « F » (fond), puis mis sur un présentoir, évitant les renversements.

Les flacons utilisés ne comportaient pas d'antibiotique actif sur les bactéries non mycoplasmiques, conformément à la nouvelle procédure mise en œuvre dans les Pyrénées-Atlantiques lors de la campagne 2014.

Les laits ont été immédiatement stockés dans une glacière avec pains de glace (et thermomètre) de façon à maintenir (et contrôler) une température comprise entre 2 et 6 °C. Ils ont été acheminés le jour-même au laboratoire des Pyrénées et des Landes (par la logistique du laboratoire le jour 1 et par nos soins le jour 2). Ainsi, l'ensemble des 14 tanks a été échantillonné en 2 jours (les 19 et 20 mai).

Au moment des prélèvements, les paramètres suivants ont été notés (tableau 1) : nombre de traites dans le tank, mouvement des pâles mélangeuses (action ou pas au moment du prélèvement), température de refroidissement affichée. Pour les tanks qui n'étaient pas en cours de mélange au moment des

prélèvements, l'intervalle de temps écoulé entre le dernier mélange et le prélèvement n'a pas pu être estimé car les éleveurs ne connaissaient pas la périodicité des mouvements des pales.

C. ANALYSE DES LAITS (LABORATOIRE DES PYRENEES ET DES LANDES)

Au laboratoire, ont été notés les dates et heures de réception (les 19 et 20 mai), les dates et heures de réalisation des fractions aliquotes et d'ensemencement en culture (respectivement les 20 et 21 mai), ainsi que les dates de repiquage et de lecture des microplaques. De même, les dates d'amplification PCR ont été consignées. Cependant, la présente thèse ne porte que sur la valorisation de ces prélèvements par la PCR, et non par les dénombrements réalisés en culture (méthode du nombre le plus probable après mise en œuvre de 5 répliques par lait). En effet, seule la PCR est utilisée au laboratoire pour les mycoplasmes.

1. Echantillons réalisés

Avant toute agitation ou mélange, chaque lait « S » et « F » a été lui-même prélevé en surface, dans la mousse (« S-S » et « F-S »), et au fond (« S-F » et « F-F »).

De plus, chacun de ces prélèvements a été réalisé deux fois ; un total de 8 échantillons a ainsi été obtenu par élevage.

2. Inclusion des laits

Le lait restant dans chaque échantillon initial a tout d'abord été analysé par PCR en temps réel afin de s'assurer de sa positivité (critère d'inclusion à partir de la pré-sélection présentée au tableau 1).

En cas de positivité, les échantillons « S-S », « S-F », « F-S » et « F-F » ont été analysés par PCR.

3. PCR en temps réel

La PCR en temps réel utilisée dans la présente étude a été développée par le laboratoire des Pyrénées et des Landes (LPL) pour une application dans le cadre du plan de lutte contre l'Agalactie. Il s'agit d'une PCR quantitative appliquée directement au lait dont les caractéristiques sont les suivantes :

- amorces : gène codant pour la sous-unité alpha de l'ADN polymérase III (*polC*), permettant une amplification spécifique de *M. agalactiae* (absence de réaction croisée avec *M. bovis* en particulier) (MARENDA MS. *Et al*, 2005) (MARENDA MS., 2005)

- PCR simplex

- PCR validée en interne par le laboratoire selon la norme NF U47-600. Les étapes suivantes de validation ont été assurées par le LPL (Laboratoire des Pyrénées et des Landes) préalablement à la présente étude (LPL, communication personnelle) :

- « inclusivité » et « exclusivité » (selon les termes de la norme NF U47-600 utilisée en santé animale) : vérification de l'amplification de divers sous-types génétiques de *M. agalactiae* et de la non amplification de mycoplasmes d'autres espèces

- sensibilité analytique : limite de détection et limite de quantification

- sensibilité et spécificité diagnostiques (par rapport à la PCR préalablement utilisée après culture et ayant recours aux amorces p30 et ARN 16S).

- seuil de positivité : Ct <40

L'utilisation d'une gamme de quantification pour chaque série de PCR a autorisé la transformation des CT (cycle thresholds) obtenus en équivalents d'UFC/ml.

Cette PCR a été utilisée :

- d'une part sur des laits (ou fractions de laits) de tank pour la quantification directe
- d'autre part pour la révélation finale des dilutions-limites après culture en microplaques dans le cadre des dénombrements de mycoplasmes revivifiables par la technique du NPP (non présenté ici).

4. Méthodes statistiques

Les quantifications obtenues par PCR ont fait l'objet d'une transformation logarithmique.

L'évaluation de la variabilité des quantifications PCR a été réalisée en calculant des variances de répétabilité et des variances de reproductibilité. La répétabilité est ici l'aptitude de la PCR à fournir la même valeur lors de plusieurs amplifications portant sur des prises d'essais issues de la même fraction d'un échantillon. La variance de répétabilité représente la variance résiduelle liée à la mise en œuvre de la technique par un même technicien un jour donnée dans le même laboratoire.

La reproductibilité est ici l'aptitude de la PCR à fournir la même valeur lorsqu'en plus de cette erreur expérimentale est intégrée la variabilité liée à l'échantillonnage d'un volume de lait : prélèvement contenu dans un tube ou dans un tank de stockage en élevage. Dans ces deux types de volumes, deux fractions ont été prélevées : surface et fond du tank ou de l'échantillon reçu au laboratoire. La variance de reproductibilité est la somme de la variance de répétabilité et de la (des) variance(s) inter-fractions.

Les différentes variances ont été exprimées par les coefficients de variation qui leur sont associés. Un coefficient de variation (CV) est égal au rapport de la racine carrée de la variance à la moyenne. Nous avons calculé les variances à l'aide d'une ANOVA à un facteur. L'ANOVA fournit la moyenne des carrés intra-groupes (répétabilité) et intergroupes (reproductibilité). Les variances étaient homogènes.

Pour la variance de reproductibilité, nous avons soustrait à la moyenne des carrés intergroupes la moyenne des carrés intra-groupes, en divisant par le nombre de répétitions.

La comparaison des séries de résultats a été réalisée à l'aide du test t de Student.

I.2: UTILISATION DE LA PCR EN TEMPS REEL POUR LA REFORME CIBLEE

A. SELECTION DES ELEVAGES

Ce protocole expérimental a été proposé et mis en œuvre par le GDS des Pyrénées-Atlantiques.

Pour ce faire, cinq élevages de ce département ont participé à l'essai.

Ils ont été sélectionnés par le GDS selon les critères suivants :

- statut « infecté » au cours de la campagne précédente (2012)
- négativité sérologique des brebis nées après l'année de déclaration d'agalactie contagieuse (prophylaxie 2012)
- moins de 10 % de l'effectif prélevé (n=50 brebis) de brebis séropositives (prophylaxie de 2012)
- absence de voisin infecté.

Un technicien du GDS s'est rendu dans les élevages concernés en décembre 2012 afin de proposer aux éleveurs présélectionnés la signature d'un consentement éclairé et, d'autre part, de réaliser l'inventaire des animaux présents.

On notera qu'aucun des cinq élevages n'était inscrit au Contrôle Laitier Officiel (CLO) ni au Contrôle Laitier Simplifié (CLS).

Tableau 2 : Récapitulatif des élevages participant au protocole.

Elevege	Nombre d'ovins (primi- et multipares)	Date de déclaration de l'Agalactie Contagieuse	Symptômes lors de la 1^{ère} PCR positive	Pourcentage de séropositivité (2012)¹	Race, rameau
1	212	Mars 2009	symptômes	6,5 %	Manech à tête rousse
2	236	Juin 2009	symptômes	6 %	Manech à tête rousse
3	355	Avril 2010	symptômes	10 %	Manech à tête rousse
4	234	Mai 2008	pas de symptômes	0 %	Manech à tête rousse
5	294	Décembre 2008	symptômes	13,3 %	Manech à tête rousse

1. Sur un échantillon de 50 brebis stratifié par millésime dans chaque élevage.

B. EXAMENS ET PRELEVEMENTS REALISES DANS LES ELEVAGES

1. Examens cliniques

Lors des interventions, les signes de mammites chroniques (indurations, abcès, déséquilibres mammaires) ont été notés, tout comme les kérato-conjonctivites et arthrites qui font partie du tableau clinique de l'agalactie contagieuse. De plus, la présence de mammites aiguës a été enregistrée.

2. Prélèvements

❖ Prélèvements de lait

Deux campagnes de prélèvements de lait ont été réalisées dans chaque élevage : la première courant janvier 2013, la seconde courant mars ou avril 2013, afin de prélever les antenaises (primipares dans ces élevages) et les brebis ayant mis bas tardivement. Ainsi, pour chaque élevage, l'ensemble des brebis a été prélevé dans le premier trimestre de lactation.

En salle de traite, une personne par quai était chargée de l'identification des échantillons et de leur tri par classe d'âge des brebis. En effet, nous avons procédé à des regroupements de laits par millésime afin de préparer le traitement au laboratoire par mélange de 10 selon la probabilité de positivité (cette probabilité augmente avec l'âge des brebis).

Une deuxième personne était chargée de nettoyer et désinfecter les trayons avec des lingettes désinfectantes (une par hémi-mamelle). Cette personne éliminait ensuite les premiers jets, puis prélevait le lait des deux hémi-mamelles dans le flacon stérile que lui tendait une troisième personne. Une attention particulière a été accordée aux hémi-mamelles présentant des signes de mammite chronique. Tous les trayons, y compris surnuméraires, ont été prélevés.

La personne chargée de traire se désinfectait les mains entre deux brebis à l'aide d'une lingette désinfectante.

Les flacons contenaient un antibiotique, le ceftiofur (ExcenelND), appartenant à la famille des céphalosporines.

Les prélèvements ont été conservés et acheminés au laboratoire dans une glacière avec pains de glace. Lorsque les prélèvements ont eu lieu pendant deux jours d'affilée et que les échantillons ne

pouvaient être apportés directement au laboratoire, ils ont été stockés à +4°C à la clinique vétérinaire de Saint-Palais.

Les prélèvements de lait de tank ont été effectués, conformément aux textes en vigueur (Arrêté préfectoral), soit par le technicien du GDS (en profitant du passage dans l'élevage), soit par l'éleveur lui-même, soit par le vétérinaire.

❖ Prélèvements de sang

Les brebis non réformées suite aux résultats des PCR sur lait ont fait l'objet d'une prise de sang afin de déterminer leur statut sérologique vis-à-vis de l'infection par *Mycoplasma agalactiae*.

Ces prélèvements ont eu lieu en mai 2013, soit en moyenne au milieu de la lactation.

Toutes les brebis et béliers présents dans l'exploitation ont été prélevés, sauf les agnelles (génération « 2013 »). Les aiguilles ont été changées entre chaque brebis.

Les animaux ayant été prélevés lors de la campagne de prophylaxie de 2012 n'ont pas fait l'objet de nouvelle prise de sang, le résultat des sérologies ayant été obtenu l'été précédent. L'identification précise des animaux n'ayant pas eu de nouvelles prises de sang n'a pas été transmise.

Les tubes ont été conservés dans une glacière avec pains de glace jusqu'au laboratoire.

Les boucles « R » correspondant à des boucles de remplacement, il a été impossible de savoir à quel millésime se rattachaient ces brebis.

3. Suivi des troupeaux au cours de la campagne 2013

La surveillance de l'excrétion galactophore de *M. agalactiae* a été réalisée par PCR sur laits de tank lors de la campagne 2013-2014, comme lors de la précédente. Les prélèvements de tank ont été réalisés selon la technique habituelle, à l'aide d'une louche ou d'une poire jetable, dans la zone supérieure du tank.

L'élevage 5 ayant présenté une rechute clinique en mai 2013, il a été exclu du protocole.

4. Mesures de biosécurité

Lors des prélèvements (lait et sang), une attention particulière a été portée aux mesures de biosécurité afin d'éviter de transmettre l'agent de l'Agalactie contagieuse d'un élevage à un autre.

Une combinaison intégrale ainsi que des sur-bottes jetables ont été utilisées dans chaque élevage. De plus, un pédiluve a été utilisé avant l'entrée et après la sortie de la bergerie (pédiluve réalisé avec de l'eau de javel et un ammonium quaternaire, le TH5ND).

A la sortie de l'exploitation, nos bottes ont été soigneusement brossées.

C. PRINCIPES DE REFORME ET DE SUIVI

Les éleveurs se sont engagés, dans le cadre du protocole, à réformer le plus rapidement possible après la transmission des résultats les brebis positives en PCR individuelle dans le lait.

Suite aux résultats des sérologies, les éleveurs ont trouvé un accord avec le GDS pour la réforme : toutes les brebis positives avec la trousse Idexx ont dû être réformées. Certaines brebis positives en LSI l'ont aussi été, elles n'ont pas pu être toutes éliminées car cela aurait fait trop d'animaux (problème de la perte de production et du renouvellement en race locale).

Lors de la campagne 2013-2014, les cheptels ont été suivis uniquement via l'absence de positivité du lait de tank. Si ce dernier était devenu positif des prélèvements individuels de lait auraient été effectués afin d'identifier les animaux excréteurs.

Le succès définitif du protocole ne peut être déclaré avant d'avoir observé des résultats négatifs pendant plusieurs années consécutives.

De nouveaux cheptels ont rejoint le programme, en revanche le protocole n'est pas le même que celui de la campagne 2013. Des sérologies sont réalisées en début de campagne (afin d'augmenter la sensibilité) sur tous les animaux et des PCR sur laits individuels ne seront effectuées qu'en cas de positivité du lait de tank (afin de réduire la charge de travail et le coût des analyses).

D. TECHNIQUES ANALYTIQUES

1. PCR en temps réel sur le lait

La PCR utilisée est celle décrite dans la partie 1. Les résultats de CT ont été transformés en équivalents génomes par ml (« UFC » /ml) pour les laits de tank, comme dans la première partie. En revanche, les résultats obtenus sur laits individuels ont été traités selon un mode qualitatif (positif ou négatif).

Le Laboratoire a réalisé les PCR par mélange de 10 laits. Les mélanges ont été constitués par classe d'âge, en cherchant à optimiser le nombre de mélanges réalisés. Par exemple, dans l'élevage n°1 le dernier mélange pour la classe d'âge « 8000 » ne contenait que 7 prélèvements, il a été complété par 3 laits de « 6000 ».

Les laits individuels appartenant à un échantillon de mélange dont le résultat s'est révélé positif ont fait l'objet d'une PCR individuelle.

En attendant les résultats des analyses sur échantillons de mélange, les laits ont été conservés au congélateur (-20° C).

Lors de la seconde série de prélèvements de lait (mars ou avril 2013), nous avons vérifié avec l'éleveur que toutes les brebis présentes dans l'élevage aient fait l'objet d'un prélèvement de lait.

2. Trousses Elisa utilisées sur le sang

Les prises de sang ont été tout d'abord analysées avec la trousse Idexx-Pourquier qui détecte les anticorps visant la protéine P48, spécifique de *M. agalactiae*.

En principe, seules les brebis séronégatives avec cette trousse devaient être testées avec une seconde trousse, celle du laboratoire LSI (antigène total). Cette stratégie d'analyse est issue des performances de chacune des trousse, rappelées au tableau 3. En fait, dans un but de comparaison des différents Elisa, l'ensemble des prises de sang a été testé avec les deux trousse (à l'exception de 18 d'entre elles).

Le test LSI a été réalisé sur une très grande majorité des brebis, afin :

- de déterminer si les brebis négatives avec le kit Pourquier étaient positives avec la trousse LSI
- d'obtenir des informations sur ce dernier test

Le seuil de positivité est fixé à 2 (valeur justifiée dans la partie discussion), les recommandations du fabricant étant de 1 ; il a donc été décidé de considérer comme douteux les animaux ayant une valeur comprise entre 1 et 2 (recommandation du fabricant : entre 0.8 et 1).

Tableau 3 : Trousses ELISA utilisées.

Trousse ELISA	Antigène	Expression des résultats	Sensibilité diagnostique	Spécificité diagnostique	Seuil du fabricant	Seuil utilisé
Idexx Pourquier	P48	$(E - C^-) / (C^+ - C^-) \times 100$	56 % *	100 % *	60 %	30 %
LSI	Antigène total	$E / (2 \times C^-)$	84 % *	95,7 % *	1	2

* (POUMARAT F.*et al.*, 2012)

E = échantillon. C⁻ = contrôle négatif. C⁺ = contrôle positif

Pour la trousse Idexx, le ratio est calculé en retirant au numérateur et au dénominateur la valeur du contrôle négatif (« bruit de fond »). Pour la trousse LSI, c'est au dénominateur qu'est soustraite la valeur de 2 fois le contrôle négatif.

II. RESULTATS

II.1. CONTRIBUTION A LA VALIDATION DE LA PCR EN TEMPS REEL SUR LE LAIT DE TANK

Les élevages 1, 2, 4 et 13 n'ont pas été conservés pour les calculs car la majorité des résultats de PCR étaient inférieurs à la limite de quantification de la technique. Nos critères de pré-sélection (choix des élevages) puis de sélection (PCR initiales sur les échantillons à l'arrivée au laboratoire) ont donc permis d'inclure les laits de 10 élevages.

Les figures suivantes présentent la variabilité des données obtenues, avant transformation logarithmique.

A. REPRESENTATION GRAPHIQUE DE LA VARIABILITE OBTENUE

1. Ensemble des valeurs

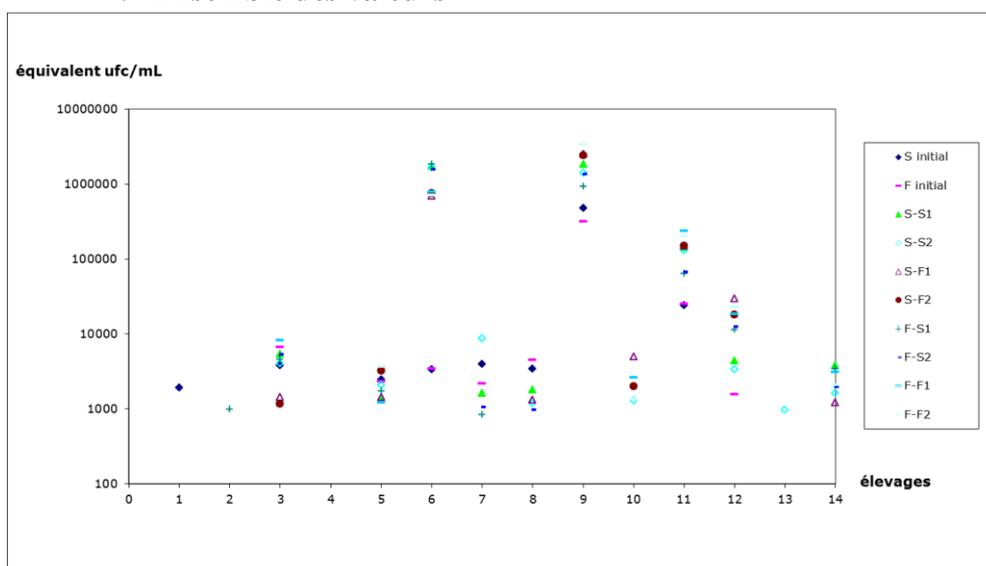


Figure 1 : Résultats de l'ensemble des répétitions de PCR (en équivalents UFC/ml) par élevage (1 à 14) en fonction de la profondeur de prélèvement (échelle logarithmique).

