



## 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 : 13322

**To cite this version :**

Brugel, Charlotte. *Interprétation des réponses sérologiques non-négatives vis-à-vis de Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (Map) dans des situations de faible prévalence de l'infection*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2014, 129 p.

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

# INTERPRETATION DES REPONSES SEROLOGIQUES NON-NEGATIVES VIS-A-VIS DE MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP PARATUBERCULOSIS DANS DES SITUATIONS DE FAIBLE PREVALENCE DE L'INFECTION

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

*par*

**BRUGEL Charlotte**  
Née, le 27 avril 1987 à Metz (57)

---

**Directeur de thèse : M. Gilles FOUCRAS**

---

## JURY

PRESIDENT :  
**M. Bruno MARCHOU**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :  
**M. Gilles FOUCRAS**  
**M. Renaud MAILLARD**

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

## Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

**Directeur** : M. Alain MILON

### PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **CORPET Denis**, *Sciences de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

### PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*

### PROFESSEURS 2° CLASSE

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **IGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

#### PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*  
M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

#### MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*  
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*  
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*  
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*  
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

#### MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*  
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*  
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*  
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*  
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*  
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie* **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*  
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*  
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*  
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*  
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*  
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*  
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*  
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*  
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*  
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*  
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*  
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*  
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*  
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

#### MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*  
Mme **FERNANDEZ Laura**, *Pathologie de la reproduction*

#### ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*  
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*





REMERCIEMENTS
---------------

\*\*\* Au jury de thèse \*\*\*

**A Monsieur le Professeur Bruno MARCHOU**

Professeur des Universités

Chef de Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, UFR Toulouse Purpan

*Qui nous fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de thèse,*

*Hommages respectueux.*

**A Monsieur le Professeur Gilles FOUCRAS**

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologies des ruminants

*Pour avoir proposé et encadré cette étude et pour avoir apporté son aide précieuse dans sa réalisation,*

*Sincères remerciements.*

**A Monsieur le Docteur Renaud MAILLARD**

Maitre de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie des ruminants

*Pour nous avoir fait l'honneur d'accepter de participer à notre jury de thèse.*

*Sincères remerciements.*

**\*\*\* Aux personnes ayant aidé à la réalisation de cette étude**

**\*\*\***

**Au Docteur Jean LAIGLE et à ses associés**

Docteurs vétérinaire : Clinique vétérinaire Jeanne d'Albret, Foix

*Pour avoir été à l'initiative du projet et aidé à sa réalisation,*

*Sincères remerciements.*

**A Loïc COMTET**

Responsable du département Développement – R&D Manager chez ID.vet

*Pour sa participation et sa disponibilité,*

*Sincères remerciements.*

**A Béatrice BLANCHARD**

R&D Manager, franchise vétérinaire, Biomérieux

*Pour le soutien technique fourni,*

*Sincères remerciements.*

**A Laura OLAGNON et son équipe**

Service développement chez ID.vet

*Pour leur participation active à l'étude et leur disponibilité,*

*Sincères remerciements.*

**A Cécile CAUBET et Christian TASCA**

Techniciens de laboratoire à l'ENVT

*Pour leur aide précieuse lors des manipulations faites à l'ENVT,*

*Sincères remerciements.*

**Aux éleveurs ayant participé à l'étude**

*Pour leur motivation sans faille et leur implication dans cette étude,*

*Sincères remerciements.*



\*\*\* **A ma famille** \*\*\*

Mes premiers remerciements personnels vont à mes parents, et ma sœur. Ces quelques mots ne suffiront pas à vous montrer combien vous êtes importants à mes yeux, combien votre soutien dans les épreuves récentes et passées est primordial à mon équilibre. Je vous aime. Vraiment. Aline, loin des yeux en ce jour, près du cœur pour toujours.

Je tiens à remercier mamie et oma pour leur force de caractère dont je devrais m'inspirer plus souvent.

A toute la joyeuse tribu Brugel-Fladaush, vous êtes des battants chacun de votre côté, mais au final votre amour de la famille nous rassemble.

\*\*\* **A mes amis** \*\*\*

Aux cocottes,

L'inégalable **Chloé** Brugel ou Charlotte Durussel je ne sais plus trop, ma petite power girl bien plus forte que ce qu'on ne le croit, ton énergie m'a souvent aidée, toujours plein de ressources, je t'ai démasqué catwoman !

**Flora** mon œuf de cœur, je serai toujours là pour toi et pour te soutenir dans tes aspirations à changer le monde au moins à ton échelle, nos discussions interminable et ton riz parfait à l'irakienne vont me manquer ;

**Camille**, pour ta bonne humeur et la sérénité que tu dégages, notre découverte du Mexique et des mexicains, notre super binôme de grosses durant une année du rugby, tes vieilles somnolences de fin de soirées, et ta « basquattitude » resteront inoubliables ;

**Tifenn** (Mme Sutton !), te voilà loin d'ici pour un nouveau départ, mais tous nos moments partagés, ton sourire de bretonne auront toujours une place dans mon cœur, à très vite, et j'espère que les agrafes américaines ne sont pas plus grosses que les françaises.

Aux irréductibles,

**Clément**, nous avons vécu de belles émotions ensemble au Mexique notamment (ou même à trois), merci de nous avoir fait découvrir l'Écosse et ta belle région et surtout merci aux triples conversations, je ne sais toujours pas si ton côté râleur m'énerve ou m'attendrit, joyeux luron angoissé reste comme tu es ;

**Dédé**, toujours prête à me donner un coup de main même en lendemain de GROSSE soirée, tes (nos) aventures aux urgences ; ton entrain et ta force de caractère m'ont toujours épatés notamment sur le terrain ;

**Pauline**, merci à Munich de nous avoir rapprochées pour le pire et surtout pour le meilleur, on se connaît sous toutes les coutures et je suis tellement avide de pouvoir partager d'autres moments de folies avec toi, ne change pas ;

**Marlène**, « on se suit » un jour, peut être toujours, ma plus ancienne, peut-être même ma meilleure amie (comme disait l'autre), ça y est c'est dit. A quand notre voyage en Asie ? ;

**Isabelle**, tes expressions décalées et ton regard narquois m'ont toujours ramené le sourire, tu es comme un rayon de soleil à chaque fois que je te vois.

Aux anciens du Jungle (ça va vous suivre toute votre vie), **Delphine W**, pour nos journées bibli ratées, nos débats cinématographiques débridés, et toutes tes petites attentions, **Dodie**, **Fanny**, **Florent**, **Sarah**, **Samuel** vous formez une belle bande, carrément improbable, mais qu'on ne peut qu'adorer, **Guillaume** et **Enrico** pour votre bonne humeur, vos blagues vaseuses et votre spontanéité.

A mes copromos, notamment **Salim**, pour nos soirées cinés, toujours prêt à rendre service, **Hugo** pour m'avoir laissé perdre, je n'oublierai jamais qu'elle a perdu une oreille, continue à aller de l'avant.

A mes camarades du semestre de bovine pour ces moments de bonheur et de galères partagés (oohhhhh !), **Jérémie**, **Grégoire**, **Elise**, **Marguerite**, **Elsa**, **Claire**, **Lucie**, **Steph**, **Elodie**, **Sophie** et toute la fine équipe de bobo, merci pour votre patience et votre self control notamment les samedi matins..

A mes poulots adorés et plus particulièrement à **Delphine** et **Gwen**, courage les filles vous tenez le bon bout et surtout qu'on ne se perde pas de vue, je compte sur vous.

A mes camarades de prépa(s), **Amandine**, sans toi je n'aurais certainement pas eu le concours, l'incroyable duo que personne n'attendait à ce niveau ; **Sabine**, quand je mange une mandarine je pense à toujours à toi ; **Geoffrey**, fiston ton éducation est un perpétuel échec mais je t'adore.

A mes amis du BTS, avec qui j'ai fait mes premières armes dans la ville de Toulouse et que je ne revois que trop peu : **Christelle, Mathieu, Thomas**, vous formez une sacrée belle bande de niokis, restez fous comme vous êtes, mais aussi **Loïc, Sophie, Eloïse, Fabienne, Laure-Hélène**, j'espère vous revoir bientôt.

A **Félix**, pour ta simplicité et pour m'avoir donné goût à la rando, même pour les versions « super champion », grâce à toi je peux dire que j'ai vu le plus haut sommet d'Ecosse.

A **Camille** et **Lucile**, nos 400 coups d'adolescentes ont été un exutoire !

\*\*\* **Spécial** \*\*\*

Merci à Pauline pour m'avoir hébergée et soutenue moralement durant la dernière ligne droite et jusqu'au DERNIER moment.

Merci à Clément et à son doigté extraordinaire, inné, pour le touillage de bouses de bovins atteints de paratuberculose, qui m'ont épargnée plusieurs heures de travail.



TABLE DES MATIERES
--------------------

REMERCIEMENTS .....	7
TABLE DES MATIERES .....	13
TABLE DES ILLUSTRATIONS .....	17
TABLE DES ABREVIATIONS.....	18
INTRODUCTION .....	21
PARTIE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	23
1. CARACTERISTIQUES DE LA PARATUBERCULOSE.....	25
1.1. Caractéristiques biologiques de l'agent <i>Mycobacterium avium</i> subsp <i>paratuberculosis</i> (Map) .....	25
1.1.1. Réceptivité des animaux.....	25
1.1.2. Matières virulentes et voies de transmission.....	25
1.2. Mécanismes immuno-pathologiques de la paratuberculose .....	26
1.2.1. Evolution des réponses immunitaires au cours de l'infection.....	26
1.2.1.1. Réponse immunitaire à médiation cellulaire .....	26
1.2.1.2. Modification du profil de réponse .....	27
1.2.2. Remise en cause du modèle classique d'évolution de la réponse immunitaire vis- à-vis de Map .....	28
1.3. Nature et évolution de l'excrétion fécale .....	29
1.3.1. Excréteurs transitoires .....	29
1.3.2. Intensité de l'excrétions .....	30
1.3.3. Notion de super-excréteur .....	31
1.3.4. Dose infectante .....	31
1.3.5. Notion d'excrétion passive.....	31
1.3.6. Classification selon Nielsen et Toft (2008).....	32
1.4. Stades de la maladie .....	32
1.5. Lésions tissulaires .....	33
2. EXAMENS DE LABORATOIRE POUR LE DIAGNOSTIC DE LA PARATUBERCULOSE.....	34
2.1. Valeur informative des tests utilisés.....	34
2.1.1. Test de référence ou Gold standard (Toma, 2001).....	34
2.1.2. Sensibilité.....	35
2.1.3. Spécificité.....	35
2.1.4. Valeurs prédictives.....	35
2.1.5. Prévalence intra-troupeau.....	36
2.1.6. Prévalence des troupeaux infectés.....	36
2.2. Facteurs de variations de la sensibilité et de la spécificité des tests .....	37
2.2.1. Méthodes de choix en fonction du stade de l'infection.....	37
2.2.2. Seuil de positivité (ou cut-off ) et seuil de détectabilité.....	38
2.3. Techniques de laboratoire pour la détection directe de <i>Map</i> .....	39

2.3.1. Bactérioscopie .....	39
2.3.2. Histopathologie .....	39
2.3.3. Isolement par culture bactériologique à l'échelon individuel .....	40
2.3.3.1. Caractéristiques de la croissance de <i>Map</i> .....	40
2.3.3.2. La coproculture individuelle .....	40
2.3.3.3. Culture bactériologique sur échantillon de lait individuel .....	45
2.3.3.4. Culture à partir de prélèvements tissulaires.....	45
2.3.4. PCR sur échantillons individuels de fèces .....	46
2.4. Tests pour la détection de la réaction immunitaire vis-à-vis de <i>Map</i> .....	50
2.4.1. Tests immuno-enzymatiques ou ELISA .....	50
2.4.1.1. ELISA sur sérum individuel.....	50
2.4.1.1. ELISA sur lait individuel .....	56
2.4.2. Tests pour la détection de la réaction immunitaire à médiation cellulaire.....	56
2.4.2.1. Intradermoréaction .....	56
2.4.2.2. Test à l'interféron gamma .....	57
2.5. Intérêt de l'utilisation des tests de mélange ou environnementaux.....	59
2.5.1. Mélange de matières fécales .....	60
2.5.2. Tests sur lait de tank.....	61
2.5.2.1. ELISA lait de tank.....	61
2.5.2.2. PCR sur lait de tank.....	62
2.5.3. Les prélèvements d'environnement .....	62
2.5.3.1. Culture .....	63
2.5.3.2. PCR .....	64
2.6. Intérêts de l'utilisation combinée des tests.....	66
2.7. Méthodes de classification actuelles .....	67
2.7.1. En France.....	67
2.7.2. Dans les autre pays (rapport ACERSA, 2002).....	67
PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE .....	69
1. CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE .....	71
2. MATERIELS ET METHODES.....	72
2.1. Troupeaux et animaux.....	72
2.1.1. Inclusion des troupeaux dans l'étude .....	72
2.1.2. Inclusion d'un troupeau avec de la paratuberculose clinique endémique.....	73
2.2. Questionnaire adressé aux éleveurs.....	73
2.3. Période d'étude et collecte des échantillons.....	74
2.3.1. Identification du problème dans les troupeaux A et B adhérents au HBL (Janvier – Avril 2013) .....	74
2.3.1.1. Echantillonnage .....	74
2.3.1.2. Prélèvements .....	74
2.3.2. Période de dépistage global au sein des quatre troupeaux (Janvier 2014).....	74
2.3.2.1. Echantillonnage .....	74
2.3.2.2. Echantillons et analyses.....	75
2.4. Techniques de laboratoire .....	76
2.4.1. Protocoles de PCR quantitative.....	76
2.4.2. Sérologie par ELISA .....	77
2.4.3. Coproculture de mélange Trek para-JEM® Culture .....	78
2.4.4. Test interféron gamma (ID.vet).....	79
3. RESULTATS .....	80

3.1. Résultats obtenus au sein du troupeau où la paratuberculose est endémique .....	80
3.1.1. Tests de détection directe de <i>Map</i> par qPCR et par coproculture de mélange.....	80
3.1.2. Tests sérologiques par ELISA.....	80
3.1.3. Test IFN- $\gamma$ .....	81
3.2. Résultats obtenus dans les troupeaux A et B supposés indemnes durant la première période (1er semestre 2013) .....	82
3.2.1. Concordance entre les résultats obtenus avec la trousse commerciale IDEXX® en 2013 .....	82
3.2.2. Concordance entre les résultats obtenus avec les trousses commerciales IDEXX® et ID Screen® en 2013.....	82
3.3. Résultats au sein des troupeaux supposés indemnes de paratuberculose lors des tests de Janvier 2014.....	83
3.3.1. Tests de détection directe de <i>Map</i> par qPCR et coproculture de mélange .....	83
3.3.2. Test IFN- $\gamma$ .....	83
3.3.3. Tests sérologiques par ELISA.....	84
3.3.3.1. Concordance des résultats entre les trousses commerciales.....	84
3.3.3.2. Concordance entre les lots de production d'une même trousse commerciale .....	84
3.4. Evolution des résultats (Janvier 2013 – Janvier 2014) au sein des troupeaux supposés indemnes.....	88
3.5. Résultats quantitatifs obtenus en ELISA dans les quatre troupeaux en Janvier 2014.....	88
4. DISCUSSION .....	89
4.1. Recrutement des élevages et des animaux pour l'évaluation des trousses sérologiques .....	89
4.2. Formulation d'hypothèses à partir des réponses au questionnaire .....	89
4.3. Méthodes directes de détection <i>Map</i> .....	90
4.3.1. Risque de résultats faussement négatifs/positifs sur fèces .....	91
4.3.2. Comparaison des protocoles utilisant la qPCR .....	91
4.3.2.1. Concentration de l'échantillon .....	91
4.3.2.2. Extraction de l'ADN.....	92
4.3.2.3. PCR quantitative (qPCR) .....	92
4.3.3. Evaluation des échantillons en mélange.....	93
4.3.4. Choix d'un test de référence.....	94
4.4. Méthodes de recherche indirecte de l'infection par <i>Map</i> .....	95
4.4.1. Test interféron .....	95
4.4.2. Tests sérologiques .....	96
4.4.2.1. Défaut de spécificité des tests sérologiques .....	98
4.4.2.2. Discordance entre les ELISA .....	99
4.4.2.3. Discordances au sein d'une même trousse commerciale .....	100
4.4.2.4. Analyse quantitative des résultats .....	100
CONCLUSION.....	102
BIBLIOGRAPHIE.....	106
ANNEXES .....	116





## TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Evolution de la réaction immunitaire et de l'excrétion de *Map* (d'après Chiodini, 1984). 28

Tableau 1. Proportion des animaux excréteurs dans les différentes (Whitlock <i>et al.</i> , 2000 ; Crossley <i>et al.</i> , 2005) .....	30
Tableau 2. Sensibilité, spécificité et valeurs prédictives d'un test .....	34
Tableau 3. Utilisation des différents tests diagnostiques en fonction du statut de l'animal par Nielsen et Toft (2008).....	38
Tableau 4. Seuils de détectabilité des tests semi-quantitatifs ou quantitatifs de détection directe de <i>Map</i> .....	38
Tableau 5. Sensibilité des méthodes de culture fécale utilisées pour le diagnostic des animaux infectés .....	44
Tableau 6. Sensibilité (Se) et Spécificités (Sp) des différents types de PCR sur prélèvement de fèces individuel .....	48
Tableau 7. Valeur de sensibilité des tests ELISA en fonction du niveau d'excrétion .....	51
Tableau 8. Mise en évidence d'une plage de résultats douteux en ELISA en fonction du niveau de confiance attendu (Adaska <i>et al.</i> , 2002).....	52
Tableau 9. Application des rapports S/P pour l'interprétation des résultats de l'ELISA IDEXX pour la détection de <i>Map</i> dans des élevages laitiers à prévalence non nulle (Collins, 2002) .....	53
Tableau 10. Degrés d'accord entre les tests ELISA sur sérum au sein de troupeaux infectés ....	55
Tableau 11. Sensibilité (Se) et Spécificité (Sp) des tests IFN- $\gamma$ et de l'IDR.....	57
Tableau 12. Caractéristiques des PCR sur échantillons d'environnement ou lait de tank pour évaluer le statut d'un troupeau (Guicharnaud, 2009) .....	65
Tableau 13. Types d'échantillons, techniques et trousse commerciales utilisées.....	76
Tableau 14. Synthèse des résultats de qPCR et de coproculture pour l'élevage D, où la paratuberculose est endémique .....	80
Tableau 15. Synthèse des résultats de l'ELISA, du test IFN- $\gamma$ pour l'élevage D, où la paratuberculose est endémique .....	81
Tableau 16. Résultats des analyses qPCR, test IFN- $\gamma$ et sérologies non-négatives de Janvier à Avril 2013 au sein des troupeaux A et B supposés indemnes .....	83
Tableau 17. Synthèse des résultats non-négatifs obtenus avec les différents lots des trousse ELISA sur les prélèvements de janvier 2014.....	84
Tableau 18. Résultats sérologiques non-négatifs sur la période de Janvier 2013 à Janvier 2014 au sein du troupeau supposé indemne A .....	86
Tableau 19. Résultats sérologiques non négatifs sur la période de Janvier 2013 à Janvier 2014 au sein des troupeaux supposés indemnes B et C .....	87
Tableau 20. Moyenne des rapports S/P au sein des quatre troupeaux en fonction de la trousse commerciale et du lot de production des trousse ELISA .....	88
Tableau 21. Protocole qPCR LSi VetMax® M. paratuberculosis Advanced .....	118
Tableau 22. Protocole adapté ADIAVET® PARATB REAL TIME, avec ADIAFILTER® ...	119
Tableau 23. Protocoles ELISA utilisés .....	120
Tableau 24. Protocole de culture en milieu Para JEM® TREK et confirmation par PCR LSI VetMAX® Triplex M. paratuberculosis.....	122
Tableau 25. Synthèse des réponses au questionnaire dans l'élevage D .....	123
Tableau 26. Synthèse des réponses au questionnaire dans les élevages A et B (1/2) .....	124
Tableau 27. Résultats des tests au sein du troupeau avec de la paratuberculose endémique (1/3) .....	127

TABLE DES ABREVIATIONS
------------------------

ACERSA : Association pour la Certification de la Santé Animale  
AE : Aire d'Exercice  
BAAR : Bacille Acido-Alcool-Résistant  
UFC : Unité Formant Colonie  
DO : Densité Optique  
EG : Equivalent Génome  
ELISA : Enzyme Linked Immun Sorbent Assay  
GDS : Groupe de Défense Sanitaire  
GS : Gold Standard  
HBL : Herd-Book Limousin  
IDR : Intradermoréaction  
IFN- $\gamma$  : Interféron gamma  
L1 : vache en 1ere Lactation  
L2 : vache en seconde Lactation  
L3 : vache en 3eme Lactation  
L4+ : vache en 4eme Lactation et plus  
LDA : Laboratoire Départemental d'Analyses  
LT : lait de Tank  
*Map* : *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*  
NC : Non Communiqué  
OIE : Office International des Epizooties  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PPD : Purified Protein Derivate  
Se : Sensibilité  
Sp : Spécificité  
Th1 : Réaction immunitaire de type 1  
Th2 : Réaction immunitaire de type 2  
S/P : rapport de la densité optique de l'échantillon sur la densité optique du contrôle positif  
VPP : Valeur prédictive Positive  
VPN : Valeur Prédictive Négative





## INTRODUCTION

La paratuberculose, ou maladie de Johne, est une maladie enzootique contagieuse due à *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) qui affecte les ruminants et qui se caractérise par une entérite chronique, parfois hypertrophiante. Les bovins se contaminent principalement au cours des six premiers mois de vie. Les signes cliniques apparaissent après une longue période d'incubation (généralement de 2 à 7 ans) et sont : une diarrhée chronique, intermittente puis persistante, incoercible, et une émaciation malgré un appétit conservé, ainsi qu'une diminution de la production laitière dans les races spécialisées. La paratuberculose conduit *in fine* à la cachexie la plus extrême et la mort de l'animal. Elle se transmet entre les troupeaux, notamment à la faveur d'une introduction lors de l'achat d'un bovin infecté ; de ce fait, elle est souvent désignée comme une maladie d'achat.