S et F initial : prélèvements de surface (S) et de fond (F) des tanks traités à l'arrivée au laboratoire (PCR d'inclusion).

Prélèvements de surface des tanks (S) : S-S, prises d'essai en surface au laboratoire ; S-F, prises d'essai au fond au laboratoire.

Prélèvements en profondeur des tanks (F) : F-S, prises d'essai en surface au laboratoire ; F-F, prises d'essai au fond (F-F) au laboratoire

(1 et 2 : duplicatas).

La figure 1 montre les gammes de concentration obtenues dans les différents élevages. Dix élevages sur 14 ont présenté des quantifications comprises entre 10^3 et 10^4 UFC/ml. Les concentrations des 4 autres ont été plus élevées et ont atteint $4 \cdot 10^6$ UFC/ml. Graphiquement, la variabilité intra-élevage est apparue supérieure à la variabilité des moyennes inter-élevages dans plusieurs cas (élevages 7, 11 et 12 par exemple).

2. Variabilité de l'échantillon de surface « S »

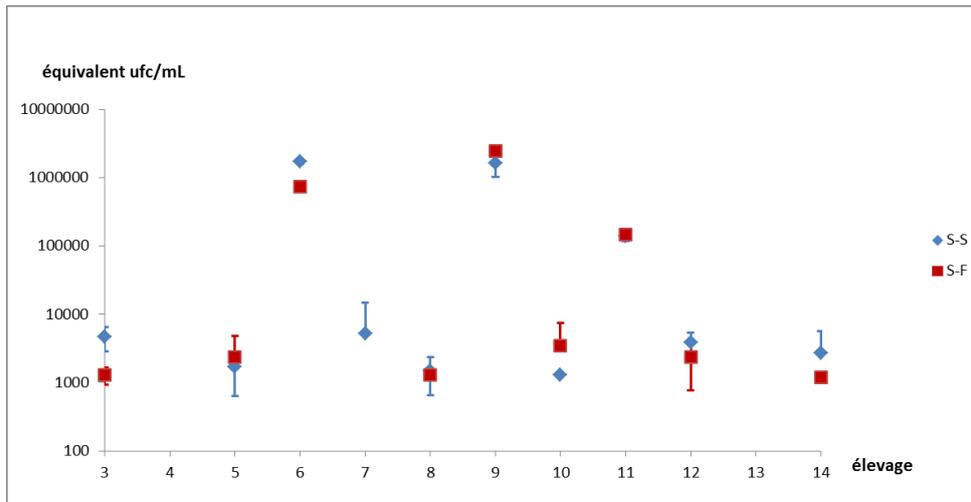


Figure 2 : Moyennes obtenues entre les deux reproductions, en surface et au fond, pour chaque élevage, de l'échantillon « S » (4 valeurs par élevage).

Une majorité d'élevage (sauf 6 et 10) présente une superposition des intervalles de confiance autour des valeurs « S-S » et « S-F ». Ce qui traduit une absence de différence significative entre les valeurs.

3. Variabilité de l'échantillon au fond du tank « F »

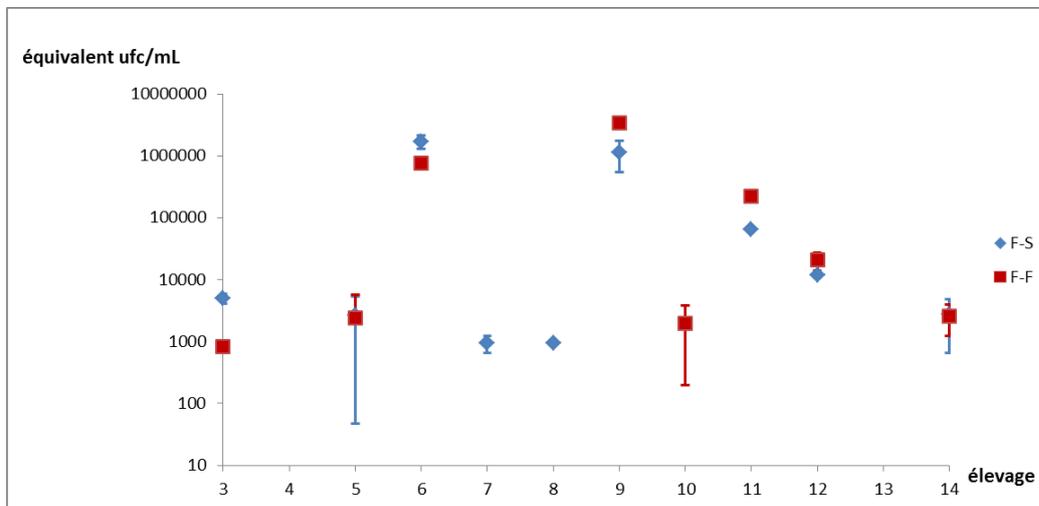


Figure 3 : Moyennes obtenues entre les deux reproductions en surface et au fond, pour chaque élevage, de l'échantillon « F » (4 valeurs par élevage).

Les intervalles de confiance autour des valeurs « F-S » et « F-F » sont proches voire superposés pour certains élevages traduisant une absence de différence significative des moyennes.

4. Echantillons de tank

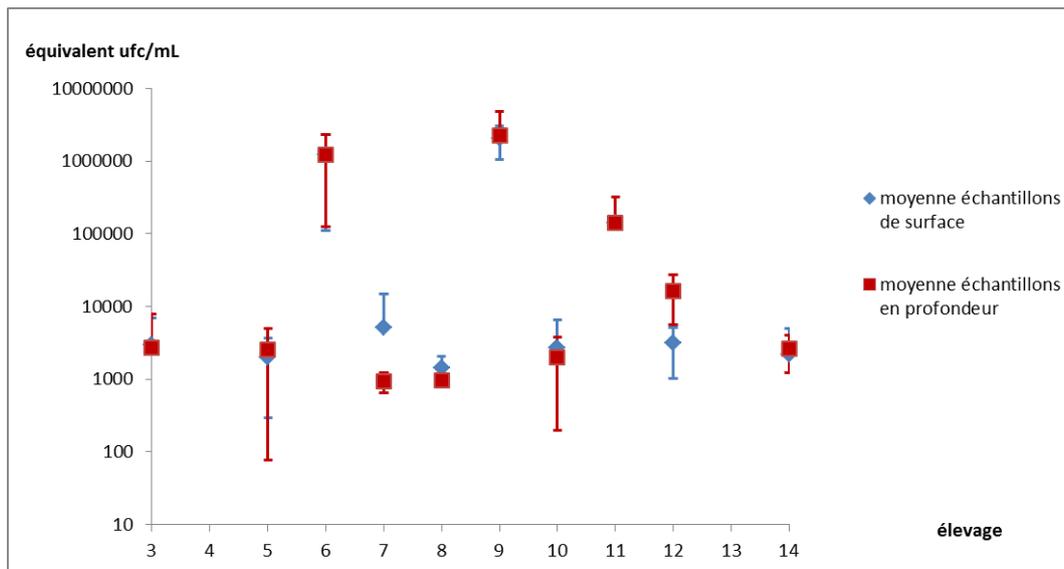


Figure 4 : Comparaison des moyennes des échantillons prélevés en surface et au fond du tank (8 résultats par élevage).

Les intervalles de confiance calculés autour des valeurs respectives « S » et « P » sont superposés pour tous les élevages sauf le n°7. Pour cet élevage, les moyennes sont éloignées, ce qui fait penser qu'il y aurait une différence significative entre l'échantillon de surface et celui en profondeur.

La figure 4 confirme tout d'abord, sur le plan de l'intensité de l'excrétion galactophore, que deux groupes de valeurs sont apparus dans cette étude : des laits de tank situés en moyenne entre 10^3 et 8.10^3 UFC/ml, et des laits comprenant 2.10^5 à 3.10^6 UFC/ml. D'autre part, une variabilité des différentes quantifications intra-élevage dépassant un log a été obtenue pour les deux groupes.

B. REPETABILITE ET REPRODUCTIBILITE : EXEMPLE

Les résultats d'UFC/ml ont subi une transformation logarithmique.

L'élevage 6 est pris ici comme exemple. La figure 5 illustre les trois étapes suivies pour le calcul des variances et des coefficients de variation (présentées au chapitre Matériel et méthodes) :

- calcul sur la répétition de deux quantifications en surface et en profondeur pour l'échantillon de tank S (soit S-S et S-F, en bleu sur la figure 5) : la répétabilité analytique en colonne a été estimée par un CV de 0,35 ; la reproductibilité de rang 1 (R1), correspondant à la comparaison de la surface et du fond, a été estimée par un CV de 4,31 pour cet élevage

- même calcul pour l'échantillon F (soit F-S et F-F, en turquoise sur la figure) : les deux CV ont été respectivement de 0,73 et 4,15

- enfin regroupement de l'ensemble des quantifications (en vert sur la figure 5) : la reproductibilité de rang 2 (R2), calculée à partir des quatre quantifications sur l'échantillon de surface ou du fond du tank, a été estimée pour cet élevage par un CV de 3,47. La reproductibilité de rang 3 (R3), comparant les 8 quantifications par tank, a été établie ici à 3,47.

S-S	S-F	Surfaces (S)	Répétabilité	0,3509				
6,243	5,845		Reproductibilité 1	4,3174				
6,220	5,881	Analyse de variance: un facteur						
		RAPPORT DÉTAILLÉ						
F-S	F-F	Groupes	N d'échantillons	Somme	Moyenne	Variance		
6,270	5,901	Colonne 1	2	12,463	6,232	0,000		
6,193	5,856	Colonne 2	2	11,726	5,863	0,001		
S	F	ANALYSE DE VARIANCE						
6,243	6,270	<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>ddl</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique F</i>
6,220	6,193	Entre Groupes	0,136	1	0,136	301,721	0,003	18,513
5,845	5,901	A l'intérieur des groupes	0,001	2	0,000			
5,881	5,856	Total	0,137	3				
		Fonds (F)	Répétabilité	0,734				
			Reproductibilité 1	4,156				
		RAPPORT DÉTAILLÉ						
		Groupes	N d'échantillons	Somme	Moyenne	Variance		
		Colonne 1	2	12,463	6,231	0,003		
		Colonne 2	2	11,756	5,878	0,001		
		ANALYSE DE VARIANCE						
		<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>ddl</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique F</i>
		Entre Groupes	0,125	1	0,125	63,164	0,015	18,513
		A l'intérieur des groupes	0,004	2	0,002			
		Total	0,129	3				
		Tank	Reproductibilité 2	3,476				
			Reproductibilité 3	3,477				
		Groupes	N d'échantillons	Somme	Moyenne	Variance		
		Colonne 1	4	24,189	6,047	0,046		
		Colonne 2	4	24,219	6,055	0,043		
		ANALYSE DE VARIANCE						
		<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>ddl</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique F</i>
		Entre Groupes	0,000	1	0,000	0,003	0,961	5,987
		A l'intérieur des groupes	0,265	6	0,044			
		Total	0,266	7				

Figure 5 : Représentation des résultats de calcul de la répétabilité et des reproductibilités obtenus suite aux estimations de variances par l'ANOVA à un facteur. Les coefficients de variation présentés en gras correspondent à la racine carrée de la moyenne des carrés divisée par la moyenne des valeurs (après transformation logarithmique).

C. REPETABILITE ET REPRODUCTIBILITE : ENSEMBLE DES VALEURS

Les valeurs obtenues pour les 10 tanks retenus sont présentés au tableau 4.

Tableau 4 : Ensemble des coefficients de variation obtenus pour les 10 tanks retenus.

r : répétabilité analytique. **R1** : reproductibilité entre les quantifications de surface et de profondeur (échantillons) pour des laits de tank eux-mêmes prélevés en surface ou en profondeur. **R2** : reproductibilité entre les 4 quantifications réalisées à partir des laits de surface ou du fond. **R3** : reproductibilité entre les 8 quantifications réalisées par tank.

Elevage	Surfaces (S)		Fonds (F)		Tank	
	r	R1	r	R1	R2	R3
3	2,24	11,82	1,12	3,45	6,65	8,94
5	6,16	6,65	8,54	8,70	6,34	6,59
6	0,35	4,32	0,73	4,16	3,48	3,48
7					11,20	15,24
8	4,04	4,13			3,03	3,66
9	0,92	2,14	1,31	5,45	3,44	3,44
10	8,22	8,88			8,16	8,36
11	0,40	0,56	0,67	7,27	4,19	4,32
12	3,11	14,10	1,26	4,11	8,06	8,25
14	7,91	9,65	4,33	4,34	5,61	6,08

1. Répétabilité et reproductibilité de premier ordre (R1)

Le tableau 4 comprend des valeurs de répétabilité analytique comprises entre 0,35 et 8,54. Six résultats sur 18 sont supérieurs à 4. Le CV de répétabilité moyen est de $3,5 \pm 3,0$. De même, les valeurs de reproductibilité (R1) sont comprises entre 0,56 et 14,10. Cinq résultats sur 16 sont supérieurs à 8. Le CV de reproductibilité moyen est de $6,2 \pm 2,2$.

La figure 6 présente les moyennes de répétabilité obtenues sur les paires d'échantillons de surface ou de fond, et les moyennes de reproductibilité liées à ces fractions. Pour l'ensemble des tanks prélevés et des résultats valorisables, les premières sont inférieures aux secondes : la répétabilité analytique est inférieure à la reproductibilité associée à l'échantillonnage des laits au laboratoire.

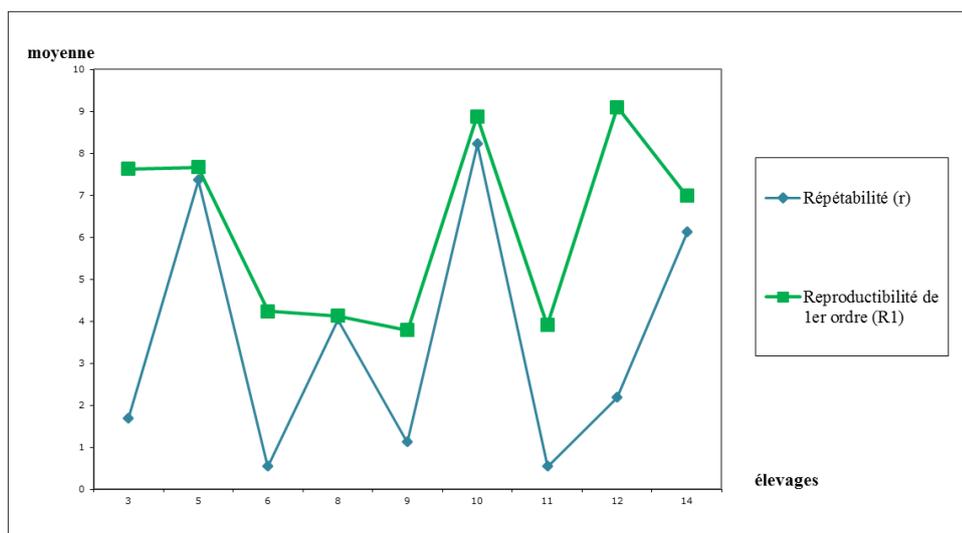


Figure 6 : Moyennes de répétabilité et de reproductibilité de premier ordre (variations liées à l'échantillonnage des laits reçus au laboratoire) pour les élevages retenus.

2. Reproductibilités de deuxième et troisième ordres (R2 et R3)

La figure 7 présente les moyennes de reproductibilité à l'échelon des laits de tank, ainsi que la reprise des résultats précédents. Les CV de reproductibilité d'ordre 3 (R3) ne sont supérieurs aux moyennes de R1 et R2 que pour deux tanks sur neuf. Si l'on laisse de côté l'élevage 7, en limite de quantification pour la PCR, donc avec des valeurs manquantes, les reproductibilités post-analytiques sont comprises entre 3 et 9.

Les moyennes de CV de R2 et de R3 sont respectivement de $6,0 \pm 2,6$ et $6,8 \pm 3,6$. Les valeurs élémentaires (avant moyennes) maximales sont dans tous les cas celles de R1 : la reproductibilité liée à l'échantillonnage d'un lait après décantation sur la paillasse est dans cette étude la plus élevée.

La variation liée à la profondeur d'échantillonnage d'un lait reçu au laboratoire ou d'un tank est du même ordre ; elle est supérieure à la variation analytique.

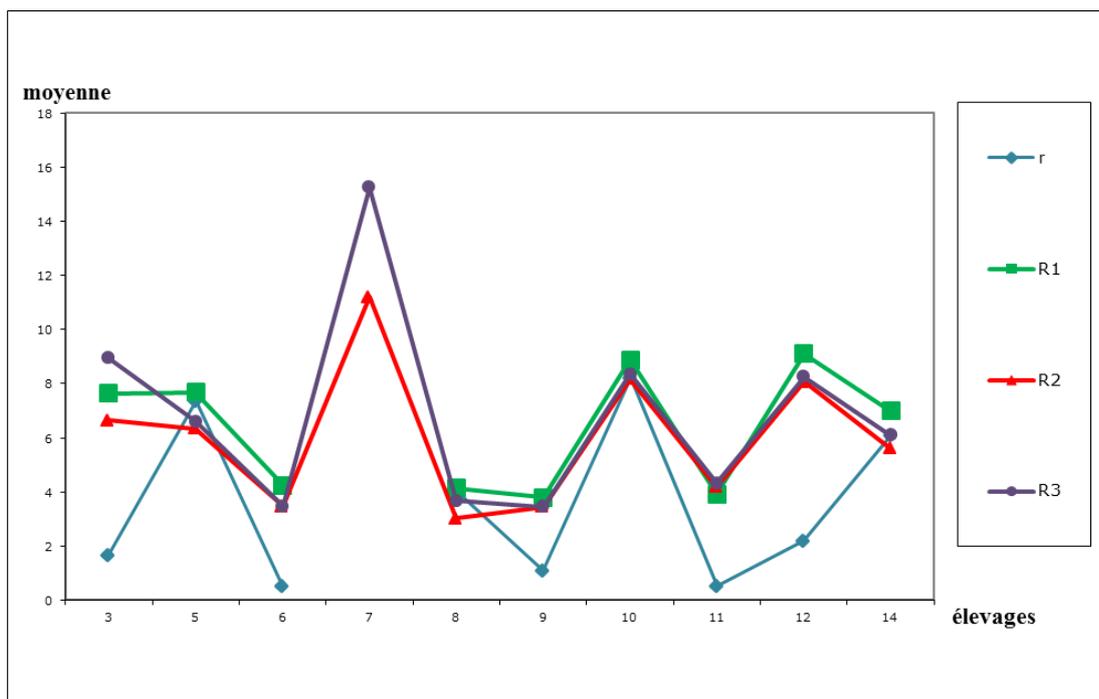


Figure 7 : Répétabilité et reproductibilités pour les élevages retenus.

r : répétabilité analytique (moyennes).