Depuis 2001, l'Office International des Epizooties (OIE) classe la paratuberculose dans la liste B des maladies, c'est-à-dire qu'elle est considérée comme une maladie transmissible ayant une importance socio-économique et/ou de santé publique pour les animaux de compagnie et de production.

A l'échelle européenne, Nielsen et Toft (2008) estiment qu'environ 20% des bovins seraient séropositifs vis-à-vis de *Map* (troupeaux laitiers et allaitants confondus). Il est difficile d'établir la prévalence vraie de l'infection dans la population bovine compte tenu du défaut de sensibilité des tests de diagnostic actuellement disponibles. En France, Repiquet estime une prévalence des troupeaux positifs de 0.02 % à 4.6 %.

La paratuberculose soulève également la question du risque pour la santé publique. En effet, bien que considéré comme non zoonotique, *Map* pourrait être un agent responsable de la maladie de Crohn chez l'Homme : contamination à la suite de la consommation de lait, même pasteurisé, ou de viande contaminée (Chiodini et Rossiter ; 1996, Bannantine *et al.* 2009).

La gestion et la prévention de la paratuberculose dans les élevages bovins est donc primordiale. Elle se fait par la détection et la maîtrise de l'infection dans les troupeaux infectés, et la prévention de la contamination des troupeaux supposés indemnes.

Ces objectifs sont majeurs lorsque les élevages adhèrent ou participent à l'organisation de la sélection de race ; les cahiers des charges en matière de contrôle sanitaire prennent en compte le

contrôle des maladies contagieuses non réglementées comme la paratuberculose (en plus du contrôle des maladies réglementées). Ainsi, pour certaines maladies et races, les élevages qui ne peuvent pas justifier de leur caractère indemne vis-à-vis de la paratuberculose sont exclus ou sont exposés à une exclusion temporaire du schéma de sélection. Cette perte d'affiliation conduit à des pertes économiques marquées, qui sont liées principalement à deux facteurs:

- la restriction des ventes vers d'autres cheptels inscrits dans lesquels le statut sanitaire est maîtrisé, et l'exportation d'animaux vers des pays tiers,
- la moindre valorisation des veaux et des futurs reproducteurs, qui ne peuvent plus entrer en station d'évaluation.

Dans l'objectif de répondre au cahier des charges, notamment celui de la race Limousine, les éleveurs des filières de sélection sont tenus de mettre en place un plan de prophylaxie sanitaire (dépistage et/ou assainissement) défini par le Groupement de Défense Sanitaire (GDS) de leur département. A défaut, un dépistage sur un rythme au moins annuel, des animaux de plus de 2 ans, par l'une des méthodes que sont la sérologie ou la coproculture doit être réalisé sous le contrôle du vétérinaire sanitaire (Règlement intérieur du Herd Book de la race bovine Limousine, 2013).

Depuis plusieurs années, des éleveurs engagés dans un plan de maîtrise de ce type, et dont les troupeaux avaient des résultats régulièrement négatifs pour la paratuberculose, rapportent des résultats sérologiques non-négatifs ou discordants d'une date de contrôle à l'autre.

L'objectif de cette étude est de déterminer si les résultats sérologiques non-négatifs ou incohérents au sein d'élevages supposés indemnes sont dus à une séroconversion des animaux à la suite d'une contamination de l'élevage, ou à un défaut de spécificité, habituellement considérée comme élevée à très élevée (Nielsen et Toft, 2008), des tests sérologiques communément utilisés.

## PARTIE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE





# 1. CARACTERISTIQUES DE LA PARATUBERCULOSE

## 1.1. Caractéristiques biologiques de l'agent *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (Map)

La paratuberculose est due à la mycobactérie *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (Map). C'est un bacille de petite taille (0,5 x 1,5 µm) immobile, non capsulé et non sporulé. Bien que les bactéries du genre *Mycobacterium* soient considérées comme des bactéries à Gram positif, leur propriété de bacilles acido-alcoolo-résistants permet de les identifier plus facilement après une coloration de Ziehl-Neelsen.

Map est une bactérie très résistante dans le milieu extérieur, notamment dans un milieu humide et froid. Aussi, elle persiste de 6 à 8 mois dans le lisier, jusqu'à 9 mois dans les bouses, et jusqu'à 18 mois à la surface des pâtures, après contamination par les excréments des individus infectés, ou dans l'eau de boisson (Thévenet 2003).

### 1.1.1. Réceptivité des animaux

Les jeunes bovins âgés de moins d'un an sont les plus réceptifs à l'infection par Map. Ils sont plus sensibles à l'infection avant l'âge d'un mois, et la contamination a lieu principalement durant les six premiers mois de vie (Chiodini *et al.*, 1984). Cependant, il semble que sous certaines conditions (présence d'animaux super-excréteurs dans le troupeau) des animaux adultes puissent également être infectés (Pradhan *et al.*, 2011). La méta-analyse de Windsor et Whittington (2010) estime la proportion d'animaux ayant développé des lésions évocatrices de paratuberculose (quel que soit la mode d'inoculation) à respectivement 75%, 50% et moins de 20% lorsque l'âge d'exposition est de moins de 6 mois, entre 6-12 mois, et de plus de 12 mois d'âge.

### 1.1.2. Matières virulentes et voies de transmission

La transmission se fait essentiellement par voie orale (Clarke, 1997) : par les fèces, mais aussi par le colostrum ou le lait. Les matières fécales des animaux infectés constituent la principale source de Map et tout ce qui est souillé par les fèces d'un animal infecté est vecteur de

contamination : les trayons (contamination du veau lors de la tétée), l'eau, le sol (contamination directe ou après épandage de fumier contaminé), le matériel et les aliments.

Une contamination *in utero* est également possible. Whittington et Windsor (2009) montrent que 9% des veaux nés de mères infectées au stade sub-clinique de la maladie, et 39% des veaux nés de mères infectées avec des symptômes de la paratuberculose sont déjà infectés à la naissance.

Si ces modalités constituent l'essentiel des voies de contaminations, d'autres voies sont également possibles. L'étude d'Eisenberg et al. (2011a) montre que l'infection des jeunes veaux par voie respiratoire est possible. La transmission par voie vénérienne ou par les embryons de vaches infectées ne semble pas jouer un rôle majeur dans la contamination des bovins (Pfeiffer, 2004, Douart A, 2010).

## **1.2. Mécanismes immuno-pathologiques de la paratuberculose**

### **1.2.1. Evolution des réponses immunitaires au cours de l'infection**

#### ***1.2.1.1. Réponse immunitaire à médiation cellulaire***

Après ingestion, *Map* traverse la muqueuse intestinale après endocytose par les cellules M en regard des plaques de Peyer (tissu lymphoïde de l'iléum chez les jeunes ruminants). Les macrophages intestinaux phagocytent les bacilles après translocation. Cette première étape conduit alors à une réaction immunitaire cellulaire. Ce type de réaction résulte de la coopération entre les lymphocytes auxiliaires de type 1 (LTh1) et les macrophages (cellules non spécifiques). Ces lymphocytes produisent, entre autres, des interleukines comme l'IL-2, l'interféron gamma (INF- $\gamma$ ), et des facteurs cytotoxiques qui peuvent induire la lyse des cellules infectées.

A ce stade, la réponse immunitaire à médiation cellulaire peut juguler, voire éliminer, l'infection ; les animaux n'ont pas de symptômes et n'excrètent pas la bactérie dans le milieu extérieur, même si l'infection précoce peut conduire à une excrétion transitoire

Parfois, la réaction immunitaire cellulaire suffit à éliminer l'infection (Collins, 1996). Cela dépend entre autre de la dose infectante, du nombre d'expositions exogènes (ingestion unique ou répétée) et endogènes (par voie hématogène suivant l'infection primaire), de la faculté de l'hôte à

recruter les populations cellulaires adéquates sur le site inflammatoire (facteurs génétiques) ou encore de la souche de *Map* infectante (Gollnick *et al.*, 2007).

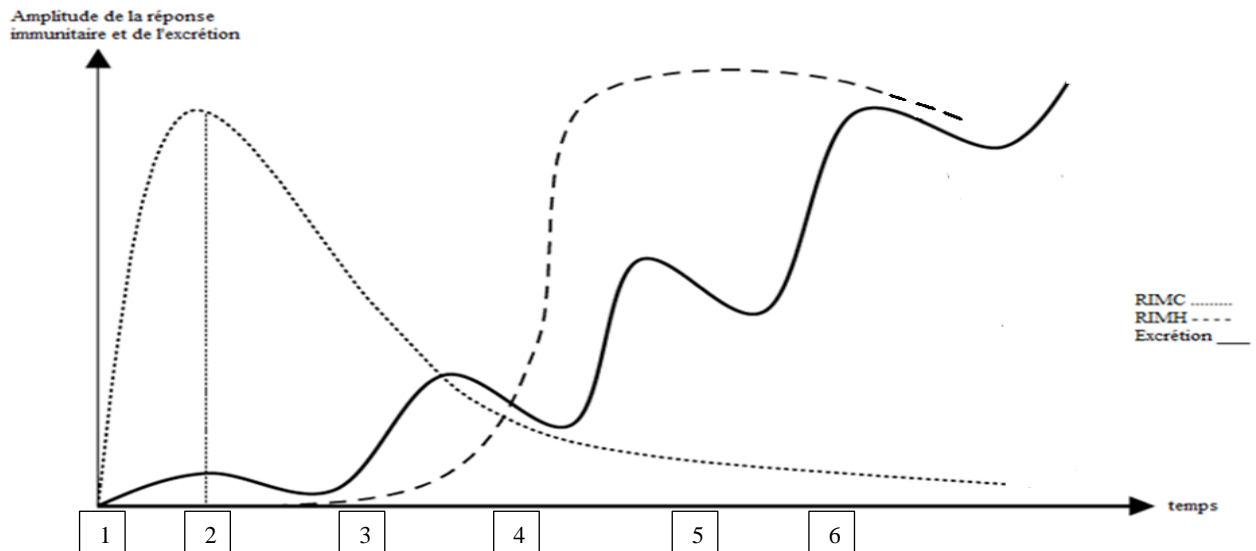
Durant cette phase, on observe aussi une production d'anticorps tels que des immunoglobulines M (IgM) et IgG dans les jours suivant l'exposition à *Map*, et durant deux à trois semaines seulement.

#### ***1.2.1.2. Modification du profil de réponse***

Lorsque la réaction cellulaire est dépassée par des mécanismes, qui ne sont pas encore compris, *Map* prolifère, l'infection s'étend, et l'organisme continue à recruter des macrophages au site de l'infection. Les macrophages infectés migrent jusqu'aux nœuds lymphatiques mésentériques. Au sein de ce système lymphatique périphérique, il y a une activation de la réaction cellulaire à médiation humorale, qui est probablement faiblement ou non protectrice. Le profil de réponse des lymphocytes T auxiliaires de type 2 (LTh2) est alors dominé par les interleukines IL-4, IL-5, IL-6, et IL-10. Ces interleukines favorisent la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'anticorps, et inhibent entre autre la fonction macrophagique. Cela entraîne une diminution de la réponse immunitaire à médiation cellulaire alors que la réponse à médiation humorale augmente.

Les anticorps (IgG) produits ne sont probablement pas protecteurs contre *Map* (Toman *et al.*, 2003). Ils n'empêchent donc pas la prolifération de *Map*. Durant cette phase, l'animal est excréteur, peut exprimer des symptômes et possède des anticorps qui sont détectables de façon permanente.

Au stade terminal, une diminution de la réponse immunitaire humorale est parfois observée, due à l'anergie des plasmocytes, mais cette situation reste exceptionnelle.



**Figure 1. Evolution de la réaction immunitaire et de l'excrétion de *Map* (d'après Chiodini, 1984)**

- 1 : Début de l'infection : mécanismes de défense locaux uniquement
- 2 : Réponse immunitaire à médiation cellulaire (RIMC) prédominante
- 3 : Diminution progressive de la RIMC, et augmentation de l'excrétion de *Map* dans les matières fécales.
- 4 : Augmentation de la réponse immunitaire humorale (RIMH). Diminution de la RIMC jusqu'à l'anergie.
- 5 : Libération intermittente de *Map* dans les fèces et bactériémie
- 6 : Epuisement du système immunitaire en phase terminale : anergie sérologique

### **1.2.2. Remise en cause du modèle classique d'évolution de la réponse immunitaire vis-à-vis de *Map***

Des études récentes sur l'évolution de la paratuberculose montrent que la réponse immunitaire est plus complexe qu'initialement envisagé et remettent en cause le schéma d'une interaction simple entre les réponses immunitaires Th1 et Th2 (Whittington *et al.*, 2002).

Parmi ces observations, plusieurs études suggèrent un rôle majeur de l'IL-10 dans la diminution de la réponse inflammatoire précoce (Buza *et al.* 2004, Coussens *et al.* 2001 et 2004). De son côté, Weiss (2005) conclut que la capacité de *Map* à induire une production d'IL-10, et donc une diminution de la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes CD4+, joue un rôle prépondérant dans la prolifération locale et la persistance de la mycobactérie dans l'organisme. Par ailleurs, Dudemaine *et al.* (2014) suggère que la diminution de la capacité lympho-proliférative est systémique chez les bovins séropositifs et que cela serait dû à un facteur non identifié des mycobactéries, plutôt qu'à l'augmentation de la sécrétion d'IL-10.

En outre, ces auteurs montrent que la concentration plasmatique d'IL-4 (comme marqueur de la réponse Th2, et favorisant l'immunité à médiation humorale, supposée tardive) est identique

chez les animaux infectés et non infectés, alors que la concentration plasmatique en INF- $\gamma$  (marqueur de la réponse immunitaire Th1, et de l'immunité à médiation cellulaire, supposée précoce) est plus élevée chez les animaux porteurs d'anticorps et/ou excréteurs que chez ceux ayant une sérologie et une coproculture négatives. Ces résultats sont cohérents avec d'autres études décrivant une augmentation de la concentration de l'INF- $\gamma$  chez des animaux en phase sub-clinique de la maladie (Sweeney 1998, Coussens *et al.* 2004), voire en phase clinique (Shu *et al.* 2001).

Ainsi, le paradigme d'une transition simple et progressive d'une réponse de type 1 vers une réponse de type 2 au cours de l'évolution de la maladie est remis en question, car il est beaucoup trop simple. Cela incite à poursuivre l'exploration de la réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis de *Map* et de son évolution au cours du temps.

Par ailleurs, afin de comprendre le processus immunopathologique de la paratuberculose, une comparaison est établie avec le processus d'inflammation chronique chez l'Homme lors de la maladie de Crohn. Ainsi, chez des animaux infectés par *Map*, plusieurs études ont mis en évidence la présence de lymphocytes producteurs d'IL-17 (Th17) et des cytokines associées (Curtis et Way, 2009 ; Park *et al.* 2011 ; Glas, 2011 ; Dudemaines, 2014).

### **1.3. Nature et évolution de l'excrétion fécale**

Chez les bovins, l'excrétion fécale de *Map* commence précocement après l'infection alors que la réponse immunitaire est encore dans la phase à médiation cellulaire. Puis l'excrétion décroît pendant 10 à 14 mois après inoculation pour ensuite augmenter à nouveau avec l'apparition de la réponse sérologique ; son caractère intermittent a souvent été décrit (Chiodini *et al.*, 1984). L'intensité de l'excrétion évolue en fonction du stade de la maladie, de quelques bactéries par gramme de fèces en début d'excrétion chronique, jusqu'à  $10^4$  à  $10^8$  en phase clinique (Whipple *et al.*, 1992 ; Collins *et al.*, 1993).

#### **1.3.1. Excréteurs transitoires**

L'étude de Van Roemund *et al.* (2007) met en évidence une possible excrétion transitoire de *Map* chez des veaux durant les 12 premiers mois suivant la contamination (excrétion dite précoce, avec un pic d'excrétion observé entre 0 et 6 mois), suivi d'une période durant laquelle l'excrétion n'est pas détectable, puis une reprise de l'excrétion vers 18 mois (excrétion dite tardive).

Plus récemment, Mitchell (2011b) estime lui aussi que l'excrétion fécale de *Map* se fait en plusieurs phases :

- phase d'excrétion précoce (non obligatoire) avant 12 mois,
- période de portage asymptomatique sans excrétion d'une durée de quelques mois (4 mois en moyenne),
- phase d'excrétion tardive.

### **1.3.2. Intensité de l'excrétions**

Différentes études (Tableau 1) ont permis de catégoriser les animaux excréteurs en trois groupes (à partir de l'isolement de *Map* sur milieu de Herrold) :

- des faibles excréteurs : < 10 UFC/tube
- des excréteurs modérés : 10 – 50 UFC/tube
- de forts excréteurs : > 50 UFC/tube

**Tableau 1. Proportion des animaux excréteurs dans les différentes (Whitlock *et al.*, 2000 ; Crossley *et al.*, 2005)**

	<b>Whitlock <i>et al.</i> 2000</b>	<b>Crossley <i>et al.</i> 2005</b>
<b>Faible excréteurs</b>	70%	51.4 %
<b>Excréteurs modérés</b>	10%	17.8 %
<b>Forts excréteurs</b>	20%	30.8 %

D'après l'étude de Crossley *et al.* (2005), la proportion de forts excréteurs augmente avec la taille du troupeau étudié (25% pour moins de 50 vaches, 39,5% pour plus de 100 vaches), mais elle varie aussi en fonction de la prévalence de l'infection dans le troupeau.

A cette notion de quantité de bacilles excrétée, Nielsen (2008) ajoute une notion qualitative de l'excrétion (en fonction du résultat de quatre coprocultures par an pendant 3 ans sur 1906 adultes) et définit plusieurs groupes de bovins :

- des bovins non-excréteurs,
- des bovins excréteurs transitoires : pour lesquels les quatre derniers prélèvements sont négatifs, avec au moins un résultat positif antérieur,
- des excréteurs faibles : toutes les cultures suivant le premier prélèvement positif sont négatives ou les trois derniers échantillons sont positifs sans dépasser 50 UFC/tube,

- des forts excréteurs : toutes les cultures suivant le premier prélèvement positif sont négatives ou les trois derniers échantillons sont positifs avec au moins un isolement dépassant 50 UFC/tube,
- des excréteurs intermittents : au moins une coproculture positive mais ne correspond pas aux autres critères de groupe.

### **1.3.3. Notion de super-excréteur**

La notion de super-excréteur repose sur l'établissement d'une concentration seuil d'excrétion de *Map* dans les fèces. Cependant les études divergent sur la valeur de ce seuil. L'étude de Whitlock *et al.* (2005 b) évalue ce seuil à 10 000 UFC/g de fèces, mais ne propose pas d'explication biologique sur les raisons ayant conduit à ce choix.

Les super-excréteurs sembleraient jouer un rôle majeur dans la transmission de la maladie au sein d'un élevage. Ainsi l'étude de Pradhan *et. al* (2011) évoque le rôle des super-excréteurs dans la contamination d'animaux adultes au sein d'un troupeau de vaches laitières, et donc leur rôle dans l'augmentation de la prévalence de *Map* au sein du troupeau.

### **1.3.4. Dose infectante**

La dose de *Map* considérée infectante reste hypothétique. La méta-analyse de Begg et Whittington (2008) indique que la dose infectante la plus faible utilisée dans des conditions expérimentales chez les bovins est de  $1,5 \cdot 10^6$  UFC de bacilles inoculés à des veaux âgés de 21 jours (Sweeney *et al.* 2006a).

Par ailleurs, d'après la méta-analyse de Mitchell (2011b), l'exposition à *Map* à un plus jeune âge et/ou à une dose infectante élevée entraîne :

- une proportion plus faible d'individus entrant en phase d'excrétion précoce,
- une durée de l'excrétion précoce plus faible pour les individus concernés,
- une évolution plus rapide vers la phase d'excrétion tardive.

### **1.3.5. Notion d'excrétion passive**

Un excréteur actif libère des mycobactéries dans la lumière du tube digestif suite à une infection de la muqueuse et au renouvellement des cellules de la muqueuse intestinale plus rapide à

la suite de la lyse cellulaire (Whitlock *et al.*, 2008). Un excréteur passif n'est pas infecté mais libère simplement des mycobactéries ingérées en quantité suffisante pour permettre leur détection par la coproculture.

Les notions d'excréteur passif et de super-excréteur semblent liées. En effet, l'étude de Whitlock *et al.* (2006, 2008, 2009) démontre que la présence d'animaux excréteurs passifs est significativement liée à la présence de super-excréteurs et que leur nombre augmente parallèlement. L'étude de Pradhan *et al.* (2009b et 2011) définit quant à elle un excréteur passif comme un excréteur transitoire à faible niveau d'excrétion (< 21 UFC/g) chez qui les cultures suivantes sont négatives (ante mortem : coproculture ; post mortem : culture tissulaire), et excréteur la même souche que l'animal super-excréteur présent dans l'élevage.

### **1.3.6. Classification selon Nielsen et Toft (2008)**

De nombreuses publications estiment que le niveau d'excrétion et son caractère transitoire évolue au cours de l'infection. Ainsi au vue de toutes ces données, la méta-analyse de Nielsen et Toft (2008) établit une classification reliant l'excrétion et le stade de l'infection :

- animal affecté : présente des symptômes de la paratuberculose (diarrhée, amaigrissement chronique, et/ou baisse de production). L'animal est infecté ; la bactérie peut être mise en évidence par coproculture, et les lésions par l'histopathologie,
- animal infectieux : excrète *Map* au moment du prélèvement fécal et est susceptible de transmettre *Map* à ses congénères. Cela inclus les animaux affectés ainsi que les animaux excréteurs passifs alors considérés comme infectés transitoires. Les infections par le lait ou *in utero* ne sont pas incluses dans cette définition,
- animal infecté : présence de *Map* intracellulaire, en multiplication ou en latence.

## **1.4. Stades de la maladie**

La phase prodromique fait suite à une très longue incubation et se traduit par des symptômes frustrés de la maladie. On observe une diminution de l'état corporel et une alternance de phases diarrhéiques avec des périodes de rémission parfois longues. La phase d'incubation chez les bovins



est variable et peut être extrêmement longue : de 18 mois à 15 ans (Chiodini, 1984). On observe cependant assez souvent une apparition des symptômes entre 2 et 7 ans (Stehman, 1996). Certains facteurs favorisent le passage à la phase clinique comme le stress (mise en lot, transport), la mise bas (notamment suite au premier ou au second vêlage, Joly *et al.*, 2009), un déséquilibre alimentaire, des carences en minéraux (Zn, Se, Ca) et/ou en oligo-éléments, des maladies intercurrentes, avec notamment le parasitisme gastro-intestinal).

La phase d'état est marquée par un amaigrissement chronique malgré un appétit souvent conservé, associé à une diarrhée incoercible sans hyperthermie, et une diminution de la production laitière. Cette aggravation fait souvent suite à une mise-bas, et plus particulièrement après le premier ou le second vêlage (Joly *et al.* 2009). Chez les vaches laitières, on observe parfois une baisse de la production (Hendrick, Kelton *et al.*, 2005).

La phase terminale fait suite à une aggravation importante de la diarrhée et l'apparition de la cachexie (anémie, œdème due à l'hypoprotéïnémie) jusqu'à la mort de l'animal.

## **1.5. Lésions tissulaires**

Les lésions de la paratuberculose sont celles d'une entérite granulomateuse localisée à diffuse. Macroscopiquement, on observe une muqueuse intestinale hypertrophiée (surtout de l'iléon) et blanchâtre. Les nœuds lymphatiques mésentériques sont hypertrophiés et parfois nécrosés, caséux ou même calcifiés. Une lymphangiectasie est possible en regard des lésions de la paroi intestinale.

A un stade précoce de la maladie, alors que la réponse immunitaire cellulaire est encore active, on observe de multiples granulomes dans la muqueuse et la sous-muqueuse de l'iléon, ainsi que dans les nœuds lymphatiques mésentériques. La mise en évidence de *Map* est parfois possible. En fin d'évolution, les lésions histologiques correspondent à une infiltration de cellules mononuclées responsable de l'hypertrophie et du raccourcissement des villosités à l'origine d'une mauvaise absorption des nutriments et de l'eau, et donc de la diarrhée (Smith, 2002). On observe alors, dans la plupart des cas, de nombreux bacilles alcool-résistants après coloration de Ziehl-Neelsen.

## 2. EXAMENS DE LABORATOIRE POUR LE DIAGNOSTIC DE LA PARATUBERCULOSE

### 2.1. Valeur informative des tests utilisés

#### 2.1.1. Test de référence ou Gold standard (Toma, 2001)

L'interprétation des résultats d'un test doit tenir compte des valeurs intrinsèques qui définissent la qualité du test : la sensibilité (Se) et la spécificité (Sp). Ces valeurs sont calculées pour chaque test à partir d'un test de référence (ou gold standard), dont on estime qu'il détecte l'ensemble des animaux infectés (infectés vrais), et l'ensemble de tous les animaux indemnes testés (indemnes vrais). Le test de référence va également permettre de calculer la valeur prédictive négative (VPN) et positive (VPP) d'un test, ainsi que les prévalences (Tableau 2).

**Tableau 2. Sensibilité, spécificité et valeurs prédictives d'un test**

		Gold standard		
		Infectés vrai	Indemnes vrais	
Test X	Positifs	VP	FP	Prévalence apparente
	Négatifs	FN	VN	
		Prévalence réelle		

VP : vrai positifs ; VN : vrai négatifs ; FN : faux négatifs ; FP : faux positifs

Si la méthode de référence change, les valeurs intrinsèques du test de référence change aussi, et celles du test évalué également. Aussi, il est important de tenir compte du test de référence utilisé lors de l'interprétation des résultats.

En ce qui concerne la paratuberculose, c'est la culture bactériologique sur fèces qui est souvent considérée comme le test de référence (Whitlock *et al.* 2000, Clark *et al.* 2008), car ce test a longtemps été considéré comme le plus sensible, et avec une spécificité voisine de 100 % (Collins, 2006). Cependant plusieurs études montrent que la sensibilité de ce test est en réalité très variable (Van Roermund *et al.* 2007).

### **2.1.2. Sensibilité**

La sensibilité d'un test est sa capacité à donner une réponse positive chez un individu réellement infecté. C'est-à-dire que la sensibilité d'un test permet d'estimer la proportion d'individus réellement infectés ayant une réponse positive au test.

$$Se = \frac{VP}{(VP + FN)}$$

Une forte sensibilité induit peu de résultats faux négatifs (i.e individu malade détecté négatif), et inversement.

### **2.1.3. Spécificité**

La spécificité d'un test est sa capacité à donner une réponse négative chez un individu réellement indemne. C'est-à-dire que la spécificité d'un test permet d'estimer la proportion d'individus réellement indemnes ayant une réponse négative au test.

$$Sp = \frac{VN}{(FP + VN)}$$

Une forte spécificité induit peu de résultats faux positifs (i.e individu sain détecté positif), et inversement.

### **2.1.4. Valeurs prédictives**

Les valeurs prédictives correspondent à la probabilité que la réponse donnée par le test soit effectivement vraie.

La valeur prédictive positive (VPP) est la probabilité qu'une réponse positive au test corresponde bien à un individu réellement infecté (vrai positif). Si la spécificité de test est faible alors la VPP est faible.

$$VPP = \frac{VP}{(VP+FP)}$$

La valeur prédictive négative est la probabilité qu'une réponse négative au test corresponde bien à un animal indemne (vrai négatif). Si la sensibilité du test est faible, alors sa VPN est faible.

$$VPN = \frac{VN}{(VN + FN)}$$

### **2.1.5. Prévalence intra-troupeau**

La prévalence correspond au nombre total de cas ou de foyers d'une maladie dans une population donnée, à un instant t (prévalence instantanée) ou au cours d'une période donnée.

Quand on applique un autre test que le test de référence à cette même population, on obtient une prévalence apparente (AP) qui correspond à l'ensemble des animaux reconnus positifs par le test.

$$AP = VP + FP$$

Dans le cas de la paratuberculose, il est difficile d'établir des valeurs de prévalence réelle (du fait des valeurs informatives du test de référence qui sont inférieures à 100%), ou apparente. Lors du calcul de la prévalence apparente, il y a souvent une erreur par excès, c'est-à-dire que les résultats du test incluent des animaux faussement positifs (FP). La prévalence apparente peut alors s'avérer plus élevée que la prévalence réelle.

Le test de référence permet de calculer la prévalence réelle (TP), c'est-à-dire le nombre d'animaux infectés dans une population donnée.

$$TP = VP + FN$$

En 2004, un rapport UBGDS en France rapporte une prévalence individuelle de 1,4 % (ELISA Pourquier, Se = 15%, Sp = 100%, dans des troupeaux laitiers et allaitants). Guicharnaud (2009) a alors calculé une prévalence réelle individuelle de 8% à 9,3 %, et déduit une prévalence réelle de troupeau comprise entre 20 % et 30 % (considérant un troupeau positif lorsqu'au moins un individu du troupeau est positif)

On peut retrouver la prévalence réelle à partir d'une prévalence apparente lorsqu'on connaît la sensibilité (Se) et la spécificité (Sp) du test utilisé (Toma 2001) :

$$TP = \frac{(AP + Sp - 1)}{(Se + Sp - 1)}$$

### **2.1.6. Prévalence des troupeaux infectés**

Kalis et *al.* (2000) considèrent un troupeau comme infecté lorsqu'au moins un individu y est détecté positif. La sensibilité troupeau correspond à la probabilité de détecter au moins un animal positif lors d'un test de dépistage appliqué aux animaux d'un troupeau supposé infecté. Ainsi, plus la prévalence individuelle est forte, plus la probabilité de détecter au moins un animal positif est forte. Pour un même test, la sensibilité troupeau est plus élevée que la sensibilité individuelle.

## 2.2. Facteurs de variations de la sensibilité et de la spécificité des tests

La sensibilité et la spécificité des tests vont varier en fonction :

- des caractéristiques du protocole : matrice, réactifs utilisés, pré-traitement des échantillons, seuil de détection, répétabilité, reproductibilité,
- des conditions de mise en œuvre du protocole : fréquence de réalisation des tests, choix de l'échantillon (représentativité et taille),
- de la population testée : âge, stade de l'infection, stade physiologique, prévalence intra-troupeau ;
- des modalités d'interprétation du test : choix de la valeur seuil, test de référence.

### 2.2.1. Méthodes de choix en fonction du stade de l'infection

L'évolution de l'infection par *Map* au cours du temps est complexe et fortement dépendante de l'animal (facteurs génétiques), notamment en raison de la variation de la réponse immunitaire développée et de l'environnement (gestion du troupeau, de la production).

Ainsi à chaque stade de l'infection (Nielsen, 2008), il est possible d'associer un test sensible qui est basé sur (Tableau 3) :

- la recherche directe de *Map* :
  - par bactérioscopie
  - par culture (à partir des fèces ou autres supports biologiques)
  - par PCR (à partir des fèces ou autres)
- la recherche indirecte de l'infection par *Map* grâce à la mise en évidence de la réaction immunitaire à médiation :
  - cellulaire : sur l'animal par intradermoréaction (IDR) ou au laboratoire par le dosage de l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) produit à la suite d'une stimulation antigénique des cellules sanguines
  - humorale anticorps : par ELISA

**Tableau 3. Utilisation des différents tests diagnostiques en fonction du statut de l'animal par Nielsen et Toft (2008)**

Stade de l'infection	Recherche indirecte de <i>Map</i>		Recherche directe de <i>Map</i>		
	IDR ou IFN- $\gamma$	ELISA	Coloration de Ziehl Neelsen	Culture	PCR
<b>Infecté asymptomatique non excréteur</b>	OUI	+/-	NON	NON	NON
<b>Infecté asymptomatique excréteur</b>	+/-	+/-	OUI pour les fort excréteurs	OUI	OUI
<b>Infecté symptomatique excréteur</b>	NON	OUI (sauf si anergie)	OUI	OUI	OUI
<b>Infecté transitoire</b>	OUI	OUI	OUI pour les forts excréteurs	OUI	OUI
<b>Porteur passif</b>	NON	NON	OUI	OUI	OUI

IDR : intradermoréaction ; ELISA : test immuno-enzymatique ; PCR : réaction de polymérisation en chaîne

### 2.2.2. Seuil de positivité (ou cut-off ) et seuil de détectabilité

La sensibilité et la spécificité d'un test sont déterminés en fonction d'une valeur seuil au-dessus de laquelle les résultats sont considérés positifs, et au-dessous de laquelle les résultats sont considérés négatifs ou douteux si un intervalle supplémentaire est créé.

Une élévation de la valeur seuil diminue le nombre d'animaux infectés qui sont détectés positifs : il y a alors une diminution de la sensibilité du test. En revanche, il y a moins de risques de considérer un animal indemne comme positif : il y a donc une augmentation de la spécificité du test. Inversement, une diminution de la valeur seuil entraîne une augmentation de la sensibilité et une diminution de la spécificité du test.

Il faut ainsi distinguer le seuil de positivité du seuil de détectabilité qui, dans la plupart des cas sont différents. Ce dernier correspond à la concentration la plus faible détectable par le test (que ce soit l'agent pathogène ou les marqueurs de l'infection comme les anticorps ou d'IFN- $\gamma$ ). Le seuil de détectabilité est très variable selon les tests (Tableau 4).

**Tableau 4. Seuils de détectabilité des tests semi-quantitatifs ou quantitatifs de détection directe de *Map***

Test	Coloration Ziehl-Nielsen	Coproculture milieu Herrold	Coproculture Milieu BACTEC	Coproculture milieu para-JEM	qPCR (IS 900)
<b>Seuil de détectabilité</b>	1 UFC/lame Soit excrétion >10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup> UFC/g fèces	10 <sup>2</sup> UFC/g de fèces	BACTEC MGIT 10 <sup>1</sup> UFC BACTEC 460 : 10 <sup>3</sup> UFC	10 <sup>3</sup> UFC/ml Avec une confirmation qPCR IS900	31 UFC/g fèces
<b>Source</b>	Weber <i>et al.</i> 2009	Pozzato, 2011	Shin <i>et al.</i> 2007	Kim <i>et al.</i> 2003	Bögli-Stuber, 2005

UFC : unité formant colonie soit plus de une mycobactérie ; qPCR : réaction quantitative de polymérisation en chaîne

## **2.3. Techniques de laboratoire pour la détection directe de *Map***

### **2.3.1. Bactérioscopie**

La bactérioscopie consiste à rechercher le bacille au cours d'un examen microscopique à partir d'un prélèvement de matière fécale ou de tissus.

La technique débute par un étalement de la matrice sur une lame de verre suivi d'une coloration de Ziehl-Neelsen. Cette coloration propre aux bacilles acido-alcool-résistants (BAAR), teinte les bactéries en rose, souvent regroupées en amas, sur fond bleuté. C'est une technique simple à réaliser et peu onéreuse (7 à 9 euros), mais la lecture des lames est chronophage et devient pénible après quelques heures.

Cette technique fournit uniquement un résultat qualitatif (présence ou absence) et ne permet de détecter que les individus infectés excréteurs. D'après l'étude de Zimmer *et al.* (1999) la sensibilité de la bactérioscopie sur fèces d'animaux symptomatiques est de 49 % contre 56 % à partir d'une coproculture positive selon l'étude de Ris *et al.* (1988) avec une spécificité de 83%. Par ailleurs, l'étude de Weber *et al.* (2009) a établi une sensibilité de 48% et une spécificité de 98% pour des animaux dans la phase clinique. Weber explique la différence de spécificité avec l'étude de Ris, par le fait qu'il considérait comme positive une lame ayant au moins deux amas de BAAR.

Le défaut de sensibilité est attribué à l'excrétion intermittente et aléatoire de *Map* dans les fèces (Merkal *et al.* 1968), et au fait que l'animal doit être fortement excréteur. Le défaut de spécificité est directement lié au caractère acido-alcool-résistant de bacilles autres que *Map* qui peuvent être présents dans le prélèvement. Pour augmenter la spécificité et la sensibilité de cette technique, on peut répéter l'échantillon : trois prélèvements à 12h d'intervalle et réaliser trois lames à chaque fois.

Cette technique permet de détecter uniquement les individus excréteurs symptomatiques et n'est donc pas utilisée à l'échelle du troupeau dans le cadre d'un dépistage.

### **2.3.2. Histopathologie**

La recherche histologique de *Map* se fait après prélèvement nécropsique (ou biopsie chirurgicale ante-mortem) à partir des tissus qui sont les sites préférentiels de l'infection : intestin grêle, généralement l'iléon, ou les nœuds lymphatiques mésentériques situés en regard. Les tissus sont colorés à l'hémalun-éosine pour visualiser la présence de lésions granulomateuses. Une coloration de Ziehl-Nielsen peut être réalisée pour visualiser directement les mycobactéries.

Cette méthode à une spécificité de 100% et permet de détecter les individus contaminés très tôt (3-5 mois post-infection). La sensibilité n'est pas connue. Cependant l'étude de Wells *et al.* (2009) identifie des BAAR dans 9 % et 5,6% respectivement dans la muqueuse iléale et les nœuds lymphatiques, chez des animaux ayant une culture bactérienne tissulaire positive. C'est une méthode qui requiert beaucoup de manipulations spécifiques et une expertise en anatomopathologie.

### **2.3.3. Isolement par culture bactériologique à l'échelon individuel**

La culture bactériologique est actuellement la technique la plus largement employée pour la détection de *Map*. Il s'agit de mettre en évidence la croissance de *Map* après ensemencement d'un milieu solide ou liquide. La culture peut se faire à partir de fèces, de lait ou de tissus (paroi iléale, ou nœuds lymphatiques mésentériques).

#### ***2.3.3.1. Caractéristiques de la croissance de Map***

*Map* se distingue des autres mycobactéries par une croissance particulièrement lente avec un temps de multiplication de 20 heures dans les conditions de culture optimales. C'est pourquoi la culture primaire de *Map* nécessite au moins trois semaines pour obtenir le développement d'une colonie à partir d'un inoculum et dans des conditions optimales de températures (37°C). La colonie formée est de petite taille, blanche et légèrement en relief.

De plus, contrairement aux autres mycobactéries, *Map* est incapable de produire de la mycobactine (sidérophore liposoluble chélateur du fer, responsable de la captation et du transport du fer à l'intérieur de la cellule). La mycobactine doit donc être incorporée au milieu pour permettre la croissance de *Map*.

#### ***2.3.3.2. La coproculture individuelle***

La coproculture permet de détecter les animaux excréteurs, qu'ils soient asymptomatiques ou symptomatiques. Elle fournit une analyse semi-quantitative de l'excrétion fécale permettant de définir un niveau d'excrétion fécale (Whitlock, 2005) :

- faibles excréteurs : < 10 UFC/g
- excréteurs modérés : 10 – 50 UFC/g
- forts excréteurs : > 50 UFC/g



Actuellement, la plupart des laboratoires classent les prélèvements supérieurs à 50 ou 70 UFC/g de fèces sont classés comme non dénombrables (TNTC, Too Numerous To Count).

La culture peut se faire sur milieu solide ou liquide, et comprend une étape de décontamination et parfois une étape d'incubation avec ajout d'antibiotiques, qui permettent d'augmenter la spécificité du test en détruisant les micro-organismes autre que *Map* présents dans le prélèvement et qui ont une croissance plus rapide.

La culture est suivie d'une étape de confirmation de la présence de *Map*. Ainsi, les cultures positives sont contrôlées par une coloration Ziehl-Neelsen, ou un test de croissance à la mycobactine ou encore une confirmation par PCR (plus sensible) afin d'augmenter la spécificité des tests.

### Culture en milieu solide

Cette méthode est aujourd'hui couramment utilisée comme test de référence dans les laboratoires de dépistage malgré des valeurs intrinsèques non optimales, et est réalisée de façon standardisée (norme AFNOR U 47) en France selon le protocole à partir de un ou deux grammes de fèces, avec une décontamination à l'hexacétylpyridinium (HPC) 0.75% suivi d'une sédimentation et d'un ensemencement en milieu solide de Herrold (HEY) contenant de la mycobactine, avec ou sans antibiotiques. L'incubation est de six mois à 37°C, avec une inspection des tubes aux semaines 8, 12, 16 et 18.

Plus récemment des techniques automatisées ont permis de réduire le temps de culture, et de diminuer l'intervention des opérateurs.

### Culture automatisée radiométrique

Ce milieu de culture liquide (Middlebrook 7H 12) contient de l'acide palmitique comme substrat radioactif marqué). La croissance est objectivée par la mesure du CO<sub>2</sub> dégagé par le métabolisme de la bactérie à partir du palmitate, à l'aide de l'appareil BACTEC 460®. Cette technique permet de calculer un index mettant en évidence la croissance bactérienne avant que les colonies soient visibles macroscopiquement. Comme toute méthode de culture, la culture

radiométrique nécessite une étape de décontamination et de concentration. Le résultat est obtenu au bout de 8 semaines environ.

Cependant, cette technique nécessite la manipulation de produits radioactifs ce qui impose aux laboratoires utilisateurs, des mesures de sécurité contraignantes ; elle est donc de moins en moins utilisée.

### Développement de la culture automatisée non radiométrique

Il existe actuellement deux trousse commerciales de culture automatisée sur milieu liquide, qui permettent l'obtention d'un résultat en 6 semaines environ. Quelle que soit la technique utilisée, l'étape d'identification par PCR des cultures positives est nécessaire.

Le système GMIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube, Becton Dickinson) associé au lecteur BACTEC®960 : ce système intègre un marqueur fluorescent sensible à la diminution de l'oxygène consommé par la croissance bactérienne (Grant *et al.* 2003).

Le ESP Culture system II avec le milieu Para-Jem mesure le changement de pression dû au métabolisme bactérien dans les microtubes (Kim *et al.* 2004).