R1 : reproductibilité entre les quantifications de surface et de profondeur (échantillons) pour des laits de tank eux-mêmes prélevés en surface ou en profondeur (moyennes).

R2 : reproductibilité entre les 4 quantifications réalisées à partir des laits de surface ou du fond.

R3 : reproductibilité entre les 8 quantifications réalisées par tank.

La figure 8 présente l'ensemble des valeurs de répétabilité et de reproductibilité. Dans tous ces cas (sauf l'élevage 7, incomplet), les variances de reproductibilité R1 ont présenté les valeurs les plus élevées. L'une au moins des deux valeurs de R1 est toujours supérieure à R3 : la variabilité liée à l'échantillonnage d'un prélèvement de lait à la paillasse est supérieure à celle qui est issue du tank, en amont.

Ces valeurs de R1 sont comprises entre 0,56 et 14,10. Elles sont à 6 reprises supérieures à 7 ; dans ces derniers cas, les valeurs élémentaires de quantification correspondantes ont présenté des ratios maximum/minimum de 3 à 8,9.

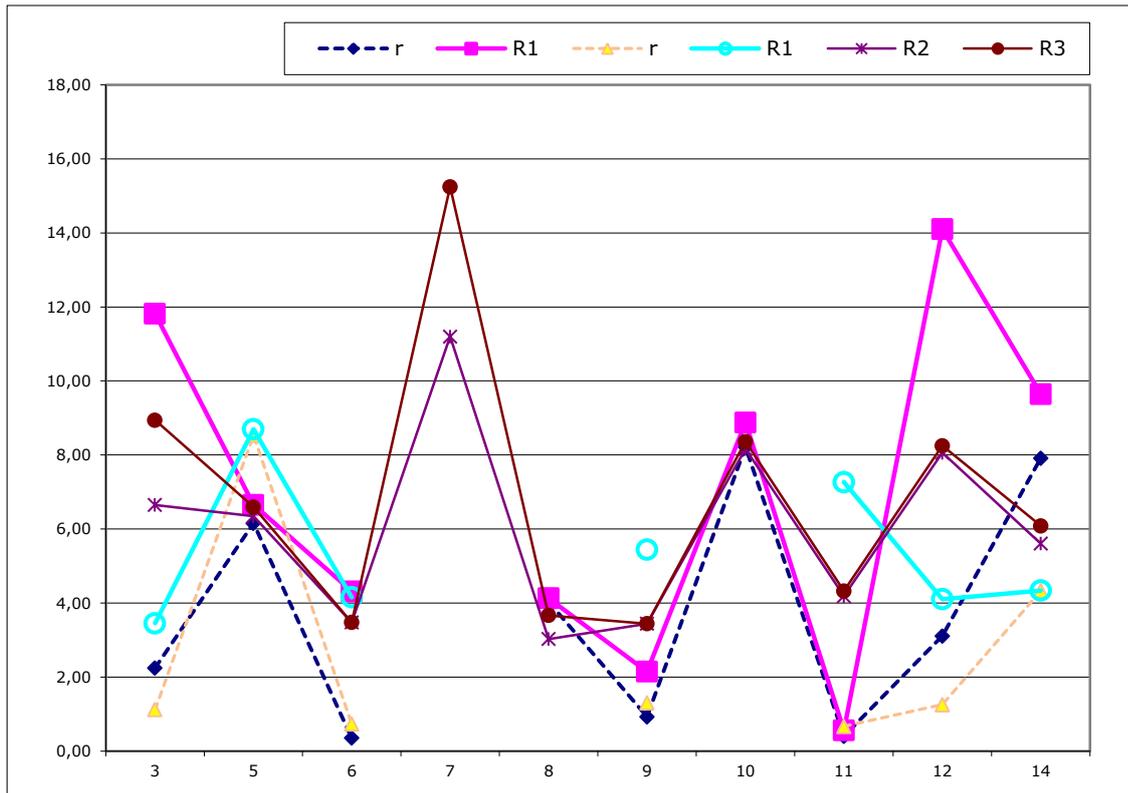


Figure 8 : Répétabilité et reproductibilités pour les élevages retenus (ensemble des valeurs).

r : répétabilité analytique (pour les surfaces et les fonds).

R1 : reproductibilité entre les quantifications de surface et de profondeur (échantillons) pour des laits de tank eux-mêmes prélevés en surface ou en profondeur.

R2 : reproductibilité entre les 4 quantifications réalisées à partir des laits de surface ou du fond.

R3 : reproductibilité entre les 8 quantifications réalisées par tank.

D. VALEURS PAR FRACTION

La figure 8 représente les moyennes de valeurs obtenues en fonction de la profondeur de prélèvement dans les tanks et les échantillons reçus au laboratoire. Les moyennes les plus élevées ont été obtenues pour les prélèvements réalisés au fond des échantillons récoltés en profondeur (F-F1 et 2) ou, partiellement, en surface (S-F2) des tanks. Les différences ne sont pas significatives.

Si l'on exprime et illustre ces moyennes en quantifications brutes (UFC/ml) (figure 9) :

- les valeurs moyennes les plus élevées sont relatives à des prises d'essai réalisées au fond des tubes. Pour les prélèvements de fond de tank, la moyenne est multipliée par deux par rapport à la surface de ces tubes : 3.10^5 contre 6.10^5 UFC/ml
- parmi les prises d'essai réalisées au fond des tubes, les valeurs les plus élevées sont obtenues à partir de fonds de tank : $4,5.10^5$ contre 6.10^5 UFC/ml.

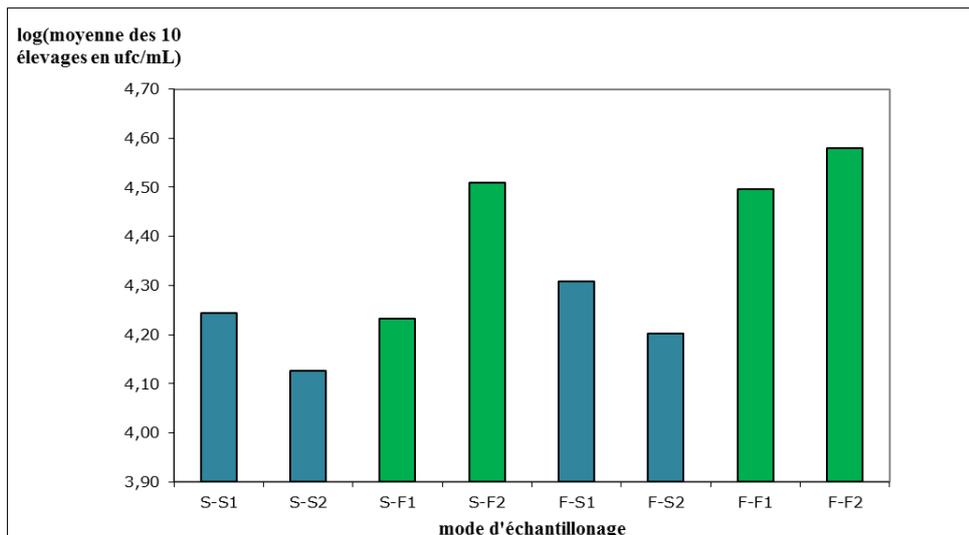


Figure 9 : Moyennes de quantification (après transformation logarithmique des équivalents UFC/ml) pour les élevages en fonction du mode d'échantillonnage.

S et F initial : prélèvements de surface (S) et de fond (F) traités à l'arrivée au laboratoire (PCR d'inclusion).

Prélèvements de surface des tanks (S) : S-S, prises d'essai en surface au laboratoire ; S-F, prises d'essai au fond au laboratoire.

Prélèvements en profondeur des tanks (F) : F-S, prises d'essai en surface au laboratoire ; F-F prises d'essai au fond au laboratoire.

(1 et 2 : duplicatas).

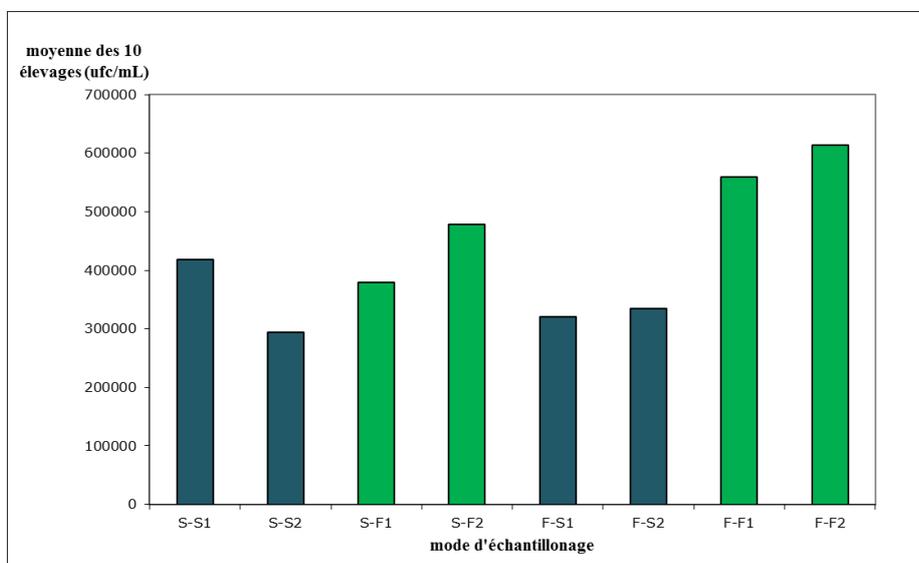


Figure 10 : Moyennes de quantification (UFC/ml) pour les 10 élevages en fonction du mode d'échantillonnage.

S et F initial : prélèvements de surface (S) et de fond (F) traités à l'arrivée au laboratoire (PCR d'inclusion).

Prélèvements de surface des tanks (S) : S-S, prises d'essai en surface au laboratoire. S-F, prises d'essai au fond au laboratoire.

Prélèvements en profondeur des tanks (F) : F-S, prises d'essai en surface au laboratoire. F-F, prises d'essai au fond au laboratoire.

(1 et 2 : duplicatas).

II.2. UTILISATION DE LA PCR EN TEMPS REEL POUR LA REFORME CIBLEE

A. SYMPTOMATOLOGIE

Aucune arthrite ni kérato-conjonctivite n'ont été relevées lors des interventions en élevages. Un total de 72 brebis (sur 938) a présenté, lors de nos passages, des symptômes de mammite chronique (déséquilibre du pis et/ou fibrose et/ou abcès), soit 7,6%.

Les données de l'élevage n°3 n'ayant pas été transmises, il n'a pas été pris en compte.

Tableau 5 : Répartition des brebis en fonction des symptômes mammaires observés et des résultats de PCR individuelles.

	PCR +	PCR -	Total
Symptômes +	2	70	72
Symptômes -	20	846	866
Total	22	916	938

L'odds ratio calculé est de 1,2.

B. RESULTATS DES PCR SUR LAITS DE TANK

On observe une chute de l'excrétion des mycoplasmes dans le lait de tank des 4 élevages, avec une stabilisation à 0 pour les trois premiers. L'élevage 5, qui a rechuté cliniquement, a présenté des résultats de quantification PCR très élevés dès l'apparition des signes cliniques.

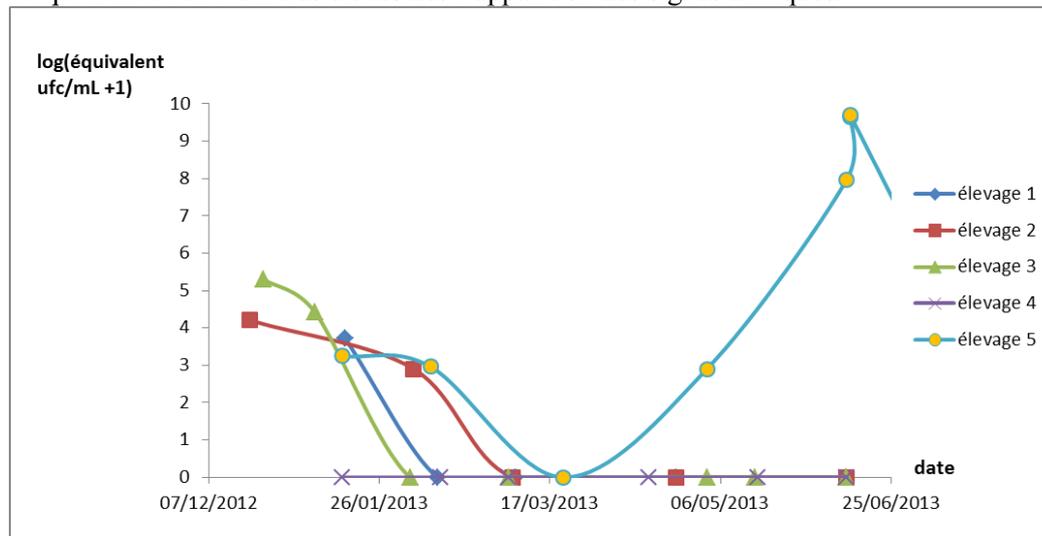


Figure 11 : Résultats des PCR sur lait de tank des 5 élevages (campagne 2013).

C. RESULTATS DES PCR SUR PRELEVEMENTS INDIVIDUELS DE LAIT

1. Résultats globaux

Tableau 6 : Résultats des PCR individuelles dans les cinq élevages.

Élevage	Nombre de brebis PCR +	Pourcentage de brebis PCR+
1	5	2,5 %
2	3	1,3 %
3	16	4,8 %
4	0	0 %
5	14	4,9 %

On observe des taux d'excrétrices en dessous de 5 %, avec un taux nul pour l'élevage 4.

2. Cheptel n° 1

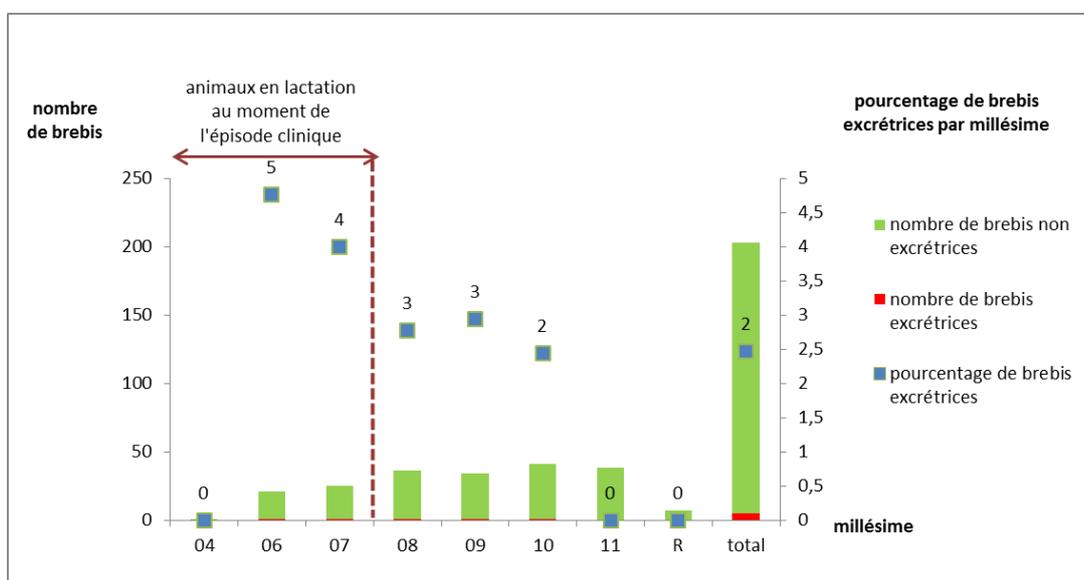


Figure 12 : Répartition des brebis excrétrices (n=5) du cheptel n° 1 par millésime.

Les brebis excrétrices sont réparties autour de l'année de déclaration d'agalactie, la dernière génération (millésime 2011) ne semble pas excréter. Il y a une brebis positive qui était née au moment de l'épisode clinique, et une qui est née à la campagne suivante.

3. Cheptel n° 2

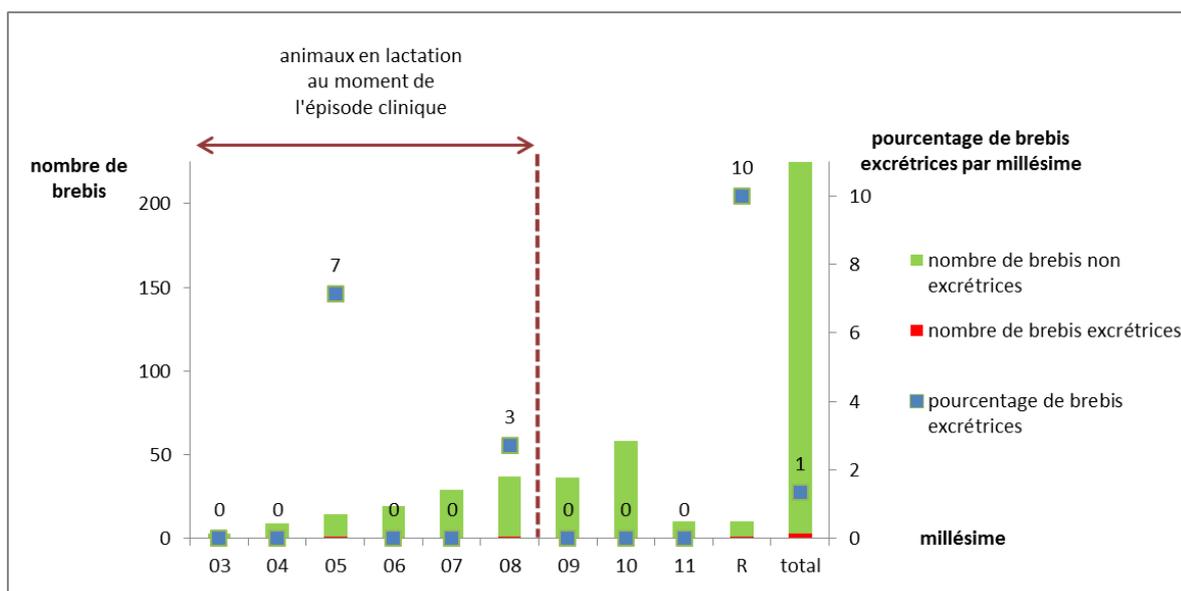


Figure 13 : Répartition des brebis excrétrices (n=3) du cheptel n° 2 par millésime.