L'étude de Williams et Bouyer (2000) montre que la technique GMIT BACTEC® 960 a un temps de détection plus court que l'ESP Culture system II ®TREK (milieu Para-Jem) soit 13,1 jours contre 16,9 jours. Cependant le taux de contamination est élevé, avec 17,1 % pour le protocole BACTEC dont 41% de bactéries d'origine fécale, contre 18,9%, dont 32,2% de contamination fécale pour le protocole TREK. L'auteur explique ce fort taux de contamination (aux alentours de 8,6% selon d'autres études) par une baisse de la concentration en NaOH de 2% à 1% lors de la phase de décontamination.

La dernière méthode automatisée est le système MB/BacT développé par Biomérieux qui mesure le CO<sub>2</sub> produit lors de la croissance bactérienne sur un milieu modifié Middlebrook 7H9. Cette mesure est réalisée grâce au changement de couleur d'un marqueur présent dans le bouillon de culture (Stich *et al.* 2004).

### Variations des caractéristiques des coprocultures en fonction du stade de l'infection et de l'animal

La spécificité de la culture fécale est généralement estimée à 100%, mais elle est souvent inférieure du fait de la présence d'animaux infectés transitoires. Ainsi l'étude de Nielsen *et al.* (2002a) estime la spécificité à 98% dans une population où les non-infectés sont contaminés au moment de la fusion entre troupeaux infectés et troupeaux sains par exemple.

D'autre part, l'âge de l'animal joue aussi sur la spécificité puisque un animal excrète généralement *Map* à partir de l'âge de 18 mois s'il a été contaminé dans le jeune âge. C'est pourquoi Nielsen et Ersboll (2006) estiment que la probabilité maximale pour un animal d'être testé positif par la culture fécale est obtenue entre 2,5 et 5,5 ans.

La sensibilité et la spécificité sont variables suivant les milieux utilisés. Ainsi l'analyse des données publiées indique les valeurs suivantes :

- Milieu de culture Solide HEYM :
  - o Se : de 60 % (Collins *et al.* 2006) à 72% (Alinovi *et al.* 2009)
  - o Sp : de 98 à 99%
- Milieu de Culture semi-liquide Para-Jem ® TREK :
  - o Se : 65 % (Collins *et al.* 2006 ; Alinovi *et al.* 2009)
  - o Sp : 99%

Cependant, il y a une variation de la sensibilité de la coproculture en fonction du stade de l'infection. Aussi, Nielsen et Toft (2008) ont regroupé dans leur méta-analyse les différentes sensibilités données dans la littérature pour différents milieux de culture en fonction du stade de l'infection (Tableau 5). D'une manière générale, la sensibilité de la coproculture augmente avec le stade de l'infection puisque la quantité de *Map* excrétée augmente.

**Tableau 5. Sensibilité des méthodes de culture fécale utilisées pour le diagnostic des animaux infectés**

Stade de l'infection	Age	Milieu culture	Test de référence	Se	Source
<b>Infectes symptomatiques Excréteurs</b>	?	HEYM	?	70% (39/56)	Egan <i>et al.</i> 1999
<b>Infectes asymptomatiques Excréteurs</b>	> 2 ans	HEYM	Culture tissulaire (iléon + nœud lymphatique)	74% (82/111)	Sockett <i>et al.</i> , 1992
	?	HEYM	lésions	49% (86/177)	Billman-jacob <i>et al.</i> 1992
<b>Infectes asymptomatiques Non excréteurs</b>	?	Para-Jem	Culture tissulaire (iléon + nœuds lymphatiques)	23% (36/160)	Mckenna <i>Et al.</i> , 2005
	954 bovins du troupeau 954 dans 10 troupeaux	HEYM	Histopathologie	25% (79/321)	Whitlock <i>et al.</i> , 2000
	697 vaches ayant mis bas (>2 ans) 697 dans 10 troupeaux	HEYM	Histopathologie	29% (67/232)	Whitlock <i>et al.</i> , 2000

#### Variations des caractéristiques des coprocultures liées aux protocoles

La spécificité et la sensibilité du test sont variables en fonction des protocoles. Ainsi, différentes études sur la culture en milieu solide ont cherché à les augmenter en modifiant par exemple, le milieu de culture et/ou le protocole de préparation de l'échantillon. Par exemple, l'étude de Ristow et Silva (2006), démontre que les protocoles avec une double centrifugation (selon Whitlock et Rosenberg, 1990, avec une centrifugation à 900 g pour diminuer les contaminations) ou avec une double décontamination (selon Stabel, 1997) sont les plus sensibles lorsqu'ils sont utilisés sur un milieu HEY (enrichi en mycobactine et avec ajout d'antibiotiques). Dans tous les cas, cette étude recommande l'enrichissement du milieu en antibiotiques (amphotéricine B, acide nalidixique, vancomycine).

Par ailleurs, certains auteurs décrivent une possible inhibition de la croissance de *Map* du fait de l'utilisation de HPC à 0,75% (hexadecylpyridinium). Cependant, l'étude de Reddacliff *et al.* (2003) estime qu'une perte de 2,7  $\log_{10}$  dans un milieu BACTEC est due à l'utilisation d'antibiotiques (vancomycine et acide nalidixique à 100  $\mu\text{g/mL}$ , amphotéricin B à 50  $\mu\text{g/mL}$ , incubation durant 72 heures) et au fractionnement en aliquotes (100 $\mu\text{l}$ ) et non à l'HPC (incubation

avec une concentration de 0,9% durant 24 heures). Cette perte peu être problématique sur des échantillons à faible concentration de *Map* (animaux faibles excréteurs) et conduire à des résultats faussement négatifs.

#### **2.3.3.3. Culture bactériologique sur échantillon de lait individuel**

Il y a peu d'études rapportant l'utilisation de la culture sur échantillon de lait individuel. Cependant, Pillai et Jayaro (2002) estiment que le seuil de détection se situe entre 10-100 UFC/mL. Ils estiment aussi que la culture détecte 10 fois moins de troupeaux infectés que la qPCR sur cette même matrice (respectivement 6% et 68%). Cela s'explique par le fait que la culture permet de détecter uniquement les bactéries vivantes capables de se multiplier, et que la présence de *Map* dans le lait est majoritairement due à une contamination par les matières fécales (Sweeney et al., 1992)

De plus, ce défaut de détection peut être imputable aux difficultés d'adaptation des protocoles de coproculture à la matrice lait. Ainsi Slana *et al.* (2008) suggère un protocole avec au moins deux centrifugations (4200 g pendant 45 minutes, et 1400 g pendant 10 minutes) pour augmenter la concentration de *Map* dans l'inoculum d'ensemencement.

En 2013, l'étude de Bradner et Robbe Autermann recommande une décontamination durant 15 min avec une solution à 1,5% de N-acétyl L-cystéine hydroxyde de sodium (NALC-NaOH), suivie d'une culture en milieu liquide Bactec 12B® médium (comparé au Para-JEM) qui montre une meilleure croissance de *Map* qu'une décontamination avec l'hexadécylpyridinium (HPC) habituellement utilisée.

#### **2.3.3.4. Culture à partir de prélèvements tissulaires**

Actuellement peu de données sont disponibles sur les caractéristiques de cette méthode. Cependant, l'étude de Huda *et al.* (2003) estime que la sensibilité est de 100% chez des animaux en phase clinique. Cette méthode apparait néanmoins comme plus sensible qu'une coproculture standard, que la bactérioscopie ou l'immunohistochimie (Pradhan *et al.*, 2011), et sa spécificité est proche de 100 %.

Chez les ovins, la méthode est également décrite comme la plus sensible pour détecter précocement l'infection (avant 12 mois post-infection) sur des animaux naturellement exposés, comparé au test IDR (intrademo réaction), le test interféron, la coproculture et l'histopathologie (Reddacliff *et al.*, 2004).

#### **2.3.4. PCR sur échantillons individuels de fèces**

L'amplification génique (PCR) consiste à détecter un fragment d'ADN spécifique de *Map*. Cette technique est utilisée à partir de plusieurs types d'échantillons : des tissus (nœud lymphatiques mésentériques, muqueuse intestinale), de la matière fécale ou du lait. C'est donc une technique utilisable sur les animaux excréteurs qu'ils soient asymptomatiques ou symptomatiques.

La PCR est actuellement utilisée en confirmation de la culture (qui ne détecte que les bactéries vivantes, la rendant donc moins sensible) ou en première intention pour le diagnostic individuel, ou sur des échantillons individuels à l'échelle du troupeau. Les principaux inconvénients sont : le coût qui reste élevé malgré l'automatisation (environ 30-35 euros), et le temps dédié au prélèvement des échantillons directement dans le rectum. C'est une méthode relativement rapide (24-48h).

La méthode PCR nécessite une étape préalable d'extraction de l'ADN de *Map* à partir de la matrice de l'échantillon, voire une concentration. Une séquence d'ADN cible de *Map* est balisée par des amorces et va ensuite être amplifiée au cours de plusieurs cycles par une réaction de polymérisation en chaîne. Pour visualiser l'amplification, on utilise des sondes qui vont se fixer sur une séquence de l'ADN cible amplifié.

#### **PCR quantitative (qPCR)**

En PCR quantitative, les sondes vont traduire le niveau d'amplification par différents moyens de lecture. De plus, la qPCR en temps réel repose sur la possibilité de suivre au cours du temps (« en temps réel ») le processus d'amplification de l'ADN cible à l'aide de la fluorescence. Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant. Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles à l'origine, moins il faudra de cycles pour atteindre un point Ct (Threshold Cycle) pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond.

Actuellement les protocoles de qPCR sont préférentiellement associés à l'utilisation d'une sonde d'hydrolyse (type Taqman par exemple). La sonde est marquée avec un fluorochrome émetteur (ou reporter, ex : FAM ou VIC) et un fluorochrome receveur, dit quencher, qui inhibe le

premier lorsqu'ils sont suffisamment proches sur la sonde d'une taille de 20 à 40 nucléotides. Lorsque l'enzyme polymérase rencontre la section d'ADN où est fixée la sonde, elle va hydrolyser cette sonde et permettre l'éloignement des deux fluorochromes. Le fluorochrome émetteur n'est plus inhibé par le quencher, et sa fluorescence peut alors être détectée par le lecteur de fluorescence. Les sondes fluorescentes ont une très bonne sensibilité et spécificité par rapport aux agents intercalants de l'ADN (comme le SYBR green par exemple) puisque l'hybridation entre la sonde et la séquence d'ADN cible, réduit significativement l'émission de fluorescence non spécifique due à de mauvais appariements (Poitras et Houde, 2002). Il existe également des techniques de PCR nichée (Nested PCR) qui utilise deux couples de sondes.

### Variations des caractéristiques des qPCR en fonction du stade de l'infection et de l'animal

Les différents protocoles de PCR décrits dans la littérature ont une sensibilité comprise entre 23% et 30% pour une spécificité d'environ 100% (Tableau 6).

Le défaut de sensibilité est lié à :

- la faible concentration de *Map* dans les échantillons (notamment dans le lait),
- la présence d'inhibiteurs de la polymérase (enzyme d'élongation de l'ADN) dans la matrice du prélèvement (sels biliaires, poly-osides, ions Ca<sup>2+</sup>, héparine, hémoglobine),
- la présence dans l'échantillon d'une quantité trop grande d'ADN non spécifique de *Map*.

La sensibilité de la PCR en général augmente avec le degré d'évolution de la maladie, et donc avec le niveau d'excrétion (Clark, 2008, Wells et Collins, 2006) (Tableau 6).

**Tableau 6. Sensibilité (Se) et Spécificités (Sp) des différents types de PCR sur prélèvement de fèces individuel**

Tests	Test de référence	Population testée	Se	Sp	Source
<b>PCR avec IS900</b>	Culture fécal	87 vaches de 2 troupeaux avec un historique de paratuberculose	23%	100%	Van Der Giessen <i>et al.</i> , 1992
<b>PCR avec test IDEXX® (IS900)</b>	Culture fécal	87 vaches de 2 troupeaux avec un historique de paratuberculose	13%	100%	Van Der Giessen <i>et al.</i> , 1992
<b>PCR IS 900</b>	Culture fécale (trois méthodes différentes)	1808 vaches, 7 troupeaux infectés (séroprévalence >10%) 347 vaches, 7 troupeaux indemnes	29% Faibles et excréteurs modérés 4 % Fort excréteurs 76%	99,7%	Wells <i>et al.</i> , 2006
<b>PCR IS900</b>	Culture fécale	250 vaches laitières > 2 ans au statut inconnu (2 troupeaux)	70,2 % Faibles excréteurs 57.1% Excréteur modérés 75% Forts excréteurs 100%	85,3%	Clark <i>et al.</i> , 2008

#### Variations des caractéristiques des qPCR liées au protocole

##### Choix de l'ADN cible

La séquence cible *IS900*, présente en 12 à 18 copies dans le génome de *Map*, est souvent la plus utilisée. Cependant on retrouve également la séquence *IS900* ou des séquences très similaires (séquence *IS900*-like) dans le génome d'autres mycobactéries (Cousins *et al.* 1999, Englund *et al.* 2002). En pratique le seuil de détection est estimé aux alentours de  $10^5$  bactéries/g de fèces (V. Der Giessen *et al.*, cible *IS900*, 1992).

Comparée à la séquence *F57*, présente en un seul exemplaire dans le génome, la détection de *IS900* offre une plus grande sensibilité, mais une spécificité éventuellement inférieure si d'autres mycobactéries contenant des séquences proches sont présentes (Hertnek et Bolske, 2006 ; Tsara et Stephan, 2005). L'étude de Bosshard *et al.* (2006) montre qu'une PCR quantitative (qPCR) utilisant la séquence *F57* a une limite de détection de 500 bactéries par gramme de fèces.

La séquence *HspX*, plus spécifique que la séquence *IS900*, peut aussi être utilisée. D'autres séquences (*IS-MAP02* et *IS-MAP04*) ont également été identifiées, et seraient une bonne alternative



eu égard au nombre de copies au sein du génome de *Map* (entre 5 et 6 copies par génome) et au faible nombre de séquences similaires connues dans le génome d'autres bactéries (Li *et al.* 2005).

L'utilisation de séquences parmi les plus spécifiques de *Map* et présentes en un nombre élevé de copies dans le génome doit être privilégié pour abaisser le seuil de détectabilité.

### Protocole de concentration et d'extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN se fait par une étape de lyse des cellules et une étape de purification de l'ADN libéré. Les techniques d'extraction utilisées sur des fèces doivent permettre l'obtention d'un ADN le plus pur possible malgré les inhibiteurs présents dans la matière fécale, et la paroi des mycobactéries riches en lipides.

L'étude de Leite (2013) qui compare six trousse commerciales d'extraction à partir de fèces d'animaux excréteurs, considère que les protocoles d'extractions le plus sensibles sont ceux intégrant une lyse mécanique, plutôt que thermique ou chimique, associée à une purification de l'ADN par l'utilisation de billes magnétiques ou d'une technique sur colonnes avec membrane de silice. Dans son étude, Leite considère que la sensibilité de la technique n'est pas liée au niveau de purification de l'ADN. Cependant, l'étude de Chui en 2004 estime que les protocoles incluant l'utilisation de billes magnétiques présentent moins d'inhibition de la PCR.

Certaines trousse commerciales proposent des étapes de concentration des échantillons de fèces avant extraction. Ainsi Adia-gène a mis au point un système de centri-filtration (ADIAFILTER®) permettant de concentrer l'échantillon à partir d'une quantité initiale de fèces de 3 à 10 g. Cela réduit le seuil de détectabilité à 1-2 *Map*/ g de fèces et augmente donc la sensibilité du test (qPCR, *IS900*). Ainsi, Veillon (2011) détecte 53 % d'échantillons positifs en plus à partir de 6g de fèces que le protocole classique à partir de 1g de fèces.

## **2.4. Tests pour la détection de la réaction immunitaire vis-à-vis de *Map***

### **2.4.1. Tests immuno-enzymatiques ou ELISA**

L'ELISA (Enzyme Liked Immunosorbent Assay) est une technique de détection des anticorps spécifiques d'un agent pathogène, couplée à une réaction colorée permettant la révélation de la détection.

Dans le cas de la paratuberculose bovine, la séroconversion n'a pas lieu avant 12 à 15 mois, et débute souvent quelques mois avant l'apparition des premiers symptômes. L'ELISA permet donc la détection de certains infectés asymptomatiques non excréteurs, des infectés symptomatiques excréteurs et des infectés en phase clinique (avant l'apparition de la phase d'anergie immunitaire qui est probablement rare).

L'ELISA est utilisé pour le diagnostic à l'échelle individuelle ou à l'échelle du troupeau. Son coût est beaucoup moins élevé que celui de la qPCR.

#### ***2.4.1.1. ELISA sur sérum individuel***

Le protocole consiste à mettre en contact le sérum à tester avec des antigènes de *Map* fixés dans les puits d'une microplaque. Il y a alors formation de complexes immuns spécifiques de *Map*. Les anticorps non fixés (c'est-à-dire qui n'ont pas reconnu *Map*) sont alors éliminés par un lavage. Des anticorps spécifiques des anticorps de ruminants ou de la protéine A, couplés à une enzyme sont ensuite ajoutés dans les puits et vont se fixer aux complexes immuns préalablement formés. Après lavage, le substrat enzymatique est ajouté et l'intensité de la coloration, c'est-à-dire la densité optique (DO) est mesurée. Le résultat de l'ELISA est exprimé sous la forme d'un rapport signal de l'échantillon sur signal du contrôle positif (S/P), qui est le rapport entre la densité optique de l'échantillon testé (sample « S ») et celui d'un échantillon contrôle (positif « P »). Les résultats sont ensuite interprétés en résultats positifs ou négatifs selon une valeur seuil choisie au préalable.

#### **Variations des caractéristiques des tests ELISA sur sérum en fonction du stade de l'infection et de l'animal**

Il est important de noter que la quantité d'anticorps augmente au cours de l'infection et qu'il y a donc une variation de la sensibilité des ELISA en relation avec l'évolution de l'infection au

cours du temps. Cette valeur est généralement comprise entre 15 % et 97 % pour les animaux forts excréteurs voire en phase clinique (Tableau 7).

**Tableau 7. Valeur de sensibilité des tests ELISA en fonction du niveau d'excrétion**

<b>Catégories</b>	<b>Définition</b>	<b>Sensibilité</b>	<b>Source</b>
<b>Faibles excréteurs</b>	(< 10 CFU)	15%	Whitlock <i>et al.</i> , 2000
<b>Excréteurs Modérés</b>	(10 < CFU < 50)	50%	Whitlock <i>et al.</i> , 2000
<b>Forts excréteurs</b>	≥10 CFU et prévalence troupeau > 25%	95%	Tiwari <i>et al.</i> , 2006
	≥10 CFU et prévalence troupeau < 25%	75%	Whitlock <i>et al.</i> , 2006
	CFU > 50	75%	Whitlock <i>et al.</i> , 2000
<b>« Très » forts excréteurs</b>	≥100CFU	97%	V.Weering <i>et al.</i> , 2007
<b>Expression clinique</b>	Signes cliniques évocateurs	88%	Tiwari <i>et al.</i> , 2006
	(diarrhée, amaigrissement)	87%	Whitlock <i>et al.</i> , 2000

La probabilité de détecter des bovins infectés âgés de plus 2 ans avec un ELISA est de 6 % alors que pour des bovins de cinq ans au moins, elle est de 50 % (Nielsen et Toft, 2006, 2008). Un bovin à une probabilité maximale d'être identifié comme positif par l'ELISA entre 2,5 et 4,5 ans (Nielsen et Ersboll, 2006). L'étude de Nielsen (2002) montre que la probabilité d'obtenir une réponse positive est deux à trois fois plus faible chez les vaches primipares que chez les multipares.

Par ailleurs, le stade physiologique influe aussi sur la production des anticorps. Ainsi, la probabilité de détecter des vaches multipares positives avec l'ELISA est deux à trois fois plus élevée par rapport aux vaches primipares. De plus, la concentration des anticorps spécifiques (densité optique plus élevée) augmente en début de lactation dans le colostrum, et en fin de lactation dans le sang et dans le lait (Nielsen *et al.* 2002 a et b).

La spécificité des ELISA est variable, et la littérature rapporte des spécificités entre 83% et 100% (Nielsen et Toft, 2008) au sein de troupeaux infectés ou au statut inconnu. Peu d'études ont publié des valeurs de la spécificité des tests au sein de troupeaux indemnes. L'étude de Wells et Collins (2006) estime, à partir des séra de 347 vaches issus de troupeaux indemnes de paratuberculose, une spécificité de 96 % pour l'ELISA IDEXX® et 99% pour un ELISA fourni par CSL (Biocor).

## Variations des caractéristiques des ELISA sur sérum en fonction de leur utilisation et de leur interprétation

La répétition des tests sur une période donnée augmente la sensibilité de l'ELISA. Ainsi Nielsen (2006), montre qu'on détecte 19% plus de vaches infectées avec un ELISA mensuel plutôt que biennal. Généralement la spécificité de l'ELISA varie selon les tests de 80 % à 100 %. En 2006, l'étude de Sweeney et Whitlock souligne qu'une augmentation de la fréquence du dépistage sur les animaux augmente certes la sensibilité du test, mais augmente aussi la probabilité d'avoir des animaux faussement positifs et donc une diminution de la spécificité du test.