Les brebis excréteurs *Mycoplasma agalactiae* étaient présentes (on ne peut rien affirmer concernant l'âge de la brebis « R » donc aucune conclusion n'a pu être tirée la concernant) et en lactation au moment de l'épisode clinique d'Agalactie Contagieuse.

4. Cheptel n° 3

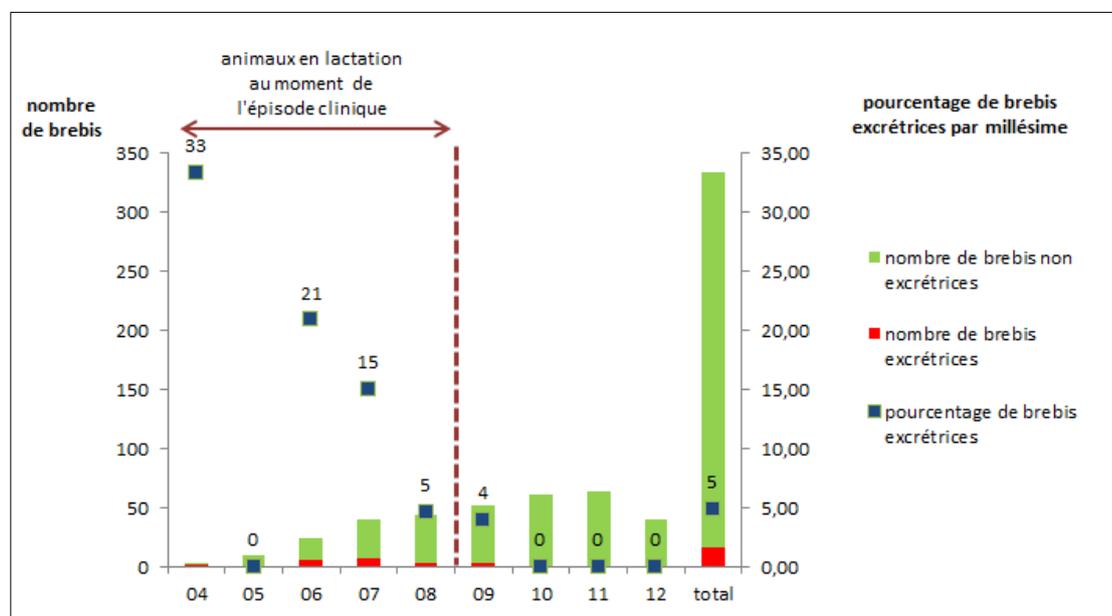


Figure 14: Répartition des brebis excrétrices (n=16) du cheptel n° 3 par millésime.

Dans cet élevage, les brebis excréteurs sont celles présentes dans l'élevage l'année où il y a eu l'épisode clinique : en lactation ou agnelles (2 de la génération 2009).

5. Cheptel n° 4

Aucune brebis n'a présenté de prélèvement de lait positif en PCR quantitative.

6. Cheptel n° 5

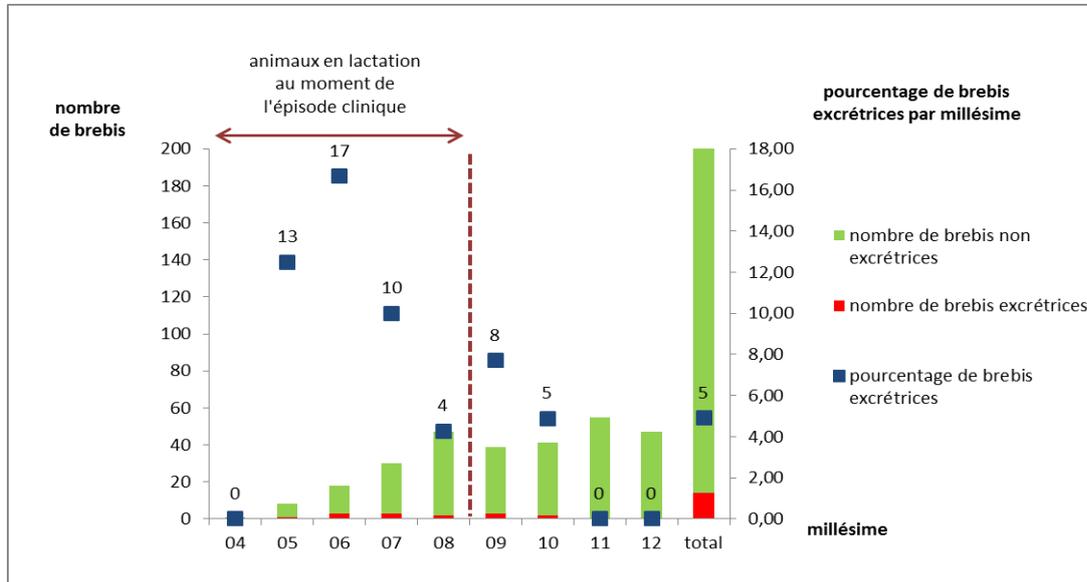


Figure 15 : Répartition des brebis excrétrices (n=14) du cheptel n° 5 par millésime.

Dans cet élevage, deux brebis excrétrices (millésime « 2010 ») n'étaient pas nées au moment de l'épisode clinique.

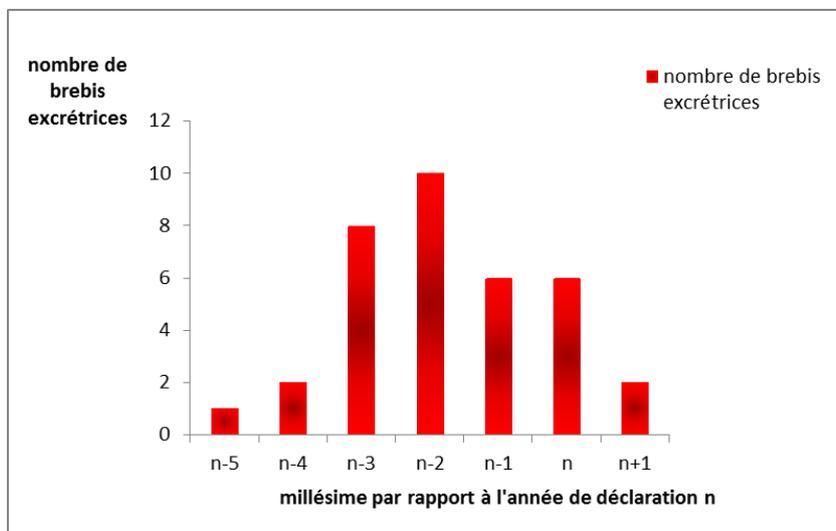


Figure 16 : Répartition des brebis excrétrices (n=35) des élevages 1, 2, 3, 5 selon leur millésime de naissance par rapport à l'année de déclaration d'Agalactie Contagieuse.

Peu de brebis excrétrices n'étaient pas nées au moment de l'épisode clinique (3/38 soit 8 %), ce sont surtout des brebis entre la première et la troisième lactation qui excrètent.

D. RESULTATS DES SEROLOGIES

1. Trousse Elisa P48 (Idexx)

❖ Résultats globaux.

Tableau 7 : Résultats des sérologies Idexx dans les cinq élevages.

Elevage	Nombre d'animaux prélevés	Nombre d'animaux positifs	% de positivité
1	257	10	3.9 %
2	305	19	6.3 %
3	364	27	7.4 %
4	379	1	0.3 %
5	314	28	8.9 %

❖ Cheptel n°1

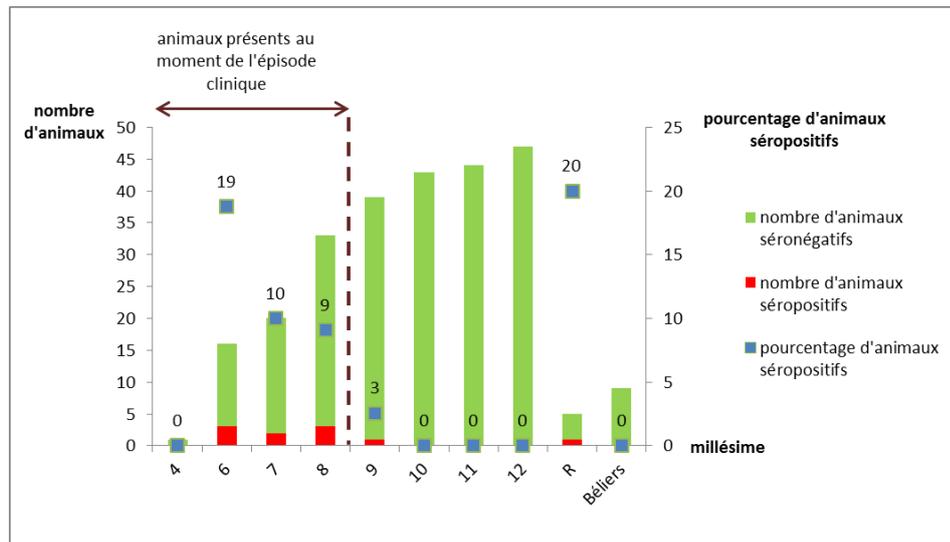


Figure 17 : Répartition par millésime des animaux séropositifs dans l'élevage n°1 (Elisa Idexx).

Les animaux séropositifs étaient tous présents dans l'élevage au moment de l'épisode clinique. Tous les animaux nés lors de la campagne suivante sont séronégatifs.

❖ Cheptel n°2

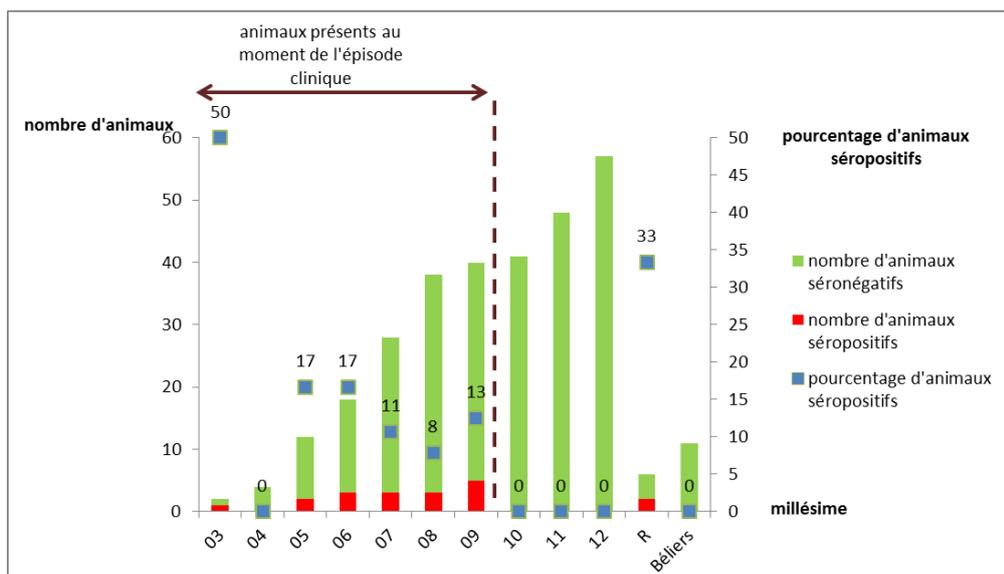


Figure 18 : Répartition par millésime des animaux séropositifs dans l'élevage n°2 (Elisa Idexx).

Les animaux séropositifs étaient tous présents dans l'élevage au moment de l'épisode clinique. Tous les animaux nés lors de la campagne suivante sont séronégatifs.

❖ Cheptel n°3

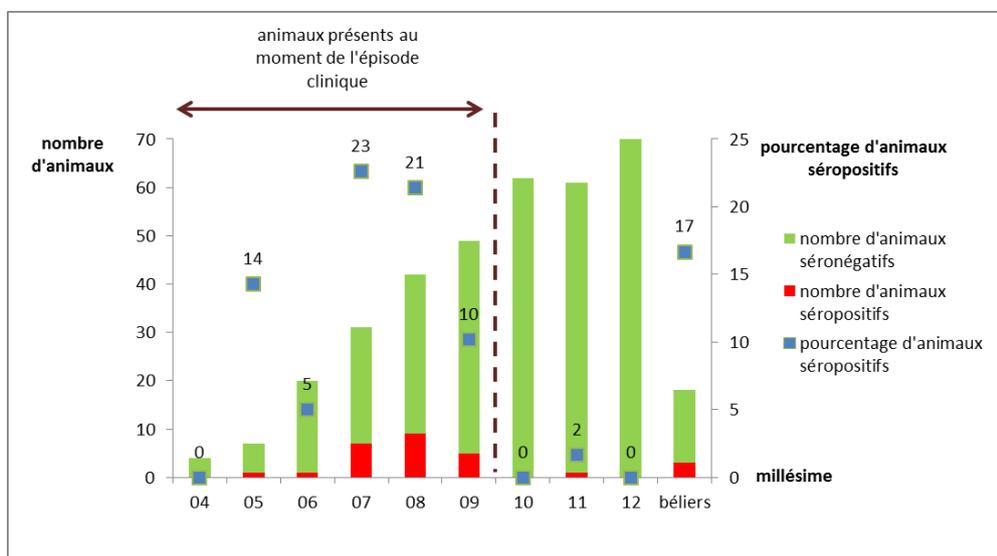


Figure 19 : Répartition millésime d'âge des animaux séropositifs dans l'élevage n°3 (Elisa Idexx).

Seules deux brebis nées après la déclaration et quelques béliers sont séropositifs, les autres animaux étant présents dans l'élevage au moment de l'épisode clinique.

❖ **Cheptel n°4**

Sur les 379 animaux testés avec la trousse Pourquoier-Idexx, seule une brebis (2022) s'est révélée séropositive.

❖ **Cheptel n°5**

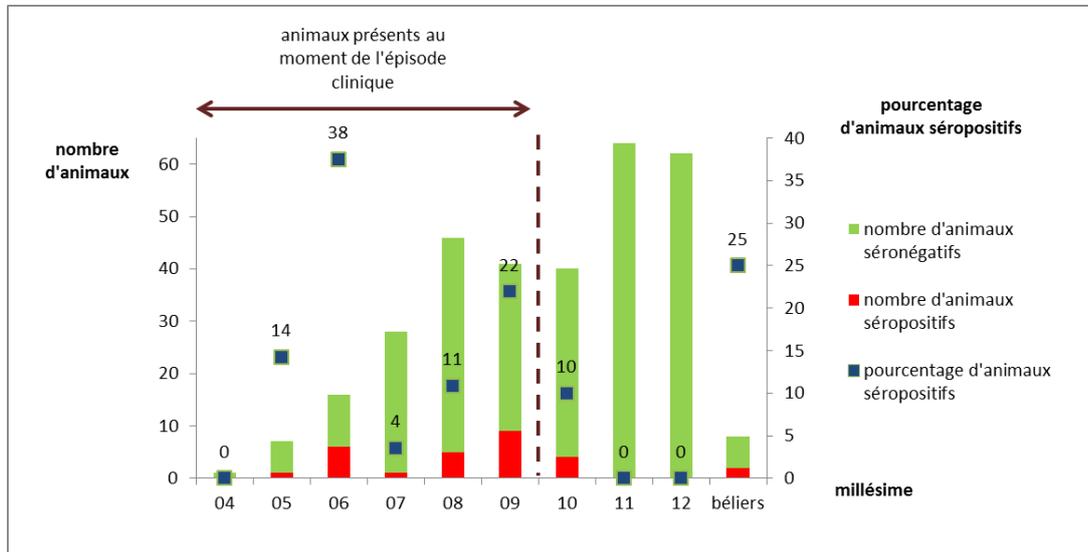


Figure 20 : Répartition par millésime des animaux séropositifs dans l'élevage n°5 (Elisa Idexx).

Les animaux séropositifs étaient tous présents dans l'élevage au moment de l'épisode clinique. Tous les animaux nés lors de la campagne suivante sont séronégatifs.

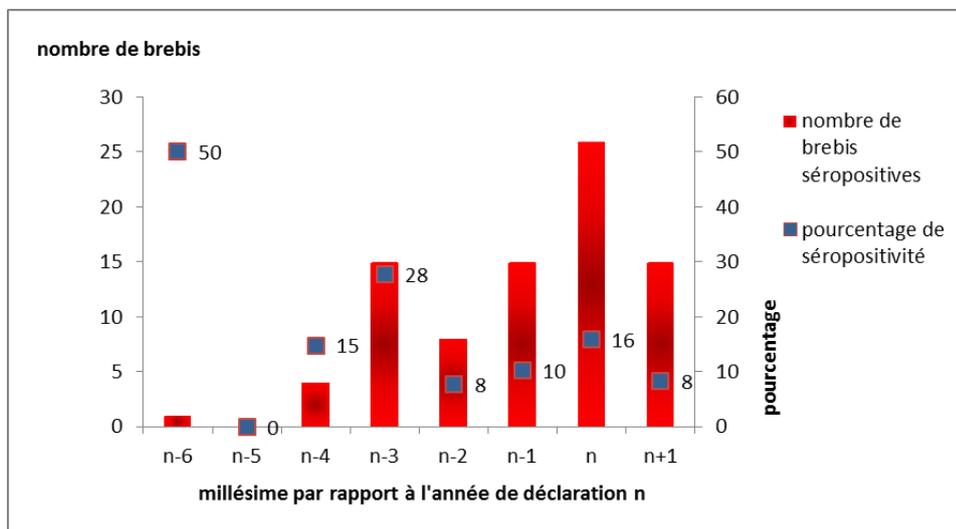


Figure 21 : Répartition des animaux séropositifs (n = 38), selon leur âge, par rapport à l'année de déclaration d'Agalactie Contagieuse (élevages 1, 2, 3 et 5).