Les références actuellement publiées montre une inconstance de la valeur du seuil de positivité de l'ELISA, c'est à dire que la valeur de densité optique constituant la limite entre des résultats considérés comme positifs et ceux considérés comme négatifs, modifie très significativement l'interprétation du résultat. Ainsi une diminution du seuil de positivité augmente la sensibilité du test mais diminue sa spécificité puisqu'il y a une augmentation du nombre de faux positifs, et vice versa si on augmente le seuil de positivité du test. Aussi, en fonction de l'objectif de l'étude qu'il soit la détection d'un maximum d'animaux infectés ou la détection des animaux réellement infectés, il faut choisir le test adéquat en fonction de sa sensibilité et de sa spécificité.

L'interprétation du résultat de l'ELISA est habituellement dichotomique (positif/négatif), mais une interprétation plus fine est aujourd'hui favorisée. Ainsi, plusieurs seuils sont proposés pour parvenir à une classification en trois voire quatre catégories : négatif /douteux/positif.

Adaska *et al.* (2002) ont étudié les valeurs intrinsèques des ELISA produits par la société IDEXX (Seuil S/P ratio fourni par le fabricant : 0,25) par des tests répétés 10 fois sur 201 sérums de bovins adultes issus de 52 troupeaux différents, et déjà testés une première fois avec le même test. Ils ont mis en évidence que les résultats autour du seuil fourni étaient peu fiables, indiquant une mauvaise répétabilité. Ils ont alors déterminé, pour un indice de confiance donné, l'intervalle des résultats douteux (Tableau 8).

**Tableau 8. Mise en évidence d'une plage de résultats douteux en ELISA en fonction du niveau de confiance attendu (Adaska *et al.*, 2002)**

<b>Indice de confiance attendu</b>	<b>Intervalle des valeurs des résultats considérés comme douteux (S/P ratio)</b>
<b>85%</b>	0.2-0.35
<b>90%</b>	0.11-0.41
<b>95%</b>	0.10-0.43

Ainsi, pour un risque d'erreur fixé à 5% (indice de confiance égal à 95 %), seuls les résultats < 0,10 peuvent raisonnablement être considérés comme réellement négatifs, et ceux supérieur à 0,43 comme réellement positifs. Les auteurs estiment que les sources de variation entre ces résultats ont pour origine des facteurs intrinsèques du test (en fonction du numéro du lot de production de la trousse commerciale) ou d'erreurs de manipulation (la température des réactifs au moment de l'utilisation, la lecture de la densité optique, une erreur technique), ou encore du statut immunitaire des animaux.

L'étude de Collins et al. (2002) basée sur les rapports de vraisemblance (likelihood ratios ou LR) de l'ELISA commercialisé par IDEXX, propose des recommandations quant à l'utilisation et à l'interprétation des résultats de cette trousse commerciale. Les LR donnent la même information que la VPP (probabilité qu'un individu positif soit effectivement infecté), mais en s'affranchissant de la prévalence. Aussi, en comparant les résultats de cette trousse à ceux d'autres ELISA, à ceux de la coproculture (milieu liquide et solide), à ceux de la technique de fixation du complément, et à l'état clinique des animaux, Collins a proposé cinq intervalles d'interprétation de l'ELISA IDEXX auxquels il fait correspondre une interprétation ainsi qu'une conduite à tenir. (Tableau 9).

**Tableau 9. Application des rapports S/P pour l'interprétation des résultats de l'ELISA IDEXX pour la détection de *Map* dans des élevages laitiers à prévalence non nulle (Collins, 2002)**

S/P ratio	Interprétation	Explication	Recommandations
0-0,09	NEGATIF	Pas d'anticorps détectable Individu non infecté ou concentration des Ac en dessous du seuil de détectabilité du test	Tester à nouveau dans 6 à 12 semaines
0,10-0,24	SUSPECT	Traces d'Ac détectables mais stade précoce de la maladie Excrétion faible ou nulle de <i>Map a priori</i> Probabilité d'infection 5 à 15 fois supérieure au stade précédent	Mesures d'hygiènes au moment de la mise bas et gestion du veau
0,25-0,39	FAIBLEMENT POSITIF (considéré infecté sur la base du seuil de détection du fabricant)	Faible quantité d'Ac Excrétion faible de <i>Map</i> (lactation supplémentaire envisageable)	Mesures d'hygiènes au moment de la mise bas et gestion du veau
0,40-0,99	POSITIF	Quantité modérée d'Ac Excrétion intermittente de <i>Map</i>	Conseiller la réforme de l'animal
1-10	FORTEMENT POSITIF	Quantité élevée d'Ac Stade clinique évocateur Excrétion massive de <i>Map</i>	Réforme immédiate

Ac : anticorps

Au-delà de l'application à l'échelle individuelle, cette catégorisation prend toute son importance à l'échelle du troupeau. Le nombre de catégories et les actions qui en découlent doivent répondre aux objectifs d'utilisation du test au sein de l'élevage (Nielsen et Toft, 2008).

### Variations des caractéristiques des ELISA sur sérum liées au protocole

Les préparations antigéniques utilisées pour la fabrication des tests sont très variables. Tout l'enjeu est d'identifier un antigène (au sens mélange d'antigènes) qui soit :

- exclusif de *Map* (spécificité maximale) pour ne pas avoir de réaction croisée avec des anticorps non *Map*-spécifiques chez des individus ayant été exposés à d'autres bactéries que *Map*, (Sugden, 1997), notamment *Mycobacterium avium* subsp. *avium* dont le génome est très proche de celui de *Map*. L'étude de Bannantine et al. (2002) a identifié 40 séquences qui sont exclusives du génome de *Map*,
- reconnu par les anticorps des individus infectés par *Map*, en particulier au stade précoce de l'infection.

La revue de Mikkelsen (2011) répertorie 115 antigènes différents cités dans des articles de recherche sur *Map* entre 1999 et 2009, et utilisés dans une méthode indirecte (ELISA, IDR et IFN- $\gamma$ ). Certains antigènes actuellement utilisés sont des antigènes recombinants, qui ont un rendement supérieur aux antigènes naturels, et surtout, dont la production peut être standardisée. Cependant, la majorité de ces études sont faites sur un faible nombre d'animaux, de sorte que très souvent, les paramètres de sensibilité et de spécificité ne sont pas définis avec suffisamment de précision, pour être exploitables.

Par ailleurs, l'étude de Gumber et Whittington (2009) suggère que *Map* exprime un répertoire d'antigènes qui change tout au long de l'évolution de l'infection, en fonction de l'environnement dans lequel il se trouve. L'utilisation de mélange d'antigènes regroupant des antigènes de *Map* de différents types (antigène sécrété, antigène membranaire, paroi, ou lipoprotéines) serait donc préférable. Plusieurs auteurs s'accordent pour dire que les efforts de développement et de réalisation d'études cliniques doivent se poursuivre (Mikkelsen, 2011 ; Mon et al. 2012)

Au sein de troupeaux sans paratuberculose, la spécificité est significativement différente entre un ELISA n'utilisant pas l'absorption sur *M.phlei* ( $Sp = 84,7\%$  et  $Sp = 87,9\%$ ) et ceux incluant cette étape ( $Sp > 98\%$ ) (Collins, 2005, Mc Kenna, 2005).

## Discordance de résultats entre les ELISA sur sérum

Quelques études rapportent également des discordances entre les résultats de différentes trousse commerciales testées au sein de troupeaux infectés avec un niveau d'accord faible à moyen (Mc Kenna, 2006 ; Dieguez, 2009) (tableau 10).

**Tableau 10. Degrés d'accord entre les tests ELISA sur sérum au sein de troupeaux infectés**

Trousse commerciale	Degrés d'accord kappa		Autres informations
	Mc Kenna, 2006	Dieguez, 2009	
A et C	0.18	0.14	Troupeaux infectés Les animaux justes au-dessus du seuil de positivité sont classés comme négatifs
A et B	0.25	0.16	
B et C	0.33	0.19	

A : SVANOVIR Para-TB-Ab, Svanova Biotech ; B : HerdChek M. Pt., IDEXX ; C : ParaCheck, CSL/Biocor

Cependant Collins (2005), estime un niveau d'accord bon ( $k = 0,77$  à  $0,85$ ) en comparant les résultats des tests sérologiques (HerdCheck®, IDEXX ; Parachek ®CSL, Biocor ; ELISA® paratuberculose, Pourquier) sur les animaux ayant une culture positive au sein de troupeaux infectés (2094 vaches dans 7 troupeaux).

Ainsi, d'après Mc Kenna (2006) la faiblesse d'accord entre les ELISA peu fournir des informations erronées et incohérentes au sein de troupeaux avec une prévalence faible ou nulle. Cela peut entraîner des difficultés d'interprétation et la non-satisfaction des éleveurs adhérents à un programme de sélection.

Par ailleurs, Collins (2005) décrit une différence de spécificité en fonction du troupeau sur certains ELISA. Il suggère que cela est dû à une différence de composition des antigènes fixés aux microplaques du test, et à une différence qualitative et quantitative de la flore microbienne (dont d'autres mycobactéries) à laquelle les animaux sont exposés au sein du troupeau. Ainsi il estime que la détermination de la spécificité d'un test devrait se faire sur des troupeaux issus de zones géographiques différentes.

#### **2.4.1.1. ELISA sur lait individuel**

Les protocoles ELISA sur sérum ont été adaptés pour une détection des anticorps dans le lait. Cependant, peu d'études ont étudié les qualités diagnostiques des ELISA à partir d'échantillons de lait individuels. Toutefois, l'étude de Van Weering *et al.* (2007) met en évidence une sensibilité, pour les troupeaux infectés et les animaux excréteurs (> 10 UFC/tube), des ELISA individuels de 89%, et souligne que les résultats d'ELISA individuels sur le lait et le sérum sont fortement corrélés.

La première semaine de lactation est très propice au dépistage des animaux à la phase sub-clinique de la maladie (du fait de la concentration naturelle des anticorps dans le colostrum). D'après Nielsen et Toft (2012), le lendemain du vêlage, la probabilité de détection est 27 fois plus élevée que sur l'ensemble de la période J7 à J500. Le colostrum contient en effet des anticorps IgG1, et de façon moindre des IgG2, à une concentration beaucoup plus élevée que le sang ou le lait. Or les anticorps IgG2 spécifiques de *Map* sont associés au stade précoce de l'infection lorsque la réponse immunitaire à médiation cellulaire est prédominante (Koets *et al.* 2001). Ainsi, un test ELISA positif réalisé dans la fenêtre de temps J1-J8 semble détecter un individu infecté sub-clinique pour lequel la transition réponse cellulaire-réponse humorale n'a pas encore eu lieu (et qui le plus souvent n'est pas excréteur de *Map*). Cependant, Archambault *et al.* (1988) a émis l'hypothèse que des ELISA réalisés durant la période colostrale pourraient être faussement positifs à cause des réactions croisées qui seront d'autant plus fréquentes que la concentration totale des immunoglobulines est élevée.

Ainsi en l'absence d'informations et d'évaluations plus précises, Nielsen et Toft (2012) recommandent d'exclure la période J1-J6 pour la recherche sérologique à partir du lait.

### **2.4.2. Tests pour la détection de la réaction immunitaire à médiation cellulaire**

#### **2.4.2.1. Intradermoréaction**

Elle est basée sur la réaction d'hypersensibilité retardée de type IV (réaction immunitaire à médiation cellulaire) au point d'injection de la tuberculine PPD (pour Purified Protein Derivative). La mesure de l'épaisseur du pli de peau après 72h est comparée à l'épaisseur du pli de peau au moment de l'injection. Si la différence d'épaisseur est supérieure à 4 mm, alors l'animal est considéré comme positif. Cependant la corrélation entre le résultat et le statut de l'animal est



mauvaise (Chiodini *et al.*1984, Collins, 1996). C'est une méthode peu utilisée à l'échelle individuelle ou du troupeau à cause de ses faibles valeurs intrinsèques et des difficultés de réalisation. Des réactions faussement positives peuvent apparaître et il y a une réaction croisée avec *Mycobacterium bovis*, l'agent responsable de la tuberculose bovine.

#### 2.4.2.2. Test à l'interféron gamma

Cette méthode mesure la production d'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) à partir d'une culture de sang total mise au contact d'un antigène spécifique de *Map*. L'IFN- $\gamma$  est une cytokine produite par les lymphocytes T CD4 suite à un contact préalable avec l'antigène au cours de l'infection. La mesure de la concentration d'IFN- $\gamma$  libérée par les LT permet donc de mettre en évidence les animaux qui ont été sensibilisés vis-à-vis des antigènes de *Map*.

Le prélèvement de sang est réalisé sur un tube contenant de l'héparinate de lithium. Il y a d'abord une étape de stimulation antigénique au cours de laquelle le sang est incubé avec un antigène spécifique de *Map* (PPD : *Purified Proteine Derivate de M. avium paratuberculosis*). Ensuite, les surnageants de la culture sont prélevés et placés dans une plaque ELISA pour la quantification de la concentration d'IFN- $\gamma$  par ELISA.

Dans les études publiées (Tableau 11), la sensibilité de ce test n'est évaluée que pour des animaux excréteurs. Elle varie entre 13 et 85 % selon l'âge des animaux. Sa spécificité est de 94 %, mais sa sensibilité est moyenne à faible. Huda *et al.* (2003) ont établi des sensibilités en fonction de la classe d'âge des animaux.

**Tableau 11. Sensibilité (Se) et Spécificité (Sp) des tests IFN-  $\gamma$  et de l'IDR**

Tests	Test de référence	Population testée	Se	Sp	Commentaires	Source
Test IFN- $\gamma$	Culture fécale	24 bovins provenant d'un troupeau avec un historique de cas clinique	13%	88%	Choix de la population cible rend l'étude peu fiable	Paolicchi <i>et al.</i> , 2003
Test IFN- $\gamma$ (IDEXX)	Culture fécale et ELISA sur lait individuel	205 bovins provenant de 10 troupeaux infectés et 110 bovins issus de 5 troupeaux non infectés.	50%	94%	Age : 1 à 2 ans	Huda <i>et al.</i> , 2003
			85%	94%	Age : 2 à 3 ans	
			75%	94%	Age : > 3ans	

Le test IFN- $\gamma$  existe depuis plus de 20 ans mais est très peu utilisé. Jungersen (2012) explique cette faible utilisation par :

- une méthode exigeante avec des équipements de laboratoire spécifiques et une technicité particulière (traitement des prélèvements dans la journée, stimulation antigénique préalable dans un milieu de culture cellulaire, etc...), et un coût élevé,
- Une faible spécificité chez les animaux âgés de moins de 12-15 mois due à une production non spécifique d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK (Natural killer) suite à l'exposition à l'antigène PPDj (Jungersen *et al.* 2002 ; Olsen *et al.* 2005),
- Une faible valeur prédictive du test pour l'identification des animaux qui vont effectivement être excréteurs et séropositifs ultérieurement (et donc détectables par PCR et/ou ELISA) (Huda *et al.* 2004 ; Mikkelsen, 2009),
- Une baisse significative du niveau de production de l'IFN- $\gamma$  lors de la stimulation par PPDj pour les échantillons de sang conservé au-delà d'une journée (Rothel, 1992 ; Jungersen 2002).

D'après l'étude de Mikkelsen *et al.* (2009), l'ajout d'interleukine IL-12 bovine lors de la stimulation antigénique augmente la production d'IF- $\gamma$  dans les échantillons prélevés la veille du test. Jungersen ajoute que cette potentialisation de la production d'IFN- $\gamma$  par l'IL-12 est parfois même supérieure à celle permise par la stimulation de sang frais sans IL-12, et qu'elle induit très peu de production d'IFN- $\gamma$  non spécifique.

Plusieurs études ont été menées afin d'identifier l'antigène idéal qui limiterait les réactions croisées et serait assez immunogène pour déclencher une activation cellulaire. Malgré plusieurs études réalisées à partir d'antigènes purifiés ou recombinants (Olsen *et al.* 2000b, 2005 ; Shin *et al.* 2005 ; Koets, 1999, Bannantine et Stabel, 2000), Mikkelsen estime dans une revue des données disponibles datant de 2011 qu'il n'y a pas à ce jour d'étude ayant identifié un antigène répondant à ces critères.

L'étude de De Silva (2013) indique qu'un taux de production faible d'IFN- $\gamma$  est observé chez des animaux qui seront excréteurs et porteurs de lésions tissulaires multibacillaires sévères (veaux de 3-4 mois inoculés et abattus 12 mois après l'infection). Cette étude est appuyée par celle de Jungersen pour conclure que la détection d'une concentration élevée d'IFN- $\gamma$  est associée à une réponse immunitaire cellulaire forte qui peu juguler, voire éliminer l'infection. Aussi, Jungersen estime que l'abattage des animaux ayant un résultat au test IFN- $\gamma$  fortement positif, au sein d'un

troupeau avec une forte prévalence serait délétère car on prend le risque d'éliminer des animaux qui développent une réponse éventuellement protectrice vis-à-vis de l'infection.

De Silva, insiste sur le fait que l'IFN- $\gamma$  est seulement un marqueur de l'exposition des animaux à *Map*. Ainsi, la détection de l'infection par ce test, à un stade précoce de l'infection peut être utile lors d'introduction d'animaux ou pour éliminer précocement les animaux exposés à *Map* dans le contexte de troupeaux à très faible prévalence.

D'après Jungersen (2012), le seul moyen de certifier à terme un troupeau indemne de paratuberculose est d'évaluer l'exposition des jeunes animaux à *Map* afin de mettre en place une conduite de troupeau pouvant diminuer la transmission intra-troupeau. Il estime que le test IFN- $\gamma$  est actuellement le seul à pouvoir servir cet objectif.

## **2.5. Intérêt de l'utilisation des tests de mélange ou environnementaux**

Ces dix dernières années, il y a eu de fortes évolutions de l'utilisation des tests de diagnostic de la paratuberculose. L'apparente nécessité d'un diagnostic à l'échelle du troupeau, les tentatives d'élaboration de plans de qualification des troupeaux, ainsi que le délai et le coût élevés de certains tests individuels (coproculture, PCR) appliqués à l'échelle du troupeau, ont finalement encouragé le développement de méthodes de diagnostic à partir de mélanges (lait de mélange ou tank, sérum, fèces) et/ou sur des prélèvements d'environnement. Van Schaik (2003), estime par exemple que la culture fécale en petits mélanges au sein d'un troupeau de 100 animaux avec une forte prévalence, diminue les coûts d'analyse de 43%, par comparaison à une stratégie de détection individuelle.

Les enjeux sont d'établir une stratégie diagnostique associant une sensibilité troupeau et une spécificité troupeau les plus élevées possibles, à un coût de mise en oeuvre raisonnable.

Dans le cas de tests en mélanges, les risques d'erreur vont être majorés par la faible prévalence intra-troupeau (< 5%), et par le défaut de sensibilité des tests disponibles pour la détection des formes sub-cliniques. De plus, la taille de l'échantillon au sein du troupeau et sa représentativité vont participer également aux risques d'erreur. Par exemple, plus le nombre d'individus testés au sein du troupeau est grand, plus la valeur de la prévalence apparente est proche de la prévalence réelle de l'infection au sein de la population étudiée.

Les tests principalement utilisés, seuls ou combinés, sont les ELISA sur lait et/ou sur sérum, la coproculture sur prélèvements individuels ou en mélanges, la PCR sur le lait et les fèces, le lait de tank, ou plus récemment sur des échantillons de matière fécale prélevée dans l'environnement de l'élevage.

### **2.5.1. Mélange de matières fécales**

Le mélange d'un petit nombre d'échantillons de fèces individuels permet de déterminer à moindre frais, le statut d'un troupeau (troupeau considéré comme positif si au moins un mélange est positif), d'estimer la prévalence intra-troupeau, et de cibler les analyses individuelles puisque les échantillons des mélanges positifs peuvent être testés individuellement.

L'utilisation de mélanges en coproculture a peu d'effet sur la spécificité troupeau puisque la spécificité du test est proche de 100%, et la sensibilité troupeau est supérieure à 70%. Cependant plusieurs auteurs rapportent des valeurs de sensibilité variables en fonction des éléments suivants :

- La taille du mélange : Van Schaik et al. (2007) détermine qu'il n'y a pas de différence significative entre les mélanges de 5 et de 10 échantillons avec un protocole de culture sur milieu solide HEY et une qPCR *IS900* (Se=46% avec IC 95% : 29-63% pour les mélanges de 5 ; et Se = 48% avec IC 95% : 28-65% pour les mélanges de 10) ; l'effet dilution décrit par Stehman en 2001 n'a pas d'impact à ce niveau de mélange.
- La prévalence intra-troupeau et la taille du troupeau : Van Schaik, (2003) estime que la sensibilité troupeau augmente avec la taille du troupeau et la prévalence (probabilité de presque 100% de détecter au moins un animal fort excréteur dans un troupeau de plus de 250 vaches, par la culture para-JEM). Cependant il estime à seulement 53%, la probabilité de trouver au moins un animal faible excréteur dans un troupeau à faible prévalence (<5%) et à faible effectif ( $\pm 100$  animaux).
- Le niveau d'excrétion : la sensibilité de la détection en mélange augmente avec la présence d'excréteurs moyens ou forts. Van Schaik *et al.* (2007) indiquent que la sensibilité de la détection en mélange contenant un faible excréteur est seulement de 26 % pour les mélanges de 5 animaux, et de 24% pour les mélanges de 10 échantillons. Ainsi, Eamens *et al.* (2008)

précisent qu'il faut réduire la taille des mélanges à 5 prélèvements pour détecter des animaux faibles excréteurs (utilisation d'une culture radiométrique).