On observe que ce sont essentiellement les brebis présentes dans l'élevage au moment de la déclaration qui sont séropositives (92 %).

2. Trousse Elisa à antigène total (LSI)

❖ Résultats globaux

Tableau 8 : Résultats des sérologies LSI dans les cinq élevages.

Cheptel	Nombre d'animaux	Nombre d'animaux séropositifs	Pourcentage d'animaux séropositifs
1	256	9	3,5 %
2	298	10	3,4 %
3	360	30	8,2 %
4	379	0	0 %
5	309	42	13,4 %

❖ Cheptel n°1

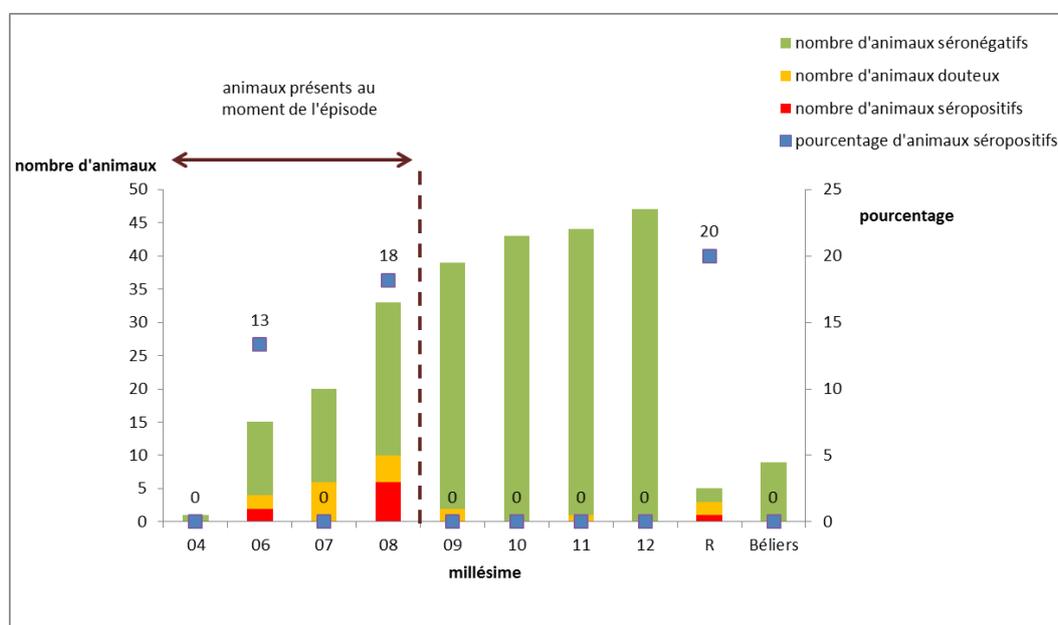


Figure 22 : Répartition par millésime des animaux séropositifs et douteux dans l'élevage 1 (Elisa LSI).

Dans cet élevage, seuls 9 ovins sont séropositifs avec la trousse LSI, un seul sérum n'ayant été analysé qu'avec la trousse Idexx.

Les brebis séropositives (LSI > 2 selon les critères du GDS) appartiennent aux millésimes 2006 et 2008. Ils correspondent respectivement à des brebis antenaises au moment de l'épisode clinique (déclaration en mai 2008) ou nées l'année suivante.

❖ Cheptel n°2

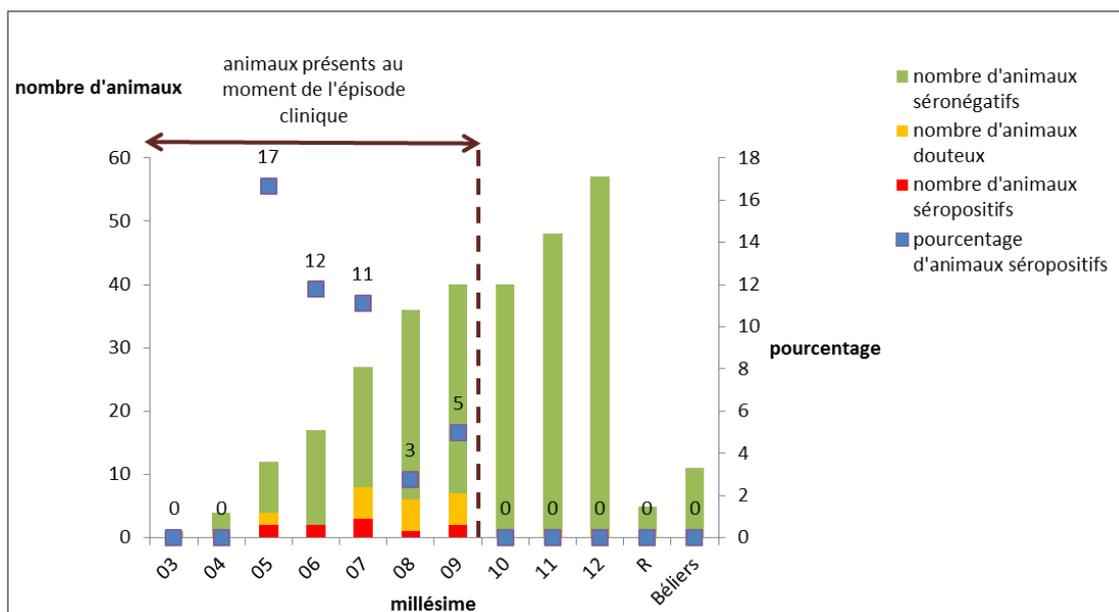


Figure 23 : Répartition par millésime des animaux séropositifs et douteux dans l'élevage 2 (Elisa LSI).

De même, pour le cheptel 2, les ovins séropositifs appartiennent à des millésimes compris entre 9000 et 5000, soit des brebis nées avant l'épisode initial.

❖ Cheptel n°3

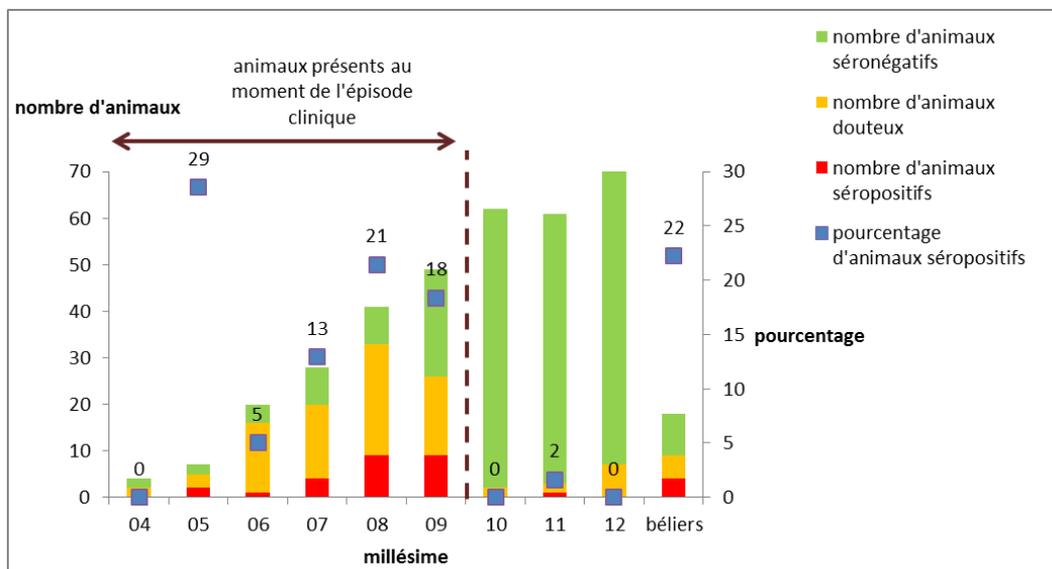


Figure 24 : Répartition par millésime des animaux séropositifs et douteux dans l'élevage 3 (Elisa LSI).

Dans le cheptel 3, la majorité des ovins séropositifs étaient présents dans l'élevage lors de la positivité initiale, mais 1 brebis et 4 béliers sont nés après.

❖ Cheptel n°4

Aucune brebis n'a été positive avec le test LSI.
Trois brebis (0074, 1089 et 2073) présentent une valeur entre 1 et 2 et pourraient donc être considérées comme « douteuses », mais au vu des résultats du troupeau et de l'absence de positivité du test Idexx, elles n'ont pas été retenues.

❖ Cheptel n°5

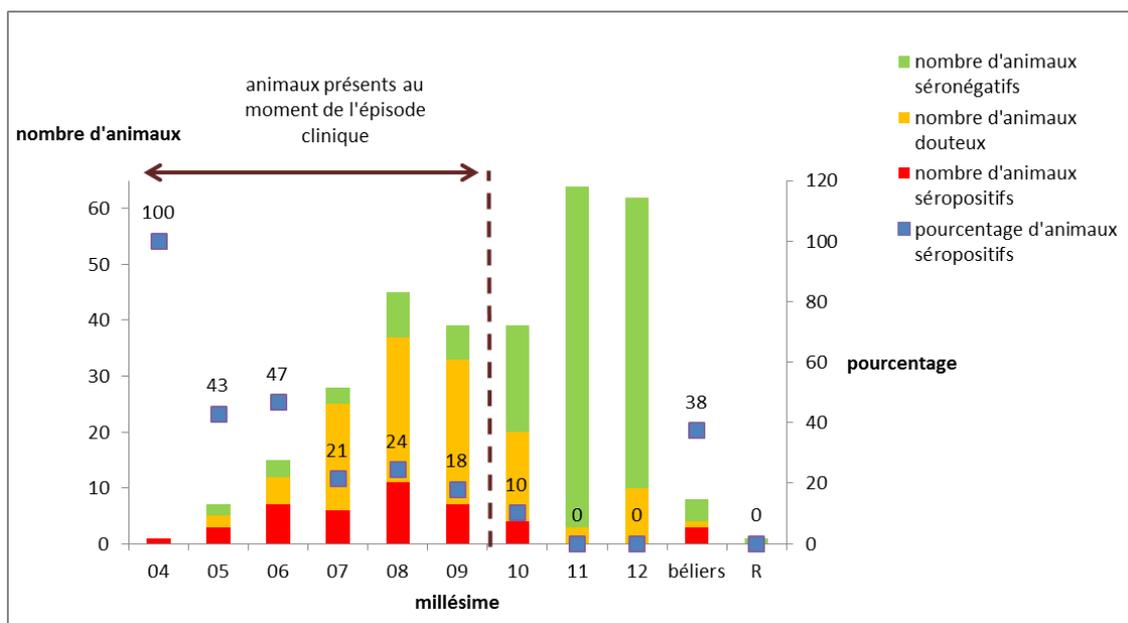


Figure 25 : Répartition par millésime des animaux séropositifs et douteux dans l'élevage 5 (Elisa LSD).

Dans le cheptel 5, 3 béliers et 4 brebis présents mais non en lactation lors de l'établissement de la première positivité se sont révélés séropositifs.

E. COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS EN PCR ET EN SEROLOGIE

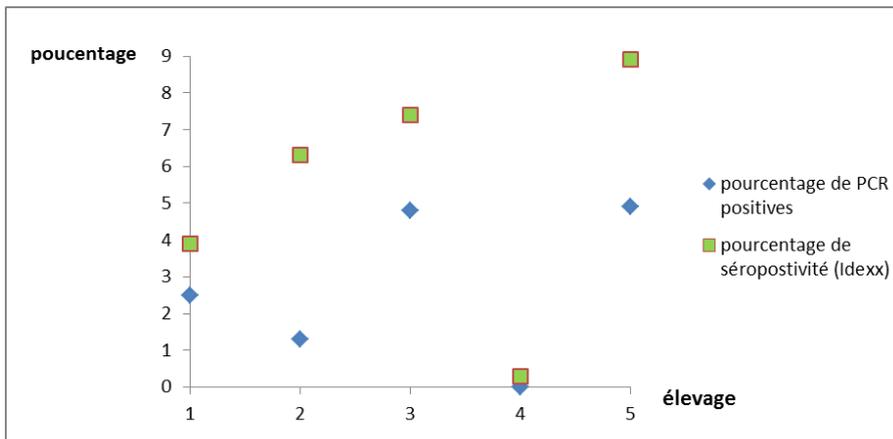


Figure 26 : Pourcentages d’ovins séropositifs et de brebis PCR-positives (Idexx) pour les cinq troupeaux (les brebis PCR-positives, réformées, n’ont pas fait l’objet de sérologie).

Les pourcentages sérologiques correspondent aux résultats obtenus avec le kit Idexx. Ils ne comprennent pas les brebis excrétrices puisqu’elles ont été éliminées suite aux résultats des PCR.

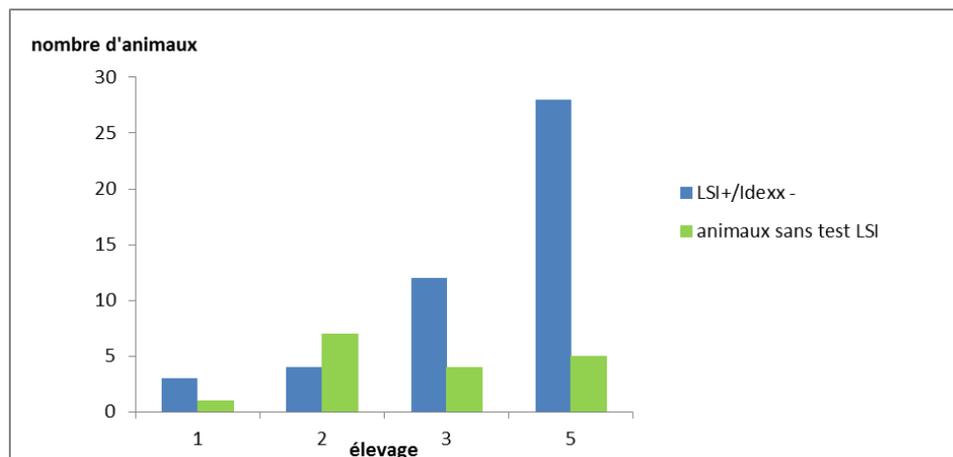


Figure 27 : Nombre d’animaux n’ayant pas eu de test avec la trousse LSI ou séropositifs en LSI et négatifs en Idexx, selon les élevages.

Certains animaux fortement positifs avec la trousse Idexx n’ont pas été testés avec la trousse LSI, il y a donc moins d’animaux dans la population testée avec la trousse LSI.

F. REFORMES DES BREBIS

Tous les éleveurs ont réformé les brebis excrétrices après la communication des résultats. Concernant la réforme des brebis séropositives, les cheptels 1 et 4 l’ont mise en œuvre dès l’obtention des résultats, l’élevage 2 après les mises bas suivantes (entre novembre et janvier) et l’élevage 3 a réformé une partie des brebis lors de l’été 2013 et le reste au cours de la lactation suivante (2013-2014).

G. SUIVI DES TROUPEAUX SUR LA CAMPAGNE 2013-2014.

Les cheptels 1 à 4 sont restés négatifs en PCR réalisée sur le lait de tank (1 prélèvement par mois).

III. DISCUSSION

III.1. CONTEXTE SPECIFIQUE DE L'AGALACTIE CONTAGIEUSE DANS LES PYRENEES-ATLANTIQUES

A. NECESSITE D'ASSAINIR LA SITUATION DANS LES PYRENEES-ATLANTIQUES.

1. Une région touchée par l'Agalactie Contagieuse

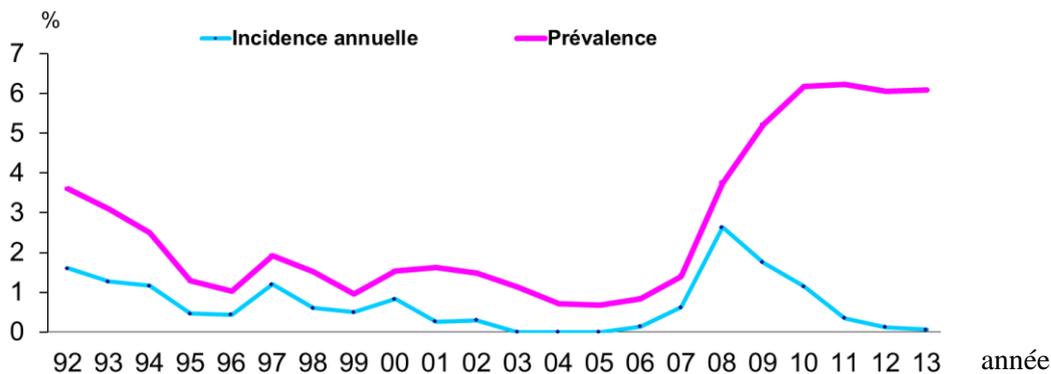


Figure 28 : Evolution de l'incidence annuelle et de la prévalence de l'Agalactie Contagieuse dans les Pyrénées-Atlantiques (GDS 64).

L'incidence a fortement chuté depuis 2008 (2 élevages nouvellement infectés en 2013, 1 en 2014). La transmission de la maladie a donc été enrayerée grâce aux nombreuses mesures mises en place (amélioration du système de détection et de suivi des élevages positifs, interdiction de transhumer, double clôtures, actions de communication,...).

En revanche la prévalence stagne (204 élevages en 2013), ce qui signifie que les élevages infectés n'arrivent pas à s'assainir et continuent à vivre avec l'infection.

2. Un impact économique et zootechnique important

La déclaration clinique de la maladie peut avoir lieu aux alentours de la mise-bas. Sachant qu'au Pays Basque ces dernières sont relativement groupées, un grand nombre d'animaux sont susceptibles d'être atteints en même temps. Ces dernières années, l'extension de l'infection dans le voisinage des élevages touchés a permis d'observer d'autres modes de transmission que la transhumance, et des déclarations cliniques sont survenues à tous les stades physiologiques ou d'avancement de la campagne laitière. Une traduction clinique tardive en lactation reste cependant économiquement grave, car non seulement la reproduction peut être affectée, mais encore la production laitière de début de campagne suivante peut être réduite.