Par ailleurs, la sensibilité de la culture individuelle est équivalente à celle de la culture en mélange (Kalis *et al.*, 2000 ; Christensen *et al.*, 2000), et plus particulièrement dans un contexte de faible prévalence (Tavornpanich, 2004). Cette dernière étude conclut que des mélanges de 10 échantillons prélevés dans un troupeau avec une prévalence inférieure à 4%, permet de discriminer plus de 81 % des troupeaux infectés.

Cependant Van Schaik et Tavornpanich rapportent des résultats positifs de mélanges alors que les cultures individuelles faites en parallèle sont négatives. Les auteurs expliquent cette observation par une mauvaise homogénéisation de l'échantillon individuel avant mélange et prélèvement de la fraction destinée à la culture.

### **2.5.2. Tests sur lait de tank**

L'excrétion de *Map* dans le lait est estimée à 2-8 UFC/50 mL pour les animaux infectés en phase sub-clinique, et < 100 UFC/mL pour les infectés en phase clinique (Sweeney *et al.*, 1992 ; Giese et Ahrens, 2000).

Au-delà de l'objectif diagnostique pour le troupeau, la mise en évidence et la quantification de *Map* dans le lait destiné à la consommation humaine est un thème récurrent de santé publique. En effet, *Map* est suspecté d'être un facteur associé à la maladie de Crohn chez l'homme. Les procédés de pasteurisation et de réfrigération du lait ne permettraient pas une décontamination totale, mais seulement une diminution du nombre de germes de l'ordre de 4 à 5 Log lors d'une forte contamination (Grant *et al.* 2005 ; Rademaker *et al.* 2007).

#### ***2.5.2.1. ELISA lait de tank***

L'étude de Van Weering *et al.*, (2007), avec une trousse commerciale ELISA Pourquier utilisée sur le lait de tank, montre que la spécificité évaluée à 100% est conservée avec une valeur seuil S/P de 12,5% dans le but de discriminer des troupeaux contenant au moins deux individus séropositifs (le fabricant indique  $Sp = 100\%$  pour une valeur du seuil à 30%). Ainsi, pour une séroprévalence intra-troupeau de 3% ou plus et pour un seuil fixé à 12,5, la VPP est égale à 67 % et la VPN à 94%.

D'une manière générale, pour une interprétation dichotomique avec une bonne spécificité, la valeur seuil fixée à 12,5% semble offrir une meilleure sensibilité quel que soit la prévalence intra-troupeau.

#### **2.5.2.2. PCR sur lait de tank**

##### A partir des filtres

Quelques études se sont intéressées à la détection de *Map* par PCR sur un ou deux filtres du circuit du lait. Les qualités de détection sont bonnes mais seulement pour une interprétation dichotomique dans un contexte de prévalence intra-troupeau supérieure ou égale à 10 %. Dans ce contexte, l'étude de Slana *et al.* (2012) rapporte une valeur de Se= 85,5 %, de Sp = 100% et une VPP  $\geq$  94.3%.

##### Sur le lait de grand mélange ou lait de tank

Les données publiées rapportent un seuil de détection de 10 à 100 UFC/mL de lait de tank (Pillai et Jayarao, 2002, PCR IS900) (tableau 13). L'étude de Wilson *et al.* (2010) montre que la méthode qPCR (basée sur la détection de *IS900*) et la trousse commerciale ELISA Pourquier sur des prélèvements de lait de tank (2 prélèvements à un mois d'intervalle) ont une concordance globale de 76 %, mais qui se réduit à 53% pour les troupeaux infectés.

#### **2.5.3. Les prélèvements d'environnement**

Compte tenu de la grande résistance de *Map* dans le milieu extérieur, de nombreux auteurs ont tenté de préciser la distribution spatiale de *Map* dans l'environnement d'un troupeau infecté, ainsi que les localisations à prélever préférentiellement pour identifier la présence du bacille. Ainsi les endroits où la contamination est la plus grande sont : l'aire d'attente de la salle de traite, les couloirs de l'aire d'exercice, l'aire de stockage des effluents solides et les eaux usées (Eisenberg *et al.* 2010b ; Berghaus *et al.* 2006 ; Lombard *et al.* 2006). Dernièrement, Eisenberg *et al.* (2012) ont mis en évidence la présence de *Map* dans les poussières accumulées et les filtres à air (extracteurs), suggérant que ces échantillons pourraient être utilisés pour le diagnostic de troupeau.

Par ailleurs, Berghaus (2006), fait remarquer que les prélèvements issus de matières fécales de l'environnement sont de bons prédicteurs du statut du troupeau à moindre coût, et ne nécessitent aucune intervention sur les animaux.

Cette approche permet de discriminer les élevages infectés contenant des animaux excréteurs des élevages indemnes ou infecté mais où l'excrétion ou la proportion d'animaux excréteurs est faible.

### **2.5.3.1. Culture**

La grande résistance de *Map* dans l'environnement, -plus de 200 jours dans le fumier - (Jorgensen, 1977), rend possible l'utilisation de prélèvements de matière fécale dans l'élevage pour la détection directe du pathogène.

D'après l'étude de Raizman, la culture à partir d'échantillons prélevés dans l'environnement (aire d'exercice, aire de stockage des effluents solides, box de vêlage) permet d'obtenir des résultats similaires à ceux obtenus sur des mélanges de 100 échantillons de fèces pour établir le statut sain ou infecté d'un troupeau. Cette approche semble cependant avoir une sensibilité faible dans les troupeaux à faible prévalence (<10 UFC/tube), mais reste suffisamment sensible pour la détection d'élevages contenant des individus forts excréteurs (Raizman *et al.*, 2004 ; Smith *et al.*, 2011 ; Donat et Schau, 2012).

Dans leur étude, Berghaus *et al.* (2006) comparent, au sein de 23 élevages, la capacité de discrimination infecté/indemne des cultures sur échantillons prélevés dans trois sites de l'environnement (couloir de sortie de la salle de traite, autour des abreuvoirs, derrière les cornadis) en comparaison de sérologies individuelles, et de coprocultures individuelles et en mélange. Un élevage est considéré comme infecté selon la méthode ELISA lorsque plus de 3% des résultats individuels sont séropositifs. Ils montrent que la proportion d'élevages détectés infectés (environ 70%) est similaire pour ces trois méthodes, mais que le prix total est respectivement de 5 et 13 fois plus élevé pour les ELISA et les cultures fécales. De plus, l'étude met en évidence que la proportion de résultats positifs sur échantillons d'environnement est significativement corrélée au nombre d'individus séropositifs dans l'élevage. Cette constatation est confirmée par l'étude de Pillars *et al.* (2009).

Les auteurs rappellent que, en raison de la forte résistance de *Map* dans l'environnement, on peut avoir des résultats environnementaux positifs en culture malgré une forte diminution de la séroprévalence dans l'élevage.

#### **2.5.3.2. PCR**

D'après Eisenberg *et al.* (2010 a, b), les résultats de l'analyse des prélèvements environnementaux par PCR est représentative des résultats de la détection par la culture. Cependant, Roger *et al.* (2010) recommandent de choisir la méthode utilisant la culture du type Para-Jem plutôt que la PCR pour détecter les troupeaux excréteurs. L'étude de Delbrouck *et al.* (2008) évalue la spécificité et la sensibilité troupeau de la PCR entre 53 et 62% à partir de prélèvements d'environnement issus de l'aire d'exercice (tableau 12).



Tableau 12. Caractéristiques des PCR sur échantillons d'environnement ou lait de tank pour évaluer le statut d'un troupeau (Guicharnaud, 2009)

Tests	Test de référence	Population testée	Sensibilité troupeau	Spécificité troupeau	Autres informations	Source
<b>IS900-PCR sur lait de tank</b>	Au moins un individu positif dans le troupeau en culture fécale	29 troupeaux	21%	50%		Jayaro <i>et al.</i> , 2004
<b>PT-PCR Taqvet LSI® sur fèces de mélange</b>		38 troupeaux de statut connu, 1436 vaches	8% pour L3 à 62% pour L1	96%		
<b>PT-PCR Taqvet LSI® sur fèces d'aire d'exercice</b>	Au moins un individu positif dans le troupeau au test PCR et ELISA ID-Vet	479 en L1,	62%	88%		
<b>PT-PCR Taqvet LSI® sur fèces de salle de traite</b>		328 en L2,	77%	96%		
<b>PT-PCR Taqvet LSI® sur lait de tank</b>		262 en L3,	8%	100%	Les mélanges sont préparés en fonction du rang de parité (L1, L2, L3, L4+) et mise bas récentes FV	Delbrouck, 2008
<b>PT-PCR Taqvet LSI® sur fèces de mélange</b>		364 en L4+ 216 FV	11% pour L3 à 42% pour L1	>94%		
<b>PT-PCR Taqvet LSI® sur fèces d'aire d'exercice</b>	Au moins un individu positif dans le troupeau au test PCR et ELISA LSI	38 troupeaux de statut connu, 1436 vaches	53%	95%		
<b>PT-PCR Taqvet LSI® sur fèces de salle de traite</b>		479 en L1,	56%	95%		
<b>PT-PCR Taqvet LSI® sur lait de tank</b>		328 en L2,	5%	100%		
		262 en L3,				
		364 en L4+ Et 216 FV				
<b>Real-time PCR sur lait de tank</b>	Culture fécale d'environnement	56 troupeaux avec en moyenne 92 bovins	42%	94,4%	La sensibilité analytique de la RT-PCR est de 100 bactéries/mL de lait	Herthnek <i>et al.</i> , 2008

L1 : première lactation ; L2 : seconde lactation, L3 troisième lactation, L4+ : quatrième lactation et plus ; FV : fraîche vèlée

## 2.6. Intérêts de l'utilisation combinée des tests

L'utilisation de tests diagnostiques sur des échantillons de petit ou de grand mélange participe à l'objectif de réduction des prélèvements et du coût analytique lorsqu'on souhaite déterminer le statut d'un troupeau. Plusieurs études récentes proposent de combiner les tests pour augmenter la puissance du dépistage.

Une démarche par étapes est conseillée (Roger *et al.* 2010 ; Guatteo *et al.*, 2012) pour discriminer les troupeaux indemnes dans un premier temps, puis dans un deuxième temps, pour détecter les troupeaux à forte séroprévalence. Ainsi, l'étude de Guatto *et al.* (2011) propose de discriminer les troupeaux indemnes sur la base de deux séries de prélèvement d'environnement négatifs (aire d'exercice et aire d'attente), analysées à l'aide de la culture para-JEM et confirmées par qPCR, avec une sensibilité de 82% et une spécificité de 68%.

D'autres études proposent des combinaisons de tests, en vue de discriminer les troupeaux faiblement infectés des troupeaux indemnes. Ainsi l'étude de Chognard (2011) estime que la meilleure combinaison pour identifier les troupeaux indemnes (séroprévalence nulle au dernier contrôle et absence de cas cliniques depuis 3 ans) est la qPCR sur des échantillons prélevés dans l'aire d'exercice et dans l'aire d'attente, ou uniquement dans l'aire d'exercice à condition de l'associer à un ELISA sur sérum pour les primipares (Se=89%, Sp=59%). Cette étude est appuyée par celle de Moriceau (2013, comparaison qPCR et ELISA sur des prélèvements de fèces, sérum, et lait) qui estime que pour l'identification des troupeaux allaitants peu infectés, (séroprévalence < 5,5%), la combinaison la plus informative est l'utilisation concomitante de la qPCR sur un échantillon provenant de l'aire d'exercice et de résultats ELISA sur des mélanges de sérum des primipares (Se = 70% ; Sp = 70%).

En ce qui concerne l'identification de troupeaux laitiers infectés, les études de Chognard (avec une séroprévalence > 8% au dernier contrôle et présence ou non de cas cliniques depuis 3 ans) et Moriceau (avec une séroprévalence > 10,5%) s'accordent pour dire que la combinaison la plus informative est obtenue par la concomitance de résultats de qPCR positifs sur un prélèvement dans l'aire d'exercice et une qPCR positive sur des mélanges de fèces des vaches en première lactation (Se = 38%, Sp = 91% selon Moriceau ; Se=56%, Sp = 89% selon Chognard).

Sur le lait de tank, l'association de l'ELISA et de la qPCR présente une sensibilité de 57% pour discriminer les troupeaux contenant au moins un animal infecté. La probabilité qu'un résultat négatif (ELISA négatif et qPCR négative) soit faussement négatif (VPN) est de 43% dans un contexte de forte prévalence. Ainsi, Pillai et Jayaro concluent qu'un élevage peut être défini comme indemne à partir d'au moins quatre prélèvements (réalisés à 1 mois d'intervalle) testés négatifs en associant l'ELISA et la qPCR (VPN = 97% pour quatre échantillons négatifs).

## **2.7. Méthodes de classification actuelles**

### **2.7.1. En France**

En France, les méthodes de diagnostic ne sont pas règlementées. Des recommandations pour la qualification de cheptel indemne ont été éditées par l'ACERSA depuis 2002. Du fait de son coût très élevé et de contraintes trop fortes pour sa mise en place au regard des bénéfices escomptés, le dispositif ne répond pas aux besoins de l'ensemble des éleveurs. Par ailleurs, la certification proposée ne permet pas de classer les troupeaux non indemnes selon différents niveaux de risque liés à la proportion de bovins infectés et à la probabilité qu'ils excrètent massivement la bactérie responsable de la maladie. L'ANSES, dans son rapport d'avril 2009 recommande d'explorer les possibilités d'utiliser des tests de mélange pour définir le statut des cheptels et de proposer des plans d'action différents selon qu'il s'agit d'un cheptel infecté ou assaini.

Actuellement, un groupe d'étude travaille sur un projet visant à concevoir et évaluer des dispositifs de définition et d'utilisation des statuts de troupeau s'appuyant sur une analyse de risque et sur le principe de flux orientés des bovins entre cheptels en fonction de ces statuts (UMT maîtrise de la santé des troupeaux bovins, 2013).

### **2.7.2. Dans les autres pays (rapport ACERSA, 2002)**

Afin de disposer d'une vue d'ensemble, la Fédération Internationale du Lait (FIL) a décidé de créer un groupe de travail afin de rassembler les informations disponibles sur le sujet. Parmi 16 pays, certains avaient déjà entrepris des surveillances officielles. Certains ont entamé des actions allant des contrôles à l'importation jusqu'à l'annonce d'une éradication de la maladie chez les ruminants. D'autres découvrent seulement l'ampleur et la complexité de cette maladie animale. Un certain nombre de pays a également tenté d'élaborer des plans de

certification des cheptels. C'est le cas notamment des Etats-Unis d'Amérique, des Pays-Bas et de l'Australie. Les modalités retenues apparaissent différentes :

- sur le plan des techniques employées (alternance ELISA - coproculture, mélanges de fèces, ELISA exclusivement), et le rythme d'application,
- concernant les animaux soumis aux dépistages,
- pour les contrôles à l'introduction,
- pour les contre-expertises.

Toutefois, deux principes sont communs à toutes les propositions de certification :

- il ne peut pas être établi une garantie définissant le statut « indemne de paratuberculose » tant la définition est délicate en raison de l'imperfection des tests décrits plus haut et de la complexité de la maladie,
- les certifications conférées sont à niveaux progressifs, reposant sur une probabilité croissante de non-infection du troupeau.

## **PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE**



# 1. CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

D'une manière générale, l'Organisme de Sélection, France Limousin Sélection (OS FLS) assure les fonctions d'orientation et de représentation de la race bovine. Il est à l'origine de l'établissement du Herd Book Limousin (HBL) dont le but est de certifier la qualité des reproducteurs Limousin de race pure appartenant à quelques 1750 adhérents et de leur attribuer des qualifications. Les éleveurs sélectionneurs adhérents disposent d'une génétique haut de gamme, mais doivent répondre à un cahier des charges strict. Ces troupeaux ont donc des contraintes sanitaires supplémentaires pour des maladies non réglementées.

Concernant la paratuberculose, le HBL indique que les adhérents doivent obligatoirement mettre en place au sein de leur élevage et sur l'ensemble de leur troupeau un plan de prophylaxie (dépistage et/ou assainissement) défini par le Groupement de Défense Sanitaire (GDS) de leur département, et que l'éleveur adhérent est seul responsable de la qualité sanitaire des reproducteurs qu'il diffuse. Si ces conditions ne sont pas respectées, l'éleveur risque une exclusion du HBL pendant le temps nécessaire à l'élimination de la maladie, et les veaux issus de l'élevage ne peuvent pas être admis à la station de reproduction. En plus des pertes économiques liées directement à l'exclusion de la filière de sélection, l'éleveur devra couvrir les frais d'analyses supplémentaires nécessaires au dépistage des animaux potentiellement infectés.

Actuellement, le GDS de l'Ariège propose aux éleveurs en sélection Limousine un dépistage annuel des animaux de plus de 24 mois par des tests sérologiques individuels. Or, depuis environ quatre ans, plusieurs élevages adhérents au HBL ont des tests sérologiques non-négatifs sur quelques animaux. Les GDS proposent dans ce cas de tester à nouveau les animaux positifs ou douteux par sérologie et par qPCR sur fèces. Il apparaît alors que certains résultats sont incohérents à quelques semaines d'intervalle, et que les PCR sur fèces de ces animaux sont régulièrement négatives.

L'apparition de ces résultats sérologiques non-négatifs et/ou incohérents, alors que les conséquences économiques qu'ils impliquent sont majeures, pose des difficultés de gestion au sein de ces élevages et ont conduit les vétérinaires sanitaires de ces troupeaux, ainsi que le GDS, à rechercher l'explication, ou tout du moins à vérifier les résultats obtenus par de plus amples investigations. *In fine*, les éleveurs sélectionneurs attendent également la mise en

place d'une démarche diagnostique pouvant attester au mieux du statut de leur cheptel pour la paratuberculose.

Au-delà de ce contexte particulier d'élevage, l'apparition de résultats faussement positifs en sérologie peut conduire à la réforme précoce d'animaux sains et provoquer une perte économique directe pour l'éleveur.

L'objectif de cette étude est i) d'objectiver les incohérences observées entre les résultats de tests sérologiques au sein de troupeaux régulièrement contrôlés et supposés indemnes de paratuberculose, et ii) de déterminer si les résultats non-négatifs en sérologie sont dues à une séroconversion des animaux (et donc à une contamination des troupeaux jusqu'alors supposés indemnes) ou à un défaut de spécificité des tests sérologiques ELISA utilisés pour le dépistage de la paratuberculose.

## **2. MATERIELS ET METHODES**

### **2.1. Troupeaux et animaux**

#### **2.1.1. Inclusion des troupeaux dans l'étude**

L'étude a été réalisée dans trois troupeaux (A, B et C). Ces trois troupeaux sont adhérents au HBL et ont été choisis car :

- ils ont un historique de résultats positifs en sérologie paratuberculose et ces résultats sont incohérents ou ne peuvent pas être confirmés,
- ces élevages sont conduits en troupeaux fermés avec comme uniques introductions, des taureaux issus de troupeaux certifiés sans paratuberculose et testés négatifs avant introduction,
- les éleveurs et leur vétérinaire sanitaire étaient volontaires pour la réalisation d'analyses complémentaires.



### **2.1.2. Inclusion d'un troupeau avec de la paratuberculose clinique endémique**

L'étude inclut également un troupeau qui a servi de témoin positif. Ce troupeau a pour caractéristiques:

- un historique de cas de paratuberculose clinique depuis plusieurs années,
- un éleveur volontaire pour la réalisation d'un dépistage au sein de son troupeau.

L'élevage se compose principalement de vaches de race limousine, mais certaines vaches utilisées comme nourrices sont de race Brune, ou Montbéliarde.

## **2.2. Questionnaire adressé aux éleveurs**

Afin de recenser les informations relatives aux caractéristiques des élevages, il a été demandé aux éleveurs de répondre à un questionnaire afin de connaître plus précisément :

- l'historique des résultats positifs ou douteux en sérologie (pour les troupeaux A et B supposés indemnes), et l'historique de la maladie pour le troupeau D reconnu infecté,
- la conduite du troupeau,
- la gestion des animaux détectés séropositifs,
- la gestion des introductions car la paratuberculose est une maladie qui est souvent introduite à la faveur d'un achat,
- les attentes des éleveurs à propos de l'étude.

Le questionnaire n'a pas été utilisé dans l'élevage C. Les réponses des trois autres éleveurs au questionnaire sont synthétisées dans les tableaux de l'Annexe 6.

## **2.3. Période d'étude et collecte des échantillons**

### **2.3.1. Identification du problème dans les troupeaux A et B adhérents au HBL (Janvier – Avril 2013)**

#### ***2.3.1.1. Echantillonnage***

Suite aux résultats sérologiques non-négatifs apparus durant la campagne de prophylaxie de Janvier 2013 dans les troupeaux A et B adhérents au HBL, les animaux incriminés ont été testés plusieurs fois entre Février et Avril 2013 avec le même ELISA par le LDA 09, et avec un autre ELISA par le laboratoire ID.vet. De plus, sur demande du GDS, ces animaux ont été testés en qPCR en Février 2013. Ainsi, entre six et 10 animaux ont été testés durant cette période dans les élevages A et B.

#### ***2.3.1.2. Prélèvements***

Les prélèvements d'échantillons de fèces, de sang sur tube sec et sur tube avec héparinate de lithium ont été réalisés par le vétérinaire sanitaire. Les échantillons de fèces ainsi que les sérums ont été envoyés au laboratoire ID.vet et au LDA09 pour les tests sérologiques. Les échantillons de sang total ont été acheminés rapidement au laboratoire ID.vet afin de permettre un test IFN- $\gamma$  dans les 10 heures suivant le prélèvement.

### **2.3.2. Période de dépistage global au sein des quatre troupeaux (Janvier 2014)**

Suite à l'identification des animaux non-négatifs en ELISA et négatifs en qPCR au sein des troupeaux A et B durant le premier semestre 2013, un dépistage individuel à l'échelle du troupeau a été réalisé dans ces deux cheptels, ainsi que dans les troupeaux C et D.

#### ***2.3.2.1. Echantillonnage***

Tous les animaux de plus de 24 mois présents dans les quatre élevages ont été prélevés. Ainsi, 375 animaux ont été prélevés dans les troupeaux supposées indemnes (A : n=158 ; B : n=158 ; C : n=59), et 60 animaux dans le troupeau avec de la paratuberculose (D) qui a servi de témoin positif.

### 2.3.2.2. *Echantillons et analyses*

Des échantillons de fèces et de sang ont été collectés selon les modalités suivantes :

- Echantillons de fèces : collecte réalisée directement dans le rectum avec gel et gant. Le prélèvement a été homogénéisé dans le gant avant d'être distribué dans trois pots à prélèvement préalablement identifiés. Les pots ont été acheminés à température ambiante jusqu'au laboratoire de l'ENVT (série de pots #1) et dans les locaux d'ID.vet (séries de pots #2 et #3) afin d'y être conservés à -20°C, puis utilisés pour la culture de mélange réalisée à LABOCEA, (Quimper, 29) ou les analyses par qPCR individuelles.
- Echantillons de sang collectés sur tube sec (5 mL) pour la préparation de sérum : le prélèvement a été réalisé à la veine caudale. Les tubes secs identifiés ont été acheminés au laboratoire ID.vet où ils ont été traités par décantation pour isoler le sérum en vue des analyses sérologiques par ELISA
- Echantillons de sang prélevés sur tube avec héparinate de lithium (10 mL) : le prélèvement a été réalisé à la veine caudale. Les tubes identifiés ont été transportés à température ambiante (16-22°C) dans les heures suivant le prélèvement au laboratoire ID.vet pour permettre un test IFN- $\gamma$  après stimulation antigénique, soit moins de 10 heures après le prélèvement.

Les prélèvements ont été effectués sur une demi-journée pour chaque troupeau par un groupe de six à huit personnes répartis aux différents postes de travail comme le prélèvement des échantillons, l'identification des tubes et pots, la répartition des prélèvements de fèces et la contention des animaux au besoin.

## 2.4. Techniques de laboratoire

Le tableau 13 résume les différents types d'échantillons, les types de test et les trousse commerciales utilisées dans cette étude.

**Tableau 13. Types d'échantillons, techniques et trousse commerciales utilisées**

Echantillon	Type de test	Trousse commerciale	Seuil de positivité
<b>Plasma</b>	IFN- $\gamma$ individuel	Stimulation antigénique développée par ID.vet® (culture de 20 heures) + <b>ID Screen®</b> <b>Ruminant IFN-g,</b> ID.vet	S/P < 35% : négatif S/P > 35% : positif
<b>Sérum</b>	ELISA individuel	<b>IDEXX®</b> Paratuberculosis Ab Test, IDEXX <b>ID Screen®</b> Paratuberculosis Indirect, ID.vet	S/P < 45% : négatif 45% < S/P < 55% : douteux S/P > 55% : positif S/P < 60% : négatif 60% < S/P < 70% : douteux S/P > 70% : positif
<b>Mélange de 10 fèces (2g/prélèvement)</b>	Coproculture milieu liquide en mélange +q PCR	<b>Trek ParaJEM ®Culture</b> + PCR LSI MagVET Universal-LSI VetMax® Triplex M	Ct < 45
<b>6g de fèces</b>	qPCR individuelle avec concentration de l'échantillon	<b>ADIAVET® PARATB REAL TIME,</b> Biomérieux, Avec <b>ADIAFILTER</b>	Ct < 38
<b>2 g de fèces</b>	qPCR individuelle	<b>Taqvet®</b> <i>Mycobacterium paratuberculosis</i> , Life Technologies	Ct < 40*

Pos : positif ; Neg : négatif ; Dtx : douteux ; Ct : Treshold cycle ; qPCR : PCR quantitative ;

\* Recommandations fabriquant Ct<45

### 2.4.1. Protocoles de PCR quantitative

Les deux trousse de PCR quantitative utilisent l'amplification de la séquence cible *IS900* et des sondes d'hydrolyse :

- Taqvet® *Mycobacterium paratuberculosis* (Life Technologies) utilisée par le LDA09 (Annexe 1)

- ADIAVET® PARATB REAL TIME (Biomérieux), avec ADIAFILTER® utilisée à l'ENVV (Annexe 2)

La trousse Magvet® (Life Technologies) propose un protocole d'extraction de l'ADN à partir de trois grammes d'échantillon de fèces, et utilise un système de fixation de l'ADN sur des billes magnétiques. L'amplification a été faite avec la trousse commerciale Taqvet® *Mycobacterium paratuberculosis* (Life Technologies) qui est identique à la trousse LSi VetMax®M paratuberculosis Advanced. La valeur du seuil de positivité (Ct) était fixée à 40 cycles.

L'analyse des échantillons avec la trousse ADIAVET® en utilisant le système de concentration ADIAFILTER®, a été réalisé à partir d'échantillons de six grammes de fèces. Ils ont été mis en suspension et homogénéisés, sédimentés avant d'être en partie déposés sur le système de filtre/tube ADIAFILTER®. Les culots obtenus après centri-filtration ont été mis en suspension et broyés avec des billes de verre à l'aide de l'agitateur Precellys®24. L'extraction a été faite en utilisant des trousse NucleoSpin®Tissue 96 (Macherey-Nagel), avec un système de purification de l'ADN sur colonnes de silice. L'amplification de l'ADN et la lecture des résultats a été réalisée avec un appareil Light Cycler 480® (Roche) en suivant le programme recommandé par le fournisseur. L'analyse des résultats a été réalisée avec le logiciel Abs Quant/Fit points associé au Light Cycler 480®. Le seuil de positivité a été fixé à 38 cycles.

#### **2.4.2. Sérologie par ELISA**

Un protocole très similaire est utilisé par les deux trousse commerciales ELISA qui ont été testées (Annexe 3):

- ID Screen® Paratuberculosis Indirect (ID.vet, Montpellier, France)
- IDEXX® Paratuberculosis Ab Test (IDEXX, Montpellier, France)

Les deux protocoles comprennent une étape de pré-incubation du sérum dans un tampon contenant *Mycobacterium phlei* pour éliminer les réactions croisées provoquées par d'autres mycobactéries ou autres bactéries.

Les échantillons sont ensuite transférés dans les puits de la microplaque sensibilisée avec l'extrait purifié de *Map*. En présence d'anticorps spécifiques de *Map* dans l'échantillon à tester, il se forme des immuns complexes Antigène–Anticorps. Après lavage, un conjugué anti-immunoglobuline de ruminant couplé à l'enzyme peroxydase est ajouté. Ce conjugué se

fixe sur les immuns complexes Antigène–Anticorps. Après lavage, le substrat de l'enzyme (TMB) est distribué dans les puits. En présence d'enzyme, le substrat est oxydé et développe une coloration bleue virant au jaune après distribution de la solution d'arrêt (acide sulfurique). L'intensité de la coloration (après lecture de la densité optique à 450 nm) qui en résulte est directement proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-*Map* présente dans l'échantillon à tester.

Le résultat est exprimé sous la forme d'un rapport S/P, qui est calculé en comparant la densité optique (DO) de l'échantillon à la densité optique moyenne du contrôle positif (DOM CP) à laquelle est soustraite celle du contrôle négatif (DO CN) selon la formule suivante :

$$S/P (\%) = \frac{DO \text{ échantillon} - DO \text{ CN}}{DOM \text{ CP} - DO \text{ CN}} \times 100$$

La différence entre les deux protocoles se situe notamment dans le choix de l'antigène de *Map* utilisé pour sensibiliser les plaques et le choix des seuils de positivité et de négativité (Tableau 13).

#### **2.4.3. Coproculture de mélange Trek para-JEM® Culture**

Le test réalisé par le laboratoire LABOCEA à Quimper (29) est une culture à partir de deux grammes de fèces avec une étape de décontamination adaptée du protocole de double décontamination proposé par Whitlock et Rosenberg (BHI, 0.9% HPC, mélange d'antibiotiques avec deux incubations de 18-24h à 35-37°C et deux centrifugations à 1700g de 20 et 30 minutes). Des mélanges de 10 échantillons pris au hasard ont été inoculés dans des flacons contenant un milieu liquide para-JEM®broth, deux suppléments de croissance (para-JEM® GS et para-JEM® EYS), un supplément antibiotique (para-JEM® AS) et un réactif colorimétrique (para-JEM® blue). Les flacons ont ensuite été incubés dans une armoire versa TREK ® à 37°C pendant 42 jours (Annexe 5).

La confirmation de la présence de *Map* dans le bouillon de culture a été réalisée par qPCR avec la trousse commerciale LSI MagVET Universal-LSI VetMax® Triplex M. Ce protocole utilise une sonde Taqman® marquée avec le fluorophore FAM ciblant la séquence cible *IS900*, et une sonde marquée avec le fluorophore VIC ciblant la séquence F57. La validation de l'extraction des acides nucléiques et de l'amplification se fait grâce à un contrôle interne exogène (IPC ou Internal Positive Control) avec une sonde marquée avec le fluorophore Cyanine-Red.

#### **2.4.4. Test interféron gamma (ID.vet)**

Nous avons utilisé un protocole développé par ID.vet (Annexe 4). La détection de la production d'interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ) par la technique ELISA sandwich est utilisée pour la mise en évidence de la réponse cellulaire à des agents pathogènes comme *Map* ou *Mycobacterium bovis*.

Le dosage de l'INF- $\gamma$  nécessite une étape d'activation cellulaire (principalement des lymphocytes T CD4) spécifiques d'un antigène de *Map* (e.x. PPD johnine, échantillon activé), un antigène de contrôle non spécifique (e.x. PPD avium) et un contrôle positif d'activation (mitogène). Les plaques sont ensuite centrifugées et le plasma prélevé est utilisé immédiatement pour mesurer la quantité d'IFN- $\gamma$  produite à l'aide de l'ELISA ID Screen® Ruminant IFN- $\gamma$ . En présence d'IFN- $\gamma$  dans l'échantillon, il apparaît une coloration bleue qui devient jaune après blocage. En l'absence d'IFN- $\gamma$  dans l'échantillon, il n'apparaît pas de coloration.

Pour chaque échantillon, le rapport S/P est calculé en fonction des valeurs moyennes de densité optique des contrôles positifs (DO<sub>CP</sub>) et des contrôles négatifs (DO<sub>CN</sub>), et de celle du contrôle non spécifique :

$$S/P (\%) = \frac{DO \text{ échantillon activé} - DO \text{ échantillon contrôle (ex PPD avium)}}{DO_{CP} - DO_{CN}} \times 100$$

Le seuil de positivité choisi est de S/P = 35 %.

### 3. RESULTATS

#### 3.1. Résultats obtenus au sein du troupeau où la paratuberculose est endémique

##### 3.1.1. Tests de détection directe de *Map* par qPCR et par coproculture de mélange

Parmi les 60 bovins de plus de 24 mois présents dans l'élevage, un seul animal n'a pas pu être testé ni par qPCR, ni par coproculture ; un second n'a pas été testé avec la PCR ADIAVET, à la suite d'une quantité insuffisante d'échantillon.

Le protocole de qPCR précédé d'une concentration des fèces par filtration a permis de détecter la présence de *Map* chez 11/58 animaux. Les deux autres protocoles de détection directe de *Map* détectent moins d'animaux excréteurs, mais à un niveau équivalent (Tableau 14).

Parmi les quatre animaux positifs avec la trousse TaqVet®, trois le sont aussi avec la trousse ADIAVET® (Annexe 7).

**Tableau 14. Synthèse des résultats de qPCR et de coproculture pour l'élevage D, où la paratuberculose est endémique**

Type de test	Culture de mélanges (n=10) + confirmation par qPCR	qPCR individuelle	
<b>Trousse commerciale</b>	Trek ParaJEM® culture + PCR LSI MagVET®	TaqVet®	ADIAVET avec ADIAFILTER®
<b>Nombre de résultats positifs</b>	4 mélanges/6	4/59	11/58

NC non communiqué

Un mélange détecté positif en coproculture ne contient que des animaux ayant des résultats négatifs en PCR ADIAVET® et TaqVet® (Annexe 3), alors que les autres mélanges contiennent au moins un animal détecté avec les autres qPCR.

##### 3.1.2. Tests sérologiques par ELISA

Les deux trousse commerciales ELISA (Tableau 15) ont donné des résultats très similaires. Selon les lots de production testés, entre quatre et cinq animaux sont considérés positifs. Les quatre lots de production utilisés ont tous détecté les mêmes quatre animaux ;



cependant un animal supplémentaire a été détecté positif par le lot 602 ID Screen®, et un autre par le lot 3031 IDEXX® (Annexe 7). L'accord entre les deux troussees commerciales peut être considéré comme bon ( $k = 0,78$ ).

Dans ce troupeau, aucun résultat n'a été obtenu dans la catégorie « douteux ».

Parmi les quatre animaux détectés positifs par tous les tests, trois sont également positifs en qPCR et en culture (le quatrième n'a pas pu être testé par aucune des deux techniques) (Annexe 7).

**Tableau 15. Synthèse des résultats de l'ELISA, du test IFN- $\gamma$  pour l'élevage D, où la paratuberculose est endémique**

Type de test	ELISA				INF- $\gamma$
	IDEXX®		ID Screen®		ID Screen® Ruminant IFN- $\gamma$
Trousse commerciale	lot 3031	lot 3283	lot 602	lot 445	NC
<b>Lot de production</b>	<b>lot 3031</b>	<b>lot 3283</b>	<b>lot 602</b>	<b>lot 445</b>	<b>NC</b>
<b>n = 60</b>	4	5	5	4	2

NC : non communiqué

Ainsi, au sein d'un troupeau avec une prévalence apparente estimée à 16,6 %, la sensibilité et la spécificité des deux troussees commerciales ELISA utilisées, en considérant les résultats de la qPCR avec concentration comme test de référence, sont globalement équivalentes. Les valeurs calculées sont  $Se = 30\%$  et  $Sp = 98\%$ .

### 3.1.3. Test IFN- $\gamma$

Le test interféron développé par ID.vet, a détecté deux animaux positifs seulement (Tableau 15). Un de ces animaux est également positif en sérologie ELISA avec les quatre lots testés. L'autre est uniquement positif au test IFN- $\gamma$ . Les deux animaux positifs au test IFN- $\gamma$  sont négatifs en coproculture et en qPCR (Annexe7).

Les caractéristiques estimées, malgré l'effectif faible, du test IFN $\gamma$  sont  $Se = 10\%$  et  $Sp = 98\%$ , si on considère la qPCR comme test de référence et  $Se = 25\%$  et  $Sp = 98\%$  en prenant la coproculture comme test de référence.

### **3.2. Résultats obtenus dans les troupeaux A et B supposés indemnes durant la première période (1er semestre 2013)**

#### **3.2.1. Concordance entre les résultats obtenus avec la trousse commerciale IDEXX® en 2013**

Les analyses faites par le LDA09 de Janvier à Mars 2013, et celles faites en Avril 2013 par ID.vet au sein des élevages A et B supposés indemnes, sont regroupées dans le Tableau 16.

Les tests ELISA IDEXX® réalisés en Janvier 2013 détectent cinq animaux positifs (ou résultat positif dans la zone d'incertitude autour du seuil de positivité). Ces résultats sont cohérents avec les résultats obtenus avec le même test IDEXX® et réalisé sur les mêmes animaux en Février/Mars 2013.

Les deux animaux ayant conduit à l'obtention d'un résultat douteux en Janvier 2013 sont classés négatifs en Février/Mars 2013.

Par ailleurs, quatre animaux classés négatifs en Février 2013 mais dont les résultats sont dans la zone d'incertitude autour du seuil de positivité, ont été considérés comme positifs (pour trois animaux), et douteux (pour un animal), quelques semaines plus tard.

#### **3.2.2. Concordance entre les résultats obtenus avec les trousse commerciales IDEXX® et ID Screen® en 2013**

Lors des tests réalisés en Avril 2013 avec la trousse commerciale ID Screen® sur les animaux ayant des résultats non-négatifs avec la trousse IDEXX®, on observe plusieurs discordances. En effet, sur les huit animaux testés positifs avec la trousse IDEXX® (c'est-à-dire qui ont donné au moins un test positif sur la période Janvier-Mars 2013), seulement deux de ces animaux ont un résultat positif (au moins un lot positif sur les quatre lots testés) avec la trousse ID Screen® (Tableau 16).

Tous les résultats des qPCR faites en Mars 2013 par le LDA sont négatifs sur les animaux ayant un test sérologique non-négatif.

**Tableau 16. Résultats des analyses qPCR, test IFN- $\gamma$  et sérologies non-négatives de Janvier à Avril 2013 au sein des troupeaux A et B supposés indemnes**

Laboratoire	LDA 09 ARIEGE				ID.vet				
	ELISA IDEXX®			PCR	ELISA ID Screen®			IFN- $\gamma$	
Lot de production	Lot NC	Lot NC	Lot NC		Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot NC
Dates prélèvements	Janvier 2014		Février 2013	Mars 2013	Avril 2013				
<b>ELEVAGE A</b>	N° de travail								
	1674	POS	POS	Neg	POS	DTX	Neg	Neg	DTX
	3678	POS#	POS#	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	9508	POS#	POS	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	3173	DTX#	Neg						
Dates prélèvements	Février 2013		Mars 2013	Mars 2013	Avril 2013				
<b>ELEVAGE B</b>									
	0746	POS	POS	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	0807	POS	POS	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	9170	DTX #	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	0760	Neg #	POS		POS	Neg	Neg	Neg	Neg
	5482	Neg #	DTX		Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	0738	Neg #	POS		Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	0872	Neg #	POS		Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

# : Résultat dans la zone d'incertitude autour du seuil de positivité ; Neg : négatif ; POS : positif ; DTX : douteux ; NC : non communiqué

### 3.3. Résultats au sein des troupeaux supposés indemnes de paratuberculose lors des tests de Janvier 2014

#### 3.3.1. Tests de détection directe de *Map* par qPCR et coproculture de mélange

Tous les résultats de la coproculture en milieu para-JEM®, ainsi que les résultats des deux troussees commerciales de qPCR en temps réel pour les troupeaux A, B et C sont négatifs (six résultats au seuil de positivité en PCR TaqVet® ont été testés une seconde fois et sont négatifs).

#### 3.3.2. Test IFN- $\gamma$

Les résultats du test IFN- $\gamma$  développé par ID.vet sont négatifs, excepté pour un animal qui est classé comme douteux, car la valeur obtenu est légèrement au-dessus du seuil de positivité (S/P = 41%). Cependant les résultats de qPCR, de coproculture et de sérologie de cet animal sont négatifs.

### 3.3.3. Tests sérologiques par ELISA

#### 3.3.3.1. *Concordance des résultats entre les trousse commerciales*

Les résultats obtenus avec la trousse commerciale IDEXX® sont non-négatifs pour 13 ou 14 sérums en fonction du lot utilisé, ce qui est significativement différent ( $p < 0,05$ ) des résultats de la trousse ID Screen® qui détecte deux résultats non-négatifs. Un seul animal est positif avec les quatre lots de trousse ELISA testés (Tableau 17). Le coefficient kappa de concordance entre les trousse ELISA est très faible avec une valeur  $k = 0,18$ .

**Tableau 17. Synthèse des résultats non-négatifs obtenus avec les différents lots des trousse ELISA sur les prélèvements de janvier 2014**

Trousse commerciale et lots de production		IDEXX®		ID Screen®	
		lot 3031	lot 3283	lot 602	lot 445
Elevages	Effectif				
A	158	4	6	1	2
B	158	5	4	0	0
C	59	4	4	1	0
<b>Total</b>	<b>375</b>	13	14	2	2

En considérant les résultats des 750 analyses la spécificité pour la trousse ID Screen® est évaluée à 99,5%, et à 96,5% pour la trousse IDEXX®. Si on considère les résultats permettant de classer les animaux non négatifs (i.e au moins un résultat non-négatif sur les deux lots de production) on obtient une spécificité de 95,4% pour la trousse IDEXX, et 99,2% pour la trousse IDScreen.

#### 3.3.3.2. *Concordance entre les lots de production d'une même trousse commerciale*

On observe une différence entre les différents lots d'une même trousse commerciale. Pour la trousse IDEXX®, la variation de résultats entre les deux lots (positif/douteux ; douteux/négatif ; positif/négatif) concerne 11/18 (61%) prélèvements avec au moins un résultat non-négatif sur un des lots (Tableaux 18 et 19).

Pour le test ID Screen®, parmi les trois prélèvements positifs, un seul est positif avec les deux lots (Tableaux 18 et 19).

Malgré ces discordances, le coefficient d'accord kappa est considéré comme moyen entre les lots IDEXX® ( $k = 0,68$ ) et entre les lots ID Screen® ( $k = 0,78$ ). Cependant ces valeurs sont à interpréter avec prudence du fait du faible effectif étudié.

**Tableau 18. Résultats sérologiques non-négatifs sur la période de Janvier 2013 à Janvier 2014 au sein du troupeau supposé indemne A**

Laboratoire	LDA 09		ID.vet				LDA 09		ID.vet			
	IDEXX®		ID Screen®				IDEXX®		ID Sreen® (S/P %)		IDEXX® (S/P%)	
Lot de production	Lot NC		Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot NC	Lot 602 (lot actuel)	Lot 445 (ancien lot)	Lot 3031 (lot actuel)	Lot 3283 (lot actuel)	
Date de prélèvement	Janvier 2013	Février 2013	Avril 2013				Janvier 2014		Janvier 2014			
N° de travail												
3423	Neg							Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
1674	POS	POS	POS	DTX	Neg	Neg	DTX	Neg#	Neg	Neg	POS (63)	POS (107)
8848	Neg							Neg	Neg	Neg	Neg	DTX (50)
8803	Neg							POS	POS (187)	POS (76)	POS (106)	POS (79)
6718	Neg							Neg	Neg	Neg	Neg	POS (57)
4033	Neg							DTX	Neg#	Neg	Neg	POS (68)
3678	POS#	POS#	Neg	Neg	Neg	Neg	DTX	Neg#	Neg	Neg	DTX (53)	Neg
4809	Neg							Neg	Neg	Neg	DTX (49)	Neg
0107	Neg							Neg	Neg	POS (101)	Neg	Neg
2613	Neg							Neg	Neg	Neg	Neg	DTX (54)
9508	POS#	POS	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg					
3173	DTX#	Neg						Neg				
2435	Neg							DTX	Neg#	Neg	Neg	Neg
3633	Neg							DTX	Neg#	Neg	Neg	Neg
9175	Neg							DTX	Neg#			

# : Résultat dans la zone d'incertitude autour du seuil de positivité ; Neg : négatif ; POS : positif ; DTX : douteux ; NC : non communiqué, S/P (%) : pourcentage de densité optique calculé pour l'échantillon

Tableau 19. Résultats sérologiques non négatifs sur la période de Janvier 2013 à Janvier 2014 au sein des troupeaux supposés indemnes B et C

Laboratoire	LDA 09		ID.vet				LDA 09		ID.vet			
Trousse commerciale	IDEXX®		ID Screen®				IDEXX®	ID Sreen® (S/P %)		IDEXX® (S/P%)		
Lot de production	Lot NC		Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	lot NC	Lot 602 (lot actuel)	Lot 445 (ancien lot)	Lot 3031 (lot actuel)	Lot 3283 (lot actuel)	
<b>ELEVAGE B</b>												
Date de prélèvement N° de travail	Février 2013		Mars 2013		Avril 2013			Janvier 2014		Janvier 2014		
3049	Neg							Neg#	Neg	Neg	POS (97)	POS (77)
0746	POS		POS		Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	POS (106)	POS (68)
0867	Neg							Neg	Neg	Neg	Neg	POS (68)
0807	POS		POS		Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	DTX (47)	Neg
0869	Neg							Neg	Neg	Neg	DTX (49)	Neg
2195	Neg							Neg#	Neg	Neg	POS (97)	POS (71)
9170	DTX #		Neg		Neg	Neg	Neg	Neg				
0760	Neg #	POS		POS	Neg	Neg	Neg	Neg				
5482	Neg #	DTX		Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
0738	Neg #	POS		Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
0872	Neg #	POS		Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
<b>ELEVAGE C</b>												
Date de prélèvement N° de travail	Janvier 2013						Janvier 2014					
4419	POS							Neg	Neg	POS (105)	DTX (66)	
2532	Neg							POS (90)	Neg	DTX (54)	DTX (49)	
4392	POS							Neg	Neg	POS (110)	POS (101)	
4382	POS							Neg	Neg	POS (76)	DTX (52)	

# : Résultat dans la zone d'incertitude autour du seuil de positivité ; Neg : négatif ; POS : positif ; DTX : douteux ; NC : non communiqué, S/P (%) : pourcentage de densité optique calculé pour l'échantillon

### 3.4. Evolution des résultats (Janvier 2013 – Janvier 2014) au sein des troupeaux supposés indemnes

Lors de la série d'analyses réalisée en 2014 par le LDA09, au sein des troupeaux A et B, le statut sérologique a été évalué à l'aide de la trousse commerciale IDEXX seulement. Un seul animal est détecté positif, et six animaux sont considérés comme douteux et ont été classés comme négatifs; ils sont cependant dans la zone d'incertitude du test, après un second dépistage (Tableau 18 et 19).

En comparant les résultats obtenus par le LDA 09 en 2013 et en 2014, et dans notre étude en Janvier 2014, on remarque que les résultats sérologiques sont extrêmement variables.

Par exemple, avec la trousse commerciale IDEXX® : parmi les sept animaux ayant un résultat non-négatif en Janvier 2013 (LDA 09), aucun n'est détecté positif lors du prélèvement réalisé l'année suivante (Janvier 2014, LDA 09) et seuls deux animaux sont positifs avec la trousse IDEXX sur la même période de Janvier 2014.

Seul un animal (N°8803, élevage B) qui avait été détecté négatif avec la trousse IDEXX® en Janvier 2013 est considéré comme positif avec les quatre tests (trousses et lots) ELISA en Janvier 2014.

### 3.5. Résultats quantitatifs obtenus en ELISA dans les quatre troupeaux en Janvier 2014

Au sein du troupeau positif, les moyennes des rapports S/P des animaux positifs sont significativement différentes de celle des animaux négatifs, quelle que soit la trousse commerciale utilisée.

**Tableau 20. Moyenne des rapports S/P au sein des quatre troupeaux en fonction de la trousse commerciale et du lot de production des trousses ELISA**

Trousse commerciale Lots de production	IDEXX®			ID Screen®		
	3031	3283	Deux lots	602	445	Deux lots
<b>Troupeau D</b>						
Positif	232	167	195	234	262	246
Négatif	7	8	7	17	21	19
<b>Troupeaux A, B et C</b>						
Positif	95	76	85	139	89	114
Douteux	50	51	51	/	/	/
Non négatif	78	69	73	139	89	114
Négatif	9	9	9	14	12	13



## **4. DISCUSSION**

### **4.1. Recrutement des élevages et des animaux pour l'évaluation des troupes sérologiques**

Les effectifs utilisés dans cette étude sont assez faibles : 60 animaux issus d'un troupeau où la paratuberculose est endémique, et 375 animaux issus de trois troupeaux supposés indemnes de paratuberculose. Aussi les caractéristiques des troupes sont probablement définies de façon assez peu précise, et les valeurs obtenues appartiennent à des intervalles de confiance relativement grands, ne permettant pas de conclure de façon certaine à des différences significatives entre les troupes.

L'âge des animaux prélevés a été fixé de façon à se rapprocher le plus possible des protocoles standards de détection de la paratuberculose habituellement utilisés dans les élevages. Le protocole tient compte des connaissances sur la physiopathologie de la maladie, à savoir une séroconversion (mise en évidence par la technique ELISA dans cette étude) très tardive et rarement observée avant l'âge de 18-24 mois, ainsi qu'une excrétion tardive (recherchée par qPCR ou coproculture individuelles)(Nielsen et Toft, 2008).

Le test IFN- $\gamma$  est habituellement recommandé pour les animaux les plus réceptifs à *Map*, c'est-à-dire jusqu'à l'âge de six mois. Cependant, certains auteurs considèrent que l'IFN- $\gamma$  pourrait être un bon marqueur de l'exposition à *Map* (Mikkelsen *et al.*, 2012), et répond ainsi à un des objectifs que nous nous étions fixés, à savoir, déterminer si les animaux avaient été exposés à *Map* concomitamment à l'apparition des résultats sérologiques non-négatifs dans les élevages.

### **4.2. Formulation d'hypothèses à partir des réponses au questionnaire**

L'obtention des résultats sérologiques non-négatifs débute en 2013 pour l'élevage A et en 2010 pour l'élevage B, alors que les animaux de ces troupeaux sont inscrits au Herd-Book Limousin depuis les années 1990 et contrôlés régulièrement négatifs en sérologie.

Le principal facteur de risque que nous avons identifié pour l'introduction de la paratuberculose, au sein de ces élevages est l'achat d'un animal infecté.

Ce risque est faible au sein de l'élevage A puisqu'il utilise majoritairement l'auto-renouvellement des femelles. Seuls quelques taureaux issus de troupeaux également inscrits au HBL et testés négatifs en sérologie lors de la période de quarantaine avant introduction ont été introduits. Ainsi, le risque n'est pas totalement nul, mais il peut être considéré comme faible à très faible.

Dans l'élevage B, entre 2006 et fin 2012, 12 génisses de renouvellement et un taureau issus de troupeaux inscrits au Herd-Book ont été achetés, ainsi que sept nourrices Montbéliarde. A l'introduction, tous les animaux ont fait l'objet d'une analyse sérologique.

Aucun des animaux introduit dans les deux élevages n'avait un résultat sérologique positif, deux animaux achetés de l'élevage A ont été détecté douteux en IDEXX en Janvier 2014 par le LDA mais sont négatifs sur tous les autres tests durant la période de notre étude. Cependant, la valeur informative de l'ELISA reste faible pour les jeunes animaux. Il serait donc plus approprié de procéder à un dépistage par qPCR avant introduction des génisses.

Ainsi, le risque d'introduction de la maladie par l'achat d'animaux infectés même s'il n'est pas nul, peut être considéré comme moyen à faible au sein de ces deux élevages.

### **4.3. Méthodes directes de détection *Map***

Au sein du troupeau où la paratuberculose est endémique, le protocole utilisant la qPCR avec concentration préalable des échantillons de fèces détecte presque trois fois plus d'animaux excréteurs que la coproculture ou le protocole qPCR avec une technique classique d'extraction de l'ADN. Ainsi, l'utilisation d'une étape de concentration augmente très significativement la détection et permet à ce protocole d'être parmi les plus sensibles, voire le plus sensible parmi ceux commercialisés. Il aurait été intéressant de faire une gamme de dilution afin d'évaluer la quantité minimale de *Map* détectée au sein des échantillons et la comparer au seuil de détectabilité fournie par le fabricant (30 équivalents génomes à partir de 10g de fèces environ).

Au sein des trois troupeaux supposés indemnes de paratuberculose, toutes les techniques directes de recherche directe de *Map* se sont révélées négatives. Même la plus

sensible d'entre elles qui est la qPCR avec concentration préalable des échantillons n'a pas permis de détecter un seul animal positif.

#### **4.3.1. Risque de résultats faussement négatifs/positifs sur fèces**

La possibilité de résultats faussement négatifs pour les tests de recherche directe de *Map* a souvent été attribuée à une excrétion intermittente de *Map*, et absente au moment du prélèvement, chez des animaux à un stade subclinique peu avancé, voire au stade clinique bien que cela se produise plus rarement. Or dans les troupeaux supposés indemnes que nous avons étudiés, aucun cas de paratuberculose clinique n'a été détecté, ni rapporté par les éleveurs ou le vétérinaire sanitaire. De plus, tous les animaux avec des résultats de sérologie discordants en 2013 sont négatifs avec la qPCR en 2013 et en 2014.

Des résultats faussement négatifs peuvent également être dus à une mauvaise homogénéisation du prélèvement avant préparation des parties aliquotes. Dans cette étude, nous avons essayé de réduire au maximum cette possibilité en homogénéisant systématiquement les prélèvements dans le gant de fouille avant la distribution dans les différents pots de prélèvement.

Par ailleurs, dans le troupeau où la paratuberculose est endémique, un mélange de fèces est détecté positif par la culture, alors que ce groupe ne contient aucun animal positif en qPCR individuelle. Ce résultat est surprenant et pourrait être lié à une contamination exogène au moment de la manipulation des échantillons ou à un résultat de confirmation de la culture faussement positif.

#### **4.3.2. Comparaison des protocoles utilisant la qPCR**

##### ***4.3.2.1. Concentration de l'échantillon***

De multiples protocoles de qPCR sont actuellement disponibles ; nous avons choisi de comparer deux protocoles pour lesquels la préparation de l'échantillon est très différente, mais qui utilisent la même technique d'amplification (la même cible ADN, IS900, et la même technique de détection de l'amplification permise par une ou des sondes d'hydrolyse).

Le protocole ADIAVET® associé au système de filtration ADIAFILTER® détecte trois fois plus d'animaux excréteurs que le test TaqVet®. Cela peut s'expliquer par l'utilisation d'une plus grande quantité de fèces (échantillon de six grammes pour le protocole ADIAVET contre seulement trois grammes pour le protocole TaqVet®) et par l'étape de centri-filtration de la matrice qui permet de limiter la présence de matières organiques potentiellement inhibitrices lors de l'étape d'amplification et de la concentration plus grande de la fraction de l'échantillon à analyser. Cette sensibilité de détection peut être encore augmentée car le seuil de détectabilité estimé par le fournisseur est de 1 à 2 *Map*/g de fèces pour le protocole utilisant ADIAFILTER® et une quantité de fèces de 10 grammes. Sans la maximiser mais en respectant le protocole le plus couramment utilisé dans les laboratoires d'analyses vétérinaires, la sensibilité de la technique qPCR a été optimisée par l'utilisation d'une quantité relativement grande d'échantillon, et par une étape de concentration de l'échantillon avant extraction de l'ADN bactérien.

#### **4.3.2.2. Extraction de l'ADN**

Il existe actuellement beaucoup de protocoles d'extraction différents, couplés à des protocoles d'amplification variables. Leite (2013) estime qu'une lyse mécanique est préférable sur les échantillons de fèces, mais que la phase de purification de l'ADN des deux tests les plus sensibles qu'il a testés utilisait soit un protocole avec des billes magnétiques, soit des membranes de silice, comme cela a été réalisé dans notre étude.

#### **4.3.2.3. PCR quantitative (qPCR)**

##### Amplification

Les deux protocoles choisis utilisent comme séquence cible *IS900*. L'utilisation de cette séquence permet une plus grande sensibilité de détection puisqu'elle est présente à hauteur de 12 à 18 copies dans le génome de *Map* (*V. Der Griesen*, 1992).

Le protocole qPCR utilisé pour la confirmation de la coproculture détecte en plus la séquence *F57* (qui est présente à l'état d'une seule copie dans le génome de *Map*). Elle est cependant plus spécifique de *Map* et donc plus appropriée pour la confirmation de la présence de la mycobactérie dans un échantillon (*Bosshard et al.*, 2006).

L'absence d'inhibition de l'amplification est vérifiée dans les troussees commerciales que nous avons utilisées grâce à des contrôles positifs d'amplification. Cela a permis de vérifier l'absence d'effet inhibiteur sur la réaction de PCR en incluant systématiquement dans tous les échantillons, un contrôle externe de l'extraction et de l'amplification.

#### Choix du seuil de détection (pour fixer la valeur de Ct)

Le Ct (Cycle Threshold) correspond au nombre de cycles à partir duquel on considère que la fluorescence est significativement plus élevée que le bruit de fond. Le seuil de positivité choisi pour le protocole ADIAVET® est de 38 cycles alors qu'il est de 40 cycles pour le protocole TaqVet®. Une diminution du seuil Ct est associée à une détection plus précoce des ADN amplifiés et augmente donc la sensibilité du test. En ce qui concerne la qPCR TaqVet®, six échantillons ont été détectés au seuil de Ct de 40, mais ils ont donné des résultats négatifs lorsqu'ils ont été testés une seconde fois avec le même protocole. Cela peut être dû à des réactions non spécifiques au-delà d'un certain nombre de cycles (n=38 cycles environ) conduisant à un résultat non répétable et très probablement non spécifique au-delà d'un certain nombre de cycles d'amplification.

Par ailleurs, une étude récente (non publiée) utilisant le même protocole qPCR avec concentration de l'échantillon détecte 10 mycobactéries (à partir d'ADN purifié) après seulement 35 cycles. Il apparaît alors qu'un seuil de Ct placé à 38 ou 40 cycles est élevé, voire très élevé et ne correspond pas à une réalité biologique. Nous avons choisi de ne pas faire de gamme de dilution puisque le but était d'avoir un résultat dichotomique (négatif/positif). Au vue de ces derniers résultats, il aurait été intéressant d'avoir des données quantitatives sur l'excrétion de *Map* dans l'élevage où la paratuberculose est endémique par l'utilisation du protocole PCR avec concentration d'échantillon, afin de mieux définir le seuil de détection à partir duquel l'animal peut être considéré comme excréteur.

#### **4.3.3. Evaluation des échantillons en mélange**

Dans notre étude, le protocole qPCR avec concentration de l'échantillon détecte significativement plus d'animaux que la coproculture. Cela peut s'expliquer par, le fait que seules les mycobactéries vivantes et cultivables (contrairement à la qPCR) sont détectées par

la culture, et qu'une inhibition de la croissance de *Map* est toujours possible. Le protocole utilisé permet de limiter l'inhibition de la croissance de *Map* par les antibiotiques (incubation avec des antibiotiques durant 18 à 24 heures seulement) et utilise une aliquote de 500µl (Reddacliff, 2003). Par ailleurs, ce protocole de décontamination utilisé pour la coproculture para-JEM® et développé par Stabel *et al.* en 1997, est décrit comme le plus sensible (Ristow et Silva, 2006).

De plus, il a été montré que l'effet dilution avait probablement peu d'impact sur la sensibilité des coprocultures en mélange de 10 dans des troupeaux où la prévalence est faible (Tavornpanich *et al.*, 2004).

Inversement on peut se demander si les résultats positifs avec la qPCR ADIAVET® ne sont pas dus à un défaut de spécificité. Cela paraît peu probable étant donné que l'ADN cible et l'utilisation de sondes d'hydrolyse rend la méthode très spécifique (Poitras et Houde, 2002).

Au vu des résultats négatifs obtenus par la recherche directe de *Map*, et en écartant la possibilité de résultats faussement négatifs étant donné les conditions d'utilisation des tests, on peut considérer qu'il n'y a pas d'animaux excréteurs au sein des troupeaux évalués.

#### **4.3.4. Choix d'un test de référence**

La coproculture associée à une confirmation par qPCR est souvent considérée comme le test de référence pour la détection de la paratuberculose. La coproculture est capable de détecter des animaux à un stade avancé de la maladie (excréteurs), mais identifie un plus faible nombre d'animaux à la phase sub-clinique de la maladie (Nielsen et Toft, 2008). La sensibilité de la coproculture est donc estimée à 70% pour les animaux affectés (en phase clinique), et à seulement 23-29% pour les animaux infectés. Ainsi, malgré les améliorations techniques des milieux de croissance, l'automatisation de la détection de la croissance de *Map* qui permet de réduire la durée de culture, la coproculture n'est pas le test optimal dans un contexte de faible prévalence ou pour la détection des animaux à la phase subclinique de la maladie.

Actuellement l'utilisation de la PCR quantitative comme test de référence est de plus en plus plébiscitée, avec notamment la possibilité de différencier en plus, les mycobactéries vivantes et mortes (Klanicova, 2014).

Par ailleurs beaucoup d'études comparent cette méthode de recherche directe de *Map* à des méthodes de recherche indirectes de *Map* ce qui est critiquable car ces méthodes évaluent des aspects différents de la maladie.

Dans tous les cas, un consensus sur le choix d'un test de référence universellement reconnu n'est pas encore atteint. Dernièrement, des études utilisent une analyse bayésienne qui permet de s'affranchir du test de référence afin d'estimer les caractéristiques des tests utilisés (Collins *et al.*, 2005).

En considérant la coproculture comme test de référence, on obtient une prévalence de 6,6% dans le troupeau positif alors qu'avec la qPCR comme test de référence, on obtient une prévalence de 16,6%, ce qui est très différent et à des conséquences sur la gestion ultérieure du troupeau.

#### **4.4. Méthodes de recherche indirecte de l'infection par *Map***

##### **4.4.1. Test interféron**

Dans cette étude, le test IFN- $\gamma$  détecte seulement deux animaux positifs dans l'élevage où la paratuberculose est endémique. Un des deux animaux n'est cependant considéré ni comme excréteur, ni comme positif par la sérologie. Cela s'explique soit par un résultat du test IFN- $\gamma$  faussement positif, soit par un animal qui est au début de l'évolution de l'infection à un moment où seule la réponse à médiation cellulaire est détectable. Cette dernière hypothèse est peu vraisemblable étant donné que l'animal en question était âgé de 10 ans au moment du prélèvement et que l'on considère que les animaux adultes sont beaucoup moins réceptifs à l'infection par *Map* (dans un troupeau sans super-excréteur) (Nielsen et Toft, 2008). Une confirmation pourra être faite en testant cet animal une nouvelle fois pour définir si une conversion sérologique est apparue.

Au sein du troupeau où la paratuberculose est endémique, le test IFN- $\gamma$  sur des animaux de plus de 24 mois a une sensibilité bien plus faible (Se = 10 %, Sp = 98 %) que celle précédemment déterminée par Huda (Se = 80% pour les animaux de plus de 24 mois, Sp = 94%). Cela peut être dû au test de référence utilisé qui est la coproculture dans l'étude de Huda *et al.* (2003). Ainsi, dans notre étude, si on détermine