Chez les brebis, on observe des mammites uni ou bilatérales entraînant une hypo- voire une agalactie totale. C'est donc une perte sèche pour l'éleveur, qui peut se retrouver avec plus d'une centaine d'animaux taris en quelques jours. Pour rappel les Manechs à tête rousse sont les plus hautes productrices des races locales basques, avec en moyenne 202 L produits par lactation contrôlée (TICOULET, 2001) Le litre de lait est rémunéré environ 1€.

Par ailleurs, lors d'un épisode clinique d'agalactie contagieuse, le nombre de cellules dans le tank augmente fortement ; les éleveurs s'exposent donc à des pénalités sur ce critère depuis 2012 (GOMEZ-

MARTIN *et al.*, 2013) LEBRET (communication personnelle) a mis en évidence, chez des troupeaux adhérents au CLO, que les comptages cellulaires augmentaient beaucoup peu avant l'épisode clinique, puis redescendaient mais restait supérieur à leur niveau initial (ce qui pourrait être expliqué par la présence de brebis porteuses chroniques ayant des mammites subcliniques).

Le comptage cellulaire de tank (CCT) ne peut être utilisé pour détecter des troupeaux infectés chroniquement, car il ne faut pas oublier l'importance des mammites à *Staphylococcus spp.* chez les petits ruminants, et que leur capacité à infecter chroniquement la mamelle.

De plus, si les brebis sont encore en période d'allaitement, les agneaux risquent une sous-nutrition importante si le berger n'intervient pas. Et sachant que l'excrétion mycoplasmaïque démarre avant l'apparition des signes cliniques, les agneaux peuvent être contaminés par voie orale. Ils risquent alors de développer des septicémies (BERGONIER *et al.*, 2008)

Des cas d'avortements sont aussi décrits, entraînant une perte directe (absence d'agneaux pouvant entraîner une insuffisance d'agnelles de renouvellement).

De rares cas de mortalités sont décrits chez les brebis, ce qui n'est pas le cas chez les chèvres.

Les mesures de biosécurité imposent aux troupeaux positifs de ne pas transhumer, or c'est un des piliers économiques dans ces élevages. C'est pourquoi le GDS a mis en place des indemnités afin que l'équilibre financier ne soit pas trop mis en péril.

B. INTRODUCTION DE LA PCR EN TEMPS REEL.

La PCR utilisée par le laboratoire des Pyrénées a fait la preuve de sa spécificité analytique (absence de réactions croisées) et de sa sensibilité diagnostique (PERENNES, Communication personnelle). L'utilisation récente de cette méthode directement sur le lait a permis d'améliorer la rapidité d'obtention des résultats (3 jours au lieu de 10) (Lagor, 2012). Il s'agit d'une PCR validée en interne par le laboratoire, elle n'est pas disponible dans le commerce.

Cette amplification présente peu de faux-positifs (possible avec *Mycoplasma bovis* qui est cependant très rarement isolé chez les petits ruminants (LORUSSO *et al.* 2007)). En effet, les nouvelles amorces utilisées ciblent une zone du génome spécifique de *Mycoplasma agalactiae* (gène *polC*). Le syndrome de l'agalactie n'est pas uniquement dû à *Mycoplasma agalactiae*, mais chez la brebis les publications montrent que c'est le principal agent ; c'est pourquoi on recherche uniquement ce mycoplasme dans le cas des foyers enzootiques purement ovins (GOMEZ-MARTIN *et al.*, 2013).

III.2. CONTRIBUTION A L'EVALUATION DE LA PCR EN TEMPS REEL APPLIQUEE AU LAIT DE TANK

A. EN ELEVAGES, UN PROTOCOLE SIMPLE POUR UNE ETUDE PRELIMINAIRE

Le LPL avait déjà réalisé les autres parties de la validation de la PCR en temps réel, y compris son application sur lait individuel.

Il restait à évaluer l'application de la PCR à l'échantillonnage de grands volumes de lait. Sachant que l'on ne savait pas si la variabilité serait importante ou pas (ceci n'a jamais été évalué en France pour les mycoplasmes, et cela a très rarement été fait pour la détection de bactéries dans les tanks).

L'objectif était donc de réévaluer la répétabilité et d'évaluer les biais possibles sur l'échantillonnage dans les flacons de lait à la paillasse.

Un protocole simple, de prélèvements a été mis en place, en sachant que si les résultats semblaient montrer une forte variabilité, il faudrait réaliser une étude de plus grande ampleur. En augmentant notamment le nombre d'élevages participant et le nombre de prélèvements par élevage (ce qui aurait augmenté la puissance statistique de l'étude).

Un protocole plus approfondi aurait pu intégrer plusieurs prélèvements, des pipetages plus profonds, d'autres prélèvements à différentes profondeurs du tank, une notification plus précise des mouvements de mélange du tank (difficile car les éleveurs ne savent pas comment ceci est réglé dans leur tank), l'enregistrement des délais entre le mélange et les prélèvements, le nombre de traites, le volume du tank, l'ancienneté du stockage, les élevages vaccinant...

Des systèmes de concentration bactérienne en élevage existent, et il aurait été intéressant de les comparer aux meilleurs résultats (concentrations les plus élevées) obtenus ici : filtre classique de la canne du tank, filtre de porosité plus fine en élevages ou au dépotage des citernes,... prélèvement au goutte à goutte pour améliorer la représentativité (citernes). Tout cela dans l'objectif global d'améliorer les performances de cette clef de voute du diagnostic qu'est devenue la PCR, en particulier sa sensibilité

B. AU LABORATOIRE, UNE ETUDE COMBINEE DE LA REPETABILITE ET DE LA REPRODUCTIBILITE

L'étude de la répétabilité aurait pu être approfondie, en fonction de divers facteurs de variation présumés : ancienneté de prélèvement, conditions d'acheminement, flore annexe, + effets opérateur, enzyme (Taq polymérase),...

Nous avons voulu avoir une estimation des CV de répétabilité maximaux en faisant varier la façon de prélever les laits à la paillasse (= transition de la répétabilité à la reproductibilité). Nous aurions pu comparer avec la façon de faire du LPL en routine c'est-à-dire le mélange des prélèvements avant de pipetage (mais ici il y avait un intérêt à laisser les échantillons sédimenter)

Il aurait par ailleurs été très intéressant de comparer avec la centrifugation effectuée au laboratoire (ou autre méthode de concentration). Car cela aurait permis de comparer les trois fractions obtenues : culot (le plus intéressant), mais aussi l'anneau de graisse et la phase aqueuse. Ainsi le traitement des différentes fractions aurait permis l'identification des phases les plus riches en mycoplasmes

D'autres techniques de concentration bactérienne ont été développées et sont utilisées en diagnostic : en particulier l'immuno-concentration ou immuno-détection ou détection immuno-magnétique. (Utilisation d'anticorps spécifiques pour accrocher les mycoplasmes ; ces anticorps sont adsorbés sur des billes, récupérées à la fin magnétiquement). (GRANTA *et al.*, 2000)

Si la culture seule avait été utilisée, il aurait été intéressant de comparer avant-après lyse (chimique) des cellules pour évaluer la part intracellulaire (phagocytes) des mycoplasmes, puisqu'il s'agit au départ d'infections mammaires (mais cela ne présente pas intérêt pour la PCR).

Notons qu'un travail équivalent a été réalisé par dénombrement sur gélose spécifique après culture en milieu liquide (microplaques) ; une variabilité supérieure ou égale à la nôtre a été obtenue (lié à des variations de viabilité des mycoplasmes en fonction des phases) mais les résultats n'ont pas été abordés ici.

C. INTEGRER LA VARIABILITE DES RESULTATS OBTENUS POUR AMELIORER LA SENSIBILITE DE LA DETECTION

Les moyennes obtenues de certains troupeaux atteignent jusqu'à 10^6 ufc/mL, souvent la traduction de la vaccination (listes des cheptels vaccinant non transmises).

La répétabilité a été évaluée seulement sur des séries limitées de paires de valeurs, mais dépasse pour 3 élevages 8%. Ceci n'étant a priori pas négligeable. Les facteurs de variation de répétabilité devraient être étudiés par le laboratoire afin de les réduire au maximum.

La reproductibilité liée à l'échantillonnage des laits au laboratoire paraît ici la plus élevée : Il semble que prélever au fond du prélèvement de lait (lui-même prélevé en surface ou au fond du tank) optimise le résultat.

Nos résultats montrent que pipeter en surface au laboratoire efface les variations de teneur moyennes liées à l'échantillonnage du tank

Ce point doit être intégré dans la routine des analyses :

Soit en laissant décanter et en pompant au fond. Une sédimentation sur la paillasse, à température ambiante et avec antibiotiques actifs sur les germes à paroi, permettrait en même temps une certaine multiplication des mycoplasmes (et pas des germes Gram+ ou Gram-) avant l'emploi d'une PCR spécifique

Soit, en valorisant cette sédimentation, en la majorant : centrifugation des laits (pas forcément en routine car cela prendrait trop de temps ; mais sur les laits de grand mélange ou les cas particuliers/critiques d'élevages)

Cette technique a déjà été réalisée (BERGONIER D., thèse d'Université, 1996) : centrifugation à 15 000 g pendant 10 minutes (à +4°C pour pouvoir retirer facilement l'anneau de graisse). La perte éventuelle de viabilité des mycoplasmes plaqués au fond importe peu car une PCR était employée par la suite. Cette technique permet l'obtention d'un gain de sensibilité par rapport à la même technique sans centrifugation. Certaines publications associent centrifugation et immuno-détection afin de gagner en sensibilité.

D'autres techniques de concentration existent mais sont plus lourdes (filtration dans colonnes,...).

Le laboratoire pourrait proposer plusieurs PCR, des tarifs différents : PCR de base et PCR optimisée, plus sensible, que le prescripteur (GDS) pourrait choisir en fonction du motif ou contexte.

Reproductibilité liée à l'échantillonnage des tanks :

Au vu de notre protocole, la variabilité liée à la profondeur paraît moins importante que R1 ci-dessus, mais il serait intéressant de le vérifier. Dans l'immédiat, une recommandation simple : continuer à pipeter en haut, mais sans doute il faudrait pipeter en plusieurs endroits et majorer le volume (60 ml serait bien).

Seconde piste : si une amélioration, proposée ci-dessus, ne peut être réalisée au laboratoire, il faudrait envisager de pomper 60 ml au fond des tanks, en plusieurs endroits, en particulier si le prélèvement est réalisé en dehors de la phase de mélange (ou longtemps après). Ce serait à proposer pour une analyse de niveau 2, plus sensible (cf. ci-dessus)

Une seconde étude plus approfondie est conseillée pour voir si on confirme nos résultats, et pour les élargir les connaissances.

Au total, plusieurs modifications techniques permettraient d'augmenter la sensibilité en agissant à tous les stades :

Prélèvement au fond ou juste après mélange

Concentration au labo par centrifugation

Concentration ensuite par immuno-détection

Ces modifications seront nécessaires car la PCR est et deviendra de plus en plus le pilier de cette prophylaxie, car (1) la sérologie Elisa est insuffisante pour raisons techniques (une seule trousse actuelle n'est pas satisfaisante) et physiopathologiques (relation mal connue et sans doute modeste entre la sérologie et l'excrétion), et (2) l'objectif est de détecter/éliminer le réservoir de germes, en particulier en fin de prophylaxie.

III.3. UTILISATION DE LA PCR EN TEMPS REEL ET DE LA SEROLOGIE POUR LA REFORME CIBLEE

A. PERTINENCE DE L'UTILISATION DE LA PCR EN TEMPS REEL

1. Analyses de lait pour détecter les excrétrices

L'excrétion de mycoplasme peut se faire à bas bruit et de façon intermittente, de telle sorte qu'avec un unique prélèvement de lait, on puisse avoir des faux-négatifs. Les prélèvements ont eu lieu au début de la période de traite (voire en période d'allaitement pour les antenaises), période favorable à l'identification d'une excrétion mammaire, mais il est possible que certaines brebis excrétrices n'aient pas été détectées par cette méthode.

Afin d'améliorer la sensibilité de la détection et de réduire les coûts analytiques, les brebis présentant des signes de mammite chronique pouvant être liées à l'agalactie contagieuse ont été notées et l'analyse par qPCR s'est faite en mélangeant le lait de ces animaux.

Les laits ont été regroupés selon l'âge des brebis ; en effet il est plus probable que les brebis présentes au moment de la déclaration aient été contaminées et continues d'excréter (BERGONIER *et al.*2010). A nouveau, en mélangeant le lait de ces animaux, on réduit le nombre de groupes de laits positifs à traiter individuellement (MAURY, 1996)

Lors de ce protocole, les PCR ont été considérées comme positives dès qu'il y avait amplification d'ADN, même avec des Ct très importants (jusqu'à 39).

2. Une surveillance sur le lait de tank au cours de la campagne 2012-2013.

Dans les cheptels 1, 2 et 3, l'analyse du lait de tank n'a plus révélé la présence de mycoplasme au-delà du second (voire premier) prélèvement. L'absence de mycoplasme détectable dans le lait de tank peut soit s'expliquer par la réforme des brebis excrétrices (détectées suite à nos analyses individuelles), soit par une excrétion à trop faible niveau pour être détectable (brebis infectées chroniquement ayant échappé à la détection individuelle).

On sait que l'excrétion est maximale après la mise-bas, les résultats négatifs pourraient aussi être dus au fait que les prélèvements sont trop éloignés dans le temps de l'agnelage, et donc que les brebis n'excrètent pas à ce moment.

Dans le cheptel n°4, tous les prélèvements sur lait de tank sont négatifs, tout comme les mélanges par dix de prélèvements individuels. Ce qui est conforme aux résultats individuels qui étaient tous négatifs en PCR et en sérologie (sauf une brebis).

Concernant le cheptel n°5, qui a subi une rechute clinique d'agalactie contagieuse, on observe une explosion des comptages de mycoplasmes dans le lait de tank.

On peut se demander si la négativation du tank en mars peut être due à la réforme des brebis PCR+ suite aux prélèvements de début de campagne.

3. La surveillance sur le lait de tank au cours de la campagne 2013-2014

L'excrétion galactophore a été surveillée via la positivité du lait de tank au cours de la campagne 2013-2014. La qPCR étant très sensible, le fait de rechercher le mycoplasme sur lait de tank est intéressant, en revanche, il aurait été intéressant de prélever plus souvent après l'agnelage, voire de prélever individuellement les brebis. Ceci aurait augmenté la probabilité de détecter des brebis

faiblement excrétrices ou à excrétion intermittente, qui ont pu passer au travers des prélèvements de lait de tank. Mais pour des raisons de coûts, il a été choisi de se fier aux résultats sur lait de tank.

4. Analyses individuelles de lait

L'élevage n°4 est entièrement négatif : aucune brebis ne semble excréter du mycoplasme.

Dans les cheptels n°2 et 3 on n'observe aucune excrétion de la part des animaux nés après la date de déclaration d'agalactie.

L'élevage n°5 a fait une rechute clinique au cours de la campagne 2013, il sort donc du protocole d'assainissement.

Cet élevage avait déclaré l'agalactie contagieuse en avril 2010, on remarque que les brebis qui excrètent sont celles présentes dans l'élevage au moment de l'épisode clinique et celles nées lors de la campagne suivante (2010).

Les dernières générations ne semblent pas multiplier le mycoplasme.

Près d'un tiers du troupeau est constitué de brebis « 2011 » et « 2012 ». On peut penser que la rechute clinique qu'a subi cet élevage est en partie due au renouvellement du troupeau : une grande proportion de jeunes brebis non immunisées, ce qui fait pencher la balance vers la déclaration d'une forme clinique. (CORRALES J.C. *et al.*, 2006)

Corrales rapporte que cette situation a déjà été observée dans des troupeaux surveillés par son équipe pendant plus de sept ans : les épisodes cliniques sont séparés par des périodes dites asymptomatiques pendant lesquelles aucun mycoplasme n'a pu être isolé, que ce soit dans le lait de tank ou sur les brebis ayant un CMT (Californian Mastitis Test) (CORRALES *et al.*, 2006) entre le mycoplasme et l'immunité du troupeau a été rompue.

B. TESTS SEROLOGIQUES ET SEUILS

1. Concordances des tests sérologiques et seuils utilisés

Deux outils sérologiques ont été utilisés dans le cadre de ce protocole : il s'agit du kit Idexx Pourquier et du kit LSI.

Pour rappel la sensibilité d'un test est son aptitude à détecter les vrais positifs et la spécificité son aptitude à détecter les vrais négatifs.

La valeur prédictive négative (VPN) est la probabilité que l'animal soit véritablement indemne si le test est négatif. La valeur prédictive positive (VPP) est la probabilité que l'animal soit véritablement atteint si le test est positif.

Les animaux ont été testés avec le kit Idexx Pourquier. Le fabricant donne un seuil de positivité au-delà de 60. Cependant c'est la valeur de 30 qui a été considérée comme seuil dans ce protocole.

En effet d'après les travaux de Poumarat (POUMARAT *et al.*, 2012), ce kit est très spécifique mais manque de sensibilité (56%).

Cette étude a montré qu'en diminuant la valeur du seuil on gagne en sensibilité (seuil de 35 : sensibilité 70%) sans perdre en spécificité (proche de 100%). (POUMARAT *et al.*, 2012), LEBRET (communication personnelle) a également réalisé une étude de type Gold Standard sur des troupeaux témoins au Pays Basque, permettant de trouver la meilleure VPN.

Cette dernière étude étant réalisée sur des troupeaux se trouvant dans la zone enzootique, est plus vraisemblable car la VPN dépend de la prévalence de la maladie. Sur 127 troupeaux dont le statut est connu (55 vrais positifs et 72 vrais négatifs), il a démontré que si l'on considère le troupeau positif dès qu'une des valeurs de sérologie est supérieure à 30, la sensibilité est de 91.7% et la spécificité est de 100%.

Alors qu'avec la valeur seuil de 60, la sensibilité n'était que de 80%, la spécificité était aussi de 100%.

Ces valeurs différentes de celles publiées par POUMARAT (POUMARAT *et al.*, 2012), peuvent s'expliquer par la différence de taille de l'échantillon (211 troupeaux) et par la zone géographique d'où proviennent les échantillons.

Les animaux ont également été testés avec le kit LSI. Initialement les seuls animaux ayant droit à cette analyse auraient dû être ceux négatifs en Idexx, mais pour des raisons de collecte de données et dans un but de description et de recherche, une grande majorité des animaux ont également eu une analyse avec le kit LSI.

Ce kit est connu pour être plus sensible (84%) que le kit Idexx (POUMARAT *et al.*, 2012), mais moins spécifique (95.7%).

Le seuil donné par l'exploitant du kit est de 1 (entre 0.8 et 1 les animaux sont considérés comme « douteux »), mais dans le cadre du protocole d'assainissement, la valeur de 2 a été choisie comme seuil pour distinguer les animaux positifs.

LEBRET (communication personnelle) a également réalisé une étude de type Gold Standard afin de déterminer le seuil offrant le meilleur compromis entre la sensibilité et la spécificité (mauvaise pour ce test). Il apparaît d'après ses travaux qu'avec le seuil de 1 (recommandation exploitant) : la spécificité soit inférieure à 7%, la VPN est de 33% pour une sensibilité de 94%. En utilisant le seuil de 2 il semble que l'on gagne en spécificité (82,8%) et la VPN augmente (80%) sans trop perdre en sensibilité (91%).

Il faut toutefois ne pas oublier que ces seuils ont été déterminés à l'échelle collective et permette de savoir si un troupeau peut être considéré comme sain ou infecté. Or c'est l'échelle individuelle qui nous intéresse dans ce protocole.

2. Pertinence de la sérologie dans le protocole

Il faut savoir que la séroconversion est d'environ 10 jours, et que la reconnaissance d'un maximum de protéine se fait 30 jours post-infection. (BERGONIER *et al.*, 2008). Les brebis séropositives le restent environ 40 mois, c'est-à-dire bien au-delà de la lactation en cours. (BERGONIER *et al.*, 2008).

Des faux négatifs peuvent alors exister si les brebis prélevées étaient en période de séroconversion. De plus certaines brebis infectées lors de l'épisode initial peuvent être de nouveau séronégatives si elles n'ont pas de nouveau rencontré le mycoplasme, car dans certains élevages les prélèvements ont eu lieu près de quatre ans après l'épisode clinique. Cependant cela paraît moins probable que les brebis les plus âgées n'aient jamais revu le mycoplasme depuis.

Une étude a démontré la non concordance entre les forts titres en anticorps de certaines brebis et l'excrétion de mycoplasmes. (POUMARAT *et al.*, 2012),

On ne peut donc pas tirer de conclusion sur l'excrétion des brebis séropositives, cependant on sait qu'elles ont rencontré le mycoplasme, puisqu'il y a eu séroconversion. Du fait que les infections mycoplasmiques sont souvent asymptomatiques et persistantes, on peut penser que ces animaux hébergent du mycoplasme et peuvent (ou pourraient ultérieurement) en excréter.

D'autre part, les mycoplasmes se caractérisent par leur capacité à échapper au système immunitaire, ce qui laisse suggérer que certains animaux peuvent être porteurs voire excréteurs sans pour autant avoir développé des anticorps.

Il aurait été plus juste de réaliser les prises de sang au moment du pic de lactation (environ 1 mois après le pic d'agnelage), soit en janvier, car c'est le moment où le titre en anticorps est le plus élevé. Cependant cela aurait nécessité deux interventions dans chaque élevage afin de prélever également les antenaises et brebis dites « tardives ».

De plus, dans un souci d'économies, les brebis ayant été prélevées lors de la campagne de prophylaxie 2012 n'ont pas eu de prélèvement sanguin. Or la sérologie datant de l'été 2012, il est fort probable qu'il y ait des faux-négatifs car le titre en anticorps diminue après le pic de lactation ; certaines brebis devaient même être tarées lors de la prophylaxie annuelle. Il aurait été plus judicieux de les re-prélever afin de diminuer le nombre de faux-négatifs. De plus la liste de ces brebis n'a pas été clairement établie.

3. Résultats avec la trousse Idexx

On observe que dans le cheptel n°1 la moitié des brebis séropositives étaient présentes au moment de l'épisode clinique (3 antenaises et 2 agnelles à l'époque), l'autre moitié des séropositives se répartit sur les trois années suivantes.

Les trois dernières générations semblent ne pas avoir rencontré le mycoplasme, ainsi que les béliers.

Dans le cheptel n°2 près de la moitié des brebis séropositives (9) étaient présentes lors de l'épisode clinique initial de décembre 2008. On peut même suspecter que les trois brebis du millésime « 2008 » ont été contaminées à ce moment-là.

Cinq autres brebis de l'année suivante sont également positives, ce qui suggère une circulation du mycoplasme au moins en 2009-2010.

Les trois dernières générations sont séronégatives, ce qui laisse penser à un arrêt de la circulation de l'agent pathogène depuis la campagne 2010.

Dans le cheptel n° 3 deux-tiers des brebis séropositives étaient présentes dans l'élevage au moment de l'épisode clinique déclaré en juin 2009. On remarque également que trois béliers sont positifs. Tout ceci suggérant que le mycoplasme circule encore au sein de l'élevage.

Dans le dernier élevage (n°5) la grande majorité des brebis était présente au moment de l'épisode clinique d'avril 2010, les autres brebis positives appartiennent au millésime « 2010 », et ont très certainement pu être contaminées au moment de leur naissance (automne 2010-début 2011). *Mycoplasma agalactiae* ne semble plus circuler depuis l'épisode initial, ou du moins pas suffisamment pour entraîner une séroconversion des jeunes générations.

4. Résultats avec la trousse LSI

Un certain nombre de brebis négatives avec la trousse Idexx se sont révélées positives avec la trousse LSI. Ceci peut s'expliquer par un seuil de détection plus bas pour la trousse LSI et donc de nombreux faux-positifs.

Cependant quelques brebis qui étaient positives avec la trousse Idexx se sont révélées négatives avec la trousse LSI, on peut difficilement imaginer des faux-positifs (forte spécificité de la trousse Idexx).

C. ELIMINATION DES BREBIS EXCRETRICES.

Toutes les brebis ayant un résultat positif par PCR quantitative ont été réformées afin d'éliminer les excrétrices qui entretiennent l'infection dans le troupeau.

Ceci semble être très judicieux, puisque ce sont les animaux infectés chroniquement qui entretiennent l'agalactie dans un troupeau, en excréant via le lait. La contamination peut se faire de différentes manières (sécrétions oculaires, voie respiratoire, via le lait/colostrum pour les agneaux) mais le rôle de la traite est majeur (excrétion galactophore).

D. BREBIS PRESENTANT DES SIGNES DE MAMMITES CHRONIQUES.

Lors des prélèvements de lait, les signes de mammites chroniques tels qu'abcès et pis déséquilibrés ont été notés, sans gradation.

Les analyses PCR réalisés sur les laits de ces animaux ne semblent pas montrer un plus fort pourcentage d'excrétion que le reste du troupeau (odds ratio de 1,2). Il est permis de se demander si les prélèvements n'ont pas eu lieu trop tard après la parturition (faux-négatifs bactériologiques) ou si ces signes de mammites chroniques ne sont pas dus à d'autres agents.

En effet chez les petits ruminants, une très large proportion de mammites chroniques (> 70 %) est due à des germes Gram positifs, en particulier des staphylocoques à coagulase négative, qui peuvent persister longtemps dans des mamelles abcédées ou fibrosées (BERGONIER *et al.*, 2002)

E. ELIMINATION DES BREBIS PRESENTANT UN RESULTAT DE SEROLOGIE POSITIF

Concernant l'élevage n°4 une seule brebis était positive en sérologie (brebis 0222, positive avec en Idexx mais pas en LSI) ; elle a été réformée dès l'obtention des résultats.

On peut se poser la question d'un faux-positif étant donné qu'il s'agit d'une antenaise, qui n'était donc pas présente lors de l'épisode clinique de mars 2009 et que toutes les autres brebis, y compris celles présentes à ce moment-là, sont négatives en sérologie.

Cependant, dans un contexte d'assainissement et puisqu'il n'y a qu'un animal concerné, l'éleveur a pu se permettre de le réformer.

Etant donné qu'aucune brebis n'avait été trouvée excrétrice lors des analyses PCR sur lait individuel, cet élevage sort du protocole.

Les autres élevages ont eu respectivement 13 (n°1), 23 (n°2) et 39 (n°3) brebis à reformer.

La liste initiale de réforme du cheptel 5 contenait 57 brebis, mais suite à la rechute clinique, l'élevage a été exclu du protocole et cette liste n'avait plus lieu d'être.

Le choix de reformer tous les animaux séropositifs est discutable, car la nature du lien entre la séropositivité et l'excrétion galactophore n'est pas clairement démontrée. De plus, la fiabilité des résultats obtenus peut-être remise en cause car les prélèvements de sang ont été effectués en mai, et qu'il aurait été plus judicieux de les faire à un mois post agnelage.

Cependant, dans un objectif d'assainissement, il est compréhensible de chercher à éliminer tous les animaux ayant été en contact avec *Mycoplasma agalactiae*. Le nombre d'animaux à reformer n'étant pas très important (sauf pour le cheptel n°3), cela a été rendu possible. Ce dernier cheptel ayant effectué une réforme en deux temps.

F. CAUSES POSSIBLES D'ECHEC DU PROTOCOLE

Dans le cas des élevages de la présente étude, nous n'avons pas enregistré d'échec. En effet non seulement les élevages se sont négativés vis-à-vis du critère de choix (PCR sur lait de tank) après réforme des brebis excrétrices, mais encore cette négativité a été confirmée lors de la campagne suivante (2013-2014).

Nous laissons de côté l'élevage 5 qui correspond à une évolution classique dans cette zone : les rechutes cliniques concernent approximativement 30% des élevages infectés dans les Pyrénées-Atlantiques (GDS 64, 2013). Rien ne permet de relier cette rechute à l'intervention que nous avons réalisée. Cependant on peut noter que les sérologies ont été réalisées après la rechute clinique (prélèvements en mai 2013 et début de l'excrétion massive dans le tank visible à partir de mars 2013). Cependant, ce type de protocole devant être de nouveau mis en œuvre à l'avenir, il peut être utile d'en envisager les limites afin d'améliorer la méthode.

1. Insuffisance de sensibilité et entretien de l'excrétion : rôle des brebis infectées chroniquement

Il est possible, du fait de l'excrétion intermittente, ou sinusoidale au cours de la lactation pour ce qui est du lait, que certaines brebis aient échappé à la détection de l'agent et soient restées dans l'élevage alors qu'elles sont porteuses voire excrétrices de mycoplasme.

Les prélèvements de lait ont eu lieu en janvier, alors que les agnelages ont eu lieu en novembre/décembre. L'excrétion du mycoplasme étant maximale dans les toutes premières semaines suivant la mise-bas, il aurait été plus judicieux d'effectuer les prélèvements à ce moment-là. Cependant, cela signifierait revenir souvent dans les élevages afin de prélever les brebis ayant mis bas au fur et à mesure, ce qui rend la tâche fastidieuse et augmente les coûts (déplacements). Ce point est un facteur limitant significatif sur le terrain.

Les antenaises et brebis mettant bas tardivement ont été prélevées en mars alors que les agnelages ont eu lieu en janvier ; la même question que précédemment se pose.

En l'absence de recontamination extérieure à l'élevage, ces brebis paraissent constituer l'unique source de mycoplasme pouvant entraîner le maintien d'une positivité du cheptel.

Il est possible que certaines brebis n'excrètent pas, même en début de lactation, tout en conservant un foyer infectieux silencieux (lymphocentres rétro-mammaires, autre tissu lymphoïde,...). Nos connaissances sur l'Agalactie permettent de rappeler que la colonisation des ganglions est très large au moins en début d'infection (phase clinique chez les adultes, infections asymptomatiques chez les agneaux). Durant la phase chronique, la colonisation des nœuds lymphatiques rétro-mammaires au moins est probable (BERGONIER *et al.* 1998). Une ré-excrétion peut faire suite non seulement à une mise-bas, mais aussi à une baisse des défenses liées à une infection intercurrente, virale (Pestivirus, ...), parasitaire, ...

L'absence de positivité bactériologique ne garantit donc pas l'indemnité du cheptel. Ce dernier passe alors au statut « en cours d'assainissement ».

2. Rôle des autres animaux et de la faune sauvage

La bibliographie décrit des cas exceptionnels d'isolement de *M. agalactiae* à partir de bovins ou d'animaux sauvages : essentiellement ongulés, au premier rang desquels se trouvent les bouquetins (Alpes ou sud de l'Espagne par exemple) (BERGONIER *et al.* 1998).

Les investigations conduites dans les Pyrénées Atlantiques n'ont pas permis de mettre en évidence de positivité bactériologique ou sérologique à partir de chevreuils ou de cerfs, y compris en zone infectée (GDS64).

Une transmission par les chiens ou chats (vecteur passifs) peut également être évoquée, mais aucun argument expérimental ne va dans ce sens.

La second risque d'échec d'un protocole d'assainissement paraît donc être principalement la recontamination à partir d'un autre troupeau ovin (ou caprin).

3. Recontamination du cheptel

L'absence de contact avec le voisinage (critère d'inclusion initial).

De plus, les éleveurs n'achètent pas d'agnelles de renouvellement (pour éviter d'introduire un animal naïf dans le troupeau et déclencher un épisode clinique). L'achat d'animaux est une source courante de contamination et d'introduction de *Mycoplasma agalactiae* dans un troupeau indemne. (GOMEZ-MARTIN *et al.*, 2013)

En revanche d'une manière plus générale, ce risque paraît réel en zone d'enzootie ou en bordure de celle-ci. Nos connaissances sur l'immunité post-infectieuse (animaux ou troupeaux et n'excrétant plus et redevenus séronégatifs) ne sont pas complètes pour évaluer rigoureusement l'importance de ce risque. En effet :

- la disparition d'anticorps détectables, seul élément recherché sur le terrain sur un plan immunitaire, n'est pas synonyme de disparition de toute protection
- l'état général des animaux, l'absence d'infections intercurrentes et la bonne conduite des troupeaux sont des éléments qui entrent en jeu en cas de nouveau contact avec l'agent de l'infection
- en revanche, les rechutes cliniques sont, nous l'avons vu ci-dessus, à la fois fréquentes (de l'ordre de 30% des troupeaux infectés) et parfois rapides : les plus précoces débutent lors de la seconde campagne après l'épisode initial. Elles affectent essentiellement les animaux considérés comme naïfs (première et deuxième lactation surtout). Ces rechutes nécessitent cependant a priori une contamination intense et/ou réitérée à partir des adultes
- des protocoles qui évolueraient, pour des raisons financières ou pratiques, vers la prééminence de la détection sérologique par rapport à la PCR pourraient faire encourir le risque d'un maintien du réservoir tout en éliminant des animaux partiellement protégés.

G. PERTINENCE D'UN PROTOCOLE D'ASSAINISSEMENT PAR ABATTAGE PARTIEL.

1. Un abattage total du troupeau difficile en région enzootique

Historiquement, il était recommandé aux éleveurs de faire abattre tout leur troupeau afin d'éliminer tout portage chronique asymptomatique de *Mycoplasma agalactiae*.

En effet, de par sa forte contagiosité et sa persistance dans le troupeau de façon silencieuse, cela semble être la solution de choix. Une désinfection du matériel, du bâtiment, ainsi qu'un vide sanitaire permettent d'éliminer les mycoplasmes présents dans l'environnement.

Ce type de mesure coûte cher à la collectivité (éleveurs et territoire), pose des problèmes compréhensibles d'adhésion (attachement du berger à son cheptel) et surtout n'empêche pas la recontamination.

De plus, se pose le problème du renouvellement du troupeau avec des races locales à faible effectif (Manech à tête rousse, Manech à tête noire et Basco-Béarnaise).

L'abattage total subventionné reste donc valable en zone indemne.

2. Un ciblage essentiel des animaux excréteurs pour diminuer la prévalence

Le présent protocole cible des troupeaux infectés chroniquement sur un mode asymptomatique ; c'est là toute la difficulté pour éradiquer les animaux porteurs.

Avec le renouvellement du troupeau il y a possibilité d'un nouvel épisode clinique 4-5 ans après le premier (= déclaration d'agalactie) car les jeunes ne sont pas immunisés. (CORRALES *et al.*, 2006) (GOMEZ-MARTIN *et al.*, 2013) (BERGONIER : communication personnelle). C'est d'ailleurs ce qui s'est passé avec le cheptel 5. C'est également possible suite à un stress dans le troupeau (déséquilibre de la ration, carences, ...) (GOMEZ-MARTIN *et al.*, 2013)

Ce protocole a pour objectif de voir si en éliminant les brebis excrétrices on arrive à stopper la contamination du troupeau.

Un essai de protocole d'assainissement en 1995 uniquement basé sur les profils sérologiques des brebis a été mené. Ce fut un échec : l'élimination des brebis avec les taux d'anticorps les plus élevées n'a pas permis d'assainir les troupeaux et certaines brebis peu positives ont vu leur taux d'anticorps augmenter et devenir fortement positif l'année suivante. (COSSEC, 1995)

Une autre méthode a donc été utilisée ici, non basée uniquement sur la sérologie.
Il ne faut toutefois pas oublier l'avancée des moyens diagnostiques qui a eu lieu depuis.

Les élevages n'ont pas eu de contact avec l'extérieur au cours du protocole d'assainissement donc il n'y a à priori pas pu y avoir de recontamination par une source extérieure.

Ce protocole vise à éliminer en premier lieu les brebis excrétrices détectées à l'aide de la qPCR puis celles qui ont été en contact avec le mycoplasme (visible grâce à la sérologie). On ne peut cependant exclure des faux-négatifs.

CORRALES recommande le même plan d'action suivi d'une désinfection de l'élevage voire même de la prise d'échantillons auriculaires afin de déterminer les animaux porteurs séronégatifs. (CORRALES *et al*, 2006)

Les résultats sont encourageants et semblent confirmer l'importance de la PCR dans la détection des animaux à éliminer.

CONCLUSION

Au cours des deux volets de notre étude, deux aspects ont été abordés : la détection et le suivi des troupeaux positifs (prophylaxie obligatoire) et la détection des animaux infectés, dans un but d'élimination. Ce sont deux aspects complémentaires de la prophylaxie sanitaire élaborée contre l'Agalactie Contagieuse dans les Pyrénées-Atlantiques.

L'évaluation de la PCR appliquée aux laits de grands volumes a permis d'attirer l'attention des différents acteurs de ce programme de lutte sur la nécessité d'être tout aussi rigoureux avant (échantillonnage et conservation) et après (valorisation des résultats) la réalisation de la PCR que pour l'amplification elle-même. Les résultats obtenus, mettant en évidence une variabilité non négligeable dans des tanks correctement mélangés, laissent présager l'existence d'une variance plus nette si le prélèvement est réalisé longtemps après mélange ou dans des bidons. Cette étude préliminaire serait à reproduire à plus grande échelle, à divers stades de lactation et en fonction des différentes conditions techniques de stockage du lait.

Par ailleurs, au sein des troupeaux infectés, la PCR permet de détecter les animaux excréteurs susceptibles d'entretenir la circulation du germe. Les résultats obtenus sur les trois cheptels en cours d'assainissement sont encourageants, ils restent à ce jour négatifs ; ces troupeaux sont cependant à surveiller car on ne peut exclure définitivement une future rechute. Après complément de suivi de ces cheptels et de validation de ce protocole (relation excrétion-sérologie), l'objectif serait de pouvoir appliquer cette méthode à un plus grand nombre de troupeaux compte tenu de la situation épidémiologique actuelle. Parmi les facteurs limitants, restent encore la promiscuité entre certains troupeaux et, d'autre part, le risque de rechute (interne au troupeau). Les travaux à développer à l'avenir pourraient donc être d'une part de poursuivre la caractérisation des facteurs de risque de ces rechutes et, d'autre part, d'élaborer un plan d'assainissement progressif fondé sur le « zonage » et la géolocalisation.

Bibliographie

Groupement de Défense Sanitaire protocole d'assainissement. (2012)

A. BRESSOLIN.(2011) *Reproduction expérimentale de l'agalactie contagieuse à Mycoplasma agalactiae chez la brebis en lactation.* Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse. 65

A.C. SEGURET.(2011) *Excrétion galactophore et cinétiques sérologiques après inoculation de brebis en lactation par Mycoplasma agalactiae.* Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse. 152

AMORES J. DE LA FE C., GOMEZ-MARTIN A., CORRALES J.C., CONTRERAS A., SANCHEZ A.(2011) Preserved goat milk as a valid sample for the PCR detection of *Mycoplasma agalactiae*. *Small Ruminant Research*, 99, 61-64

ARIZA-MIGUEL J. RODRIGUEZ-LAZARO D., HERNANDEZ M. (2012) A survey of *Mycoplasma agalactiae* in dairy sheep farms in Spain. *BMC Veterinary Research*, 8 :171

BECKER C.A.M. RAMOS F., SELLAL E., MOINE S., POUMARAT F., TARDY F.(2012) Development of a multiplex real-time PCR for contagious agalactia diagnosis in small ruminants. *Journal of Microbiological Methods*, 90, 73-79

BERGONIER.(1996) "Etude de la variabilité intraspécifique de *Mycoplasma agalactiae*" thèse d'Université (Lyon I).

BERGONIER D. BERTHELOT X.(2002) New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livestock Production Science*, 79, 1-16

BERGONIER D. BERTHELOT X.(2008) Mycoplasmoses des petits ruminants : le syndrome de l'agalactie contagieuse. *Livestock Production Science*, 79, 1-16

BERGONIER D. BERTHELOT X., POUMARAT F. (1997) Contagious agalactia of small ruminants : current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 16, 848-876

BERGONIER D. BLAZIOT J., LARRICQ J-M., TICOULET D., ARRANZ JM., BERTHELOT X.(2010) Agalactie contagieuse des petits ruminants : situation épidémiologique et mesures de contrôle. *Bulletin des GTV* - 56.

BERGONIER D.(2012) Correction du protocole GDS.

BERGONIER D.(2012) Cours sur l'agalactie contagieuse des petits ruminants.

BUONAVOGLIA D. GRECO G., CORRENTE M., GRECO MF., D'ABRAMO M., LATRONICO F., FASANELLA A., DECARO N.(2010) Long-term immunogenicity and protection against *Mycoplasma agalactiae* induced by and oil adjuvant vaccine in sheep. *Research in Veterinary Science*, 88, 9-16

CASTRO-ALONSO A. RODRIGUEZ F., DE LA FE C., ESPINOSA DE LOS MONTEROS A., POVEDA J.B., ANDRADA M., HERRAEZ P.(2008) Correlating the immune response with the clinical-pathological course of persistent mastitis experimentally induced by *Mycoplasma agalactiae* in dairy goats. *Research in Veterinary Science*, 88, 16-19

CHAZEL M. TARDY F., LE GRAND D., CALAVAS D., POUMARAT F.(2010) Mycoplasmoses of ruminants in France: recent data from the national surveillance network. *BMC Veterinary Research*, 6, 32

CHOPRA-DEWASTHALYA R. MARENDA M., ROSENGARTEN R., JECHLINGER W., CITTI C.(2005) Construction of the first shuttle vectors for gene cloning and homologous recombination in *Mycoplasma agalactiae*. *FEMS Microbiology letters*, décembre, 89-94

CORRALES J.C. ESNAL A., DE LA FE C., SANCHEZ A., ASSUNCAO P., POVEDA J.B., CONTRERAS A.(2006) Contagious agalactia in small ruminants. *Small Ruminant Research*, 68, 154-166

LE COSSEC (1995) *L'agalaxie contagieuse des petits ruminants : étude d'un protocole d'assainissement dans les Pyrénées-Atlantiques*. Thèse de doctorat vétérinaire, Nantes. 84

de GARNICA ML. ROSALES RS., GONZALO C., SANTOS JA., NICHOLAS RAJ.(2013) Isolation, molecular characterization and antimicrobial susceptibilities of *Mycoplasma agalactiae* from bulk tank milk in an endemic area of Spain. *Journal of Applied Microbiology*, 114(6):1575-81

DE LA FE C. GOMEZ-MARTIN A., AMORES J., CORRALES J.C., SANCHEZ A., POVEDA J.B., CONTRERAS A.(2009) Latent infection of male goats with *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subspecies capri at an artificial insemination centre. *Veterinary Journal*, 186(1):113-5

GOMEZ-MARTIN A. AMORES J., PATERNA A., DE LA FE C.(2013) Contagious agalactia due to *Mycoplasma* spp. In small dairy ruminants: Epidemiology and prospects for diagnosis and control. *The Veterinary Journal*, 198, 48-56

GRANTA I.R. POPEA C.M., O'RIORDANA L.M., BALLB H.J., ROWEA M.T.(2000). Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR. *Veterinary Microbiology*, 77, 369-378

KITTELBERGER R. O'KEEFE JS., MEYNELL R., SEWELL M., ROSATI S., LAMBERT M., DUFOUR P., PEPIN M.(2006) Comparison of four diagnosis tests for the identification of serum antibodies in small ruminants infected with *Mycoplasma agalactiae*. *New Zealand Veterinary Journal*, 54(1):10-5.

Lagor Laboratoire de présentation QPCR sur lait. - 2012.

LAMBERT M. CALAMEL M., DUFOUR P., CABASSE E., VITU C., PEPIN M.(1998) Detection of false-positive sera in contagious agalactia with a multiantigen ELISA and their elimination with a protein G conjugate. *Journal of Diagnostic Investigation*, 10, 326-330

LORUSSO A. DECARO N., GRECO G., CORRENTE M., FASANELLA A., BUONAVOGLIA D.(2007) A real-time PCR assay for detection and quantification of *Mycoplasma agalactiae* DNA. *Journal of Applied Microbiology* ISSN, 1364-5072

MARENDA MS. SAGNE E., POUMARAT F., CITTI C. (2005) Suppression subtractive hybridization as a basis to assess *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* genomic diversity and species-specific sequences. *Microbiology*, 151, 475-489

MAURY.(1996) *Intérêt de la recherche de Mycoplasma agalactiae dans les laits de mélange*. Thèse de doctorat vétérinaire, Nantes. 76

ORAVCOVA K. LOPEZ-ENRIQUEZ L., RODRIGUEZ-LAZARO D., HERNANDEZ M.(2009) *Mycoplasma agalactiae* p40 Gene, a novel marker for diagnosis of contagious agalactia in sheep by real-time PCR : assessment of analytical performance and in-house validation using naturally contaminate milk samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 445-450

P. LEBRET.(1989) *Agalaxie contagieuse des petits ruminants. Evolution de la maladie et des systèmes de contrôle dans le département des Pyrénées-Atlantiques 1966-1988*. Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse.

POUMARAT F. LE GRAND D., GAURIVAUD P., GAY E., CHAZEL M., GAME Y., BERGONIER D.(2012) Comparative assessment of two commonly used commercial ELISA tests for the serological diagnosis of contagious agalactia of small ruminants caused by *Mycoplasma agalactiae*. *BMC Veterinary Research*, 8, 109

RODRIGUEZ J.L. POVEA J.B., RODRIGUEZ F., ESPINOSA DE LOS MONTEROS A., RAMIREZ A.S., FERNANDEZ A.(1995). Ovine infectious keratoconjunctivitis caused by *Mycoplasma agalactiae*. *Small Ruminant Research*, 22, 93-96

TICOULET (2001) *Contrôle de l'agalactie contagieuse de la brebis : validation de la recherche directe de Mycoplasma agalactiae dans le lait de tank*. Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse. 53

TOLA S. ANGIOI A., ROCCHIGIANI A.M., IDINI G., MANUNTA D., GALLERI G., LEORI G.(199) Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, 54, 17-22

TOLA S. IDINI G., MANUNTA D., GALLERI G., ANGIOI A., ROCCHIGIANI A.M., LEORI G.(1996) Rapid and specific detection of *Mycoplasma agalactiae* by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, 51, 77-84

ANNEXES

millésime	nombre total de brebis	nombre de brebis positives	pourcentage de brebis positives
2004	1	0	0,00
2006	21	1	4,76
2007	25	1	4,00
2008	36	1	2,78
2009	34	1	2,94
2010	41	1	2,44
2011	38	0	0,00
R	7	0	0,00
total	203	5	2,46

Figure 29 : Répartition des brebis excrétrices, par âge du cheptel n°1.

millésime	nombre total de brebis	nombre de brebis positives	pourcentage de brebis positives
2003	3	0	0,00
2004	9	0	0,00
2005	14	1	7,14
2006	19	0	0,00
2007	29	0	0,00
2008	37	1	2,70
2009	36	0	0,00
2010	58	0	0,00
2011	10	0	0,00
R	10	1	10,00
total	225	3	1,33

Figure 30 : Répartition des brebis excrétrices, par âge du cheptel n°2.

millésime	nombre total de brebis	nombre de brebis positives	pourcentage de brebis positives
2004	3	1	33,33
2005	9	0	0,00
2006	24	5	20,83
2007	40	6	15,00
2008	44	2	4,55
2009	51	2	3,92
2010	60	0	0,00
2011	63	0	0,00
2012	39	0	0,00
total	333	16	4,80

Figure 31 : Répartition des brebis excrétrices, par âge du cheptel n°3.

millésime	nombre total de brebis	nombre de brebis positives	pourcentage de brebis positives
2004	1	0	0,00
2005	8	1	12,50
2006	18	3	16,67
2007	30	3	10,00
2008	47	2	4,26
2009	39	3	7,69
2010	41	2	4,88
2011	55	0	0,00
2012	47	0	0,00
total	286	14	4,90

Tableau 9 : Répartition des brebis excrétrices, par âge du cheptel n°5.

millésime	nombre d'animaux	nombre d'animaux positifs	% d'animaux positifs
2004	1	0	0,0
2006	16	3	18,8
2007	20	2	10,0
2008	33	3	9,1
2009	39	1	2,6
2010	43	0	0,0
2011	44	0	0,0
2012	47	0	0,0
R	5	1	20,0
Béliers	9	0	0,0
total	257	10	3,9

Tableau 10 : Répartition des animaux positifs avec len kit Idexx, par classe d'âge dans le cheptel n°1.

millésime	nombre d'animaux	nombre d'animaux positifs	% d'animaux positifs
2003	2	1	50,0
2004	4	0	0,0
2005	12	2	16,7
2006	18	3	16,7
2007	28	3	10,7
2008	38	3	7,9
2009	40	5	12,5
2010	41	0	0,0
2011	48	0	0,0
2012	57	0	0,0
R	6	2	33,3
Béliers	11	0	0,0
total	305	19	6,2

Tableau 11 : Répartition des animaux positifs avec le kit Idexx, par classe d'âge dans le cheptel n°2.

millésime	nombre d'animaux	nombre d'animaux positifs	% d'animaux positifs
2004	4	0	0,0
2005	7	1	14,3
2006	20	1	5,0
2007	31	7	22,6
2008	42	9	21,4
2009	49	5	10,2
2010	62	0	0,0
2011	61	1	1,6
2012	70	0	0,0
béliers	18	3	16,7
total	364	27	7,4

Tableau 12 : Répartition des animaux positifs avec le kit Idexx, par classe d'âge dans le cheptel n°3.

millésime	nombre d'animaux	nombre d'animaux positifs	% d'animaux positifs
2004	1	0	0,0
2005	7	1	14,3
2006	16	6	37,5
2007	28	1	3,6
2008	46	5	10,9
2009	41	9	22,0
2010	40	4	10,0
2011	64	0	0,0
2012	62	0	0,0
béliers	8	2	25,0
1 sans numéro	1	0	0,0
total	314	28	8,9

Tableau 13 : Répartition des animaux positifs avec le kit Idexx, par classe d'âge dans le cheptel n°5.

	nombre d'animaux	LSI +	% LSI +	LSI douteux	% LSI douteux
2004	1	0	0,00	0	0,00
2006	15	2	13,33	2	12,50
2007	20	0	0,00	6	30,00
2008	33	6	18,18	4	12,12
2009	39	0	0,00	2	5,13
2010	43	0	0,00	0	0,00
2011	44	0	0,00	1	2,27
2012	47	0	0,00	0	0,00
R	5	1	20,00	2	40,00
Béliers	9	0	0,00	0	0,00
total	256	9	3,52	17	6,61

Tableau 14 : Répartition des animaux positifs et douteux avec le kit LSI par classe d'âge du cheptel 1.

millésime	nombre d'animaux	LSI +	% LSI +	LSI douteux	% LSI douteux
2003	1	0	0,00	0	0,00
2004	4	0	0,00	1	25,00
2005	12	2	16,67	2	16,67
2006	17	2	11,76	0	0,00
2007	27	3	11,11	5	17,86
2008	36	1	2,78	5	13,16
2009	40	2	5,00	5	12,50
2010	40	0	0,00	0	0,00
2011	48	0	0,00	1	2,08
2012	57	0	0,00	1	1,75
R	5	0	0,00	1	16,67
Béliers	11	0	0,00	0	0,00
total	298	10	3,36	21	6,89

Tableau 15 : Répartition des animaux positifs et douteux avec le kit LSI par classe d'âge du cheptel 2.

millésime	nombre d'animaux	LSI +	% LSI +	LSI douteux	% LSI douteux
2004	4	0	0,00	2	50,00
2005	7	2	28,57	3	42,86
2006	20	1	5,00	15	75,00
2007	28	4	12,90	16	51,61
2008	41	9	21,43	24	57,14
2009	49	9	18,37	17	34,69
2010	62	0	0,00	2	3,23
2011	61	1	1,64	2	3,28
2012	70	0	0,00	7	10,00
béliers	18	4	22,22	5	27,78
total	360	30	8,24	93	25,55

Tableau 16 : Répartition des animaux positifs et douteux avec le kit LSI par classe d'âge du cheptel 3.

millésime	nombre d'animaux	LSI +	% LSI +	LSI douteux	% LSI douteux
2004	1	1	100,00	0	0,00
2005	7	3	42,86	2	28,57
2006	15	7	46,67	5	33,33
2007	28	6	21,43	19	67,86
2008	45	11	24,44	26	57,78
2009	39	7	17,95	26	66,67
2010	39	4	10,26	16	41,03
2011	64	0	0,00	3	4,69
2012	62	0	0,00	10	16,13
béliers	8	3	37,50	1	12,50
1 sans numéro	1	0	0,00	0	0,00
total	309	42	13,38	108	34,39

Tableau 17 : Répartition des animaux positifs et douteux avec le kit LSI par classe d'âge du cheptel 5.

Buysse Marie

EVALUATION DE LA PCR EN TEMPS RÉEL POUR LA DETECTION DES TROUPEAUX ET DES ANIMAUX INFECTÉS PAR *MYCOPLASMA AGALACTIAE*.

PCR-Agalactie Contagieuse-*Mycoplasma agalactiae*-assainissement-abattage partiel

Résumé

L'Agalactie Contagieuse ovine due à *Mycoplasma agalactiae* sévit au Pays Basque de façon enzootique. Son incidence est aujourd'hui proche de zéro, mais sa prévalence diminue peu.

La prophylaxie sanitaire mise en place par le Groupement de Défense Sanitaire, en partenariat avec le Laboratoire des Pyrénées et des Landes (LPL) repose du point de vue analytique sur la détection des troupeaux infectés par PCR appliquée au lait de tank et, secondairement, par sérologie Elisa.

Le premier volet de la présente étude évalue la répétabilité et la reproductibilité de la PCR en temps réel, récemment proposée par le LPL, lorsqu'elle est appliquée à des laits de grand volume (tanks). Les variances de reproductibilités obtenues amènent à proposer la mise en place d'une étude de plus grande ampleur, et éventuellement d'optimiser la concentration des mycoplasmes dans les volumes de lait.

Le second volet décrit un protocole d'assainissement par abattage partiel mis en place pour l'Agalactie. La négativation des troupeaux suivis a été obtenue (et conservée) après réforme des brebis positives. Il convient cependant de poursuivre le suivi de ces troupeaux et, pour l'avenir, de mieux connaître la valeur prédictive de la sérologie Elisa par rapport à l'excrétion.

REAL-TIME PCR EVALUATION FOR THE DETECTION OF *MYCOPLASMA AGALACTIAE* INFECTED HERDS AND ANIMALS

PCR-Contagious Agalactia-*Mycoplasma agalactiae*-purification-partial slaughter

Contagious Ovine Agalactia, mainly due to *Mycoplasma agalactiae* is enzootic in the Basque Country. Its incidence is next to zero but the prevalence doesn't get lower.

The sanitary prophylaxy established by the GDS (Sanitary Defense Groupement) together with the LPL (Landes and Pyrénées Laboratory), from an analytic point of view, consists in the detection of infected herds by real-time PCR on bull tank milk and in a second time in ELISA-serologies.

This first point of this study evaluates the repeatability and reproducibility of the real-time-PCR, recently suggested by the LPL, when applied on large volumes (bull-tank). The reproducibility variances formed lead to suggest the establishment of a larger scale study. It's also considered to optimize mycoplasma concentration in milk.

The second point, describes a purification protocol established through partial slaughter around Contagious Agalactia. Herds were and are still negative after slaughtering positives ewes. However, it's necessary to follow up herds and in the future to better know the predictive value of ELISA-serologies relatively to excretion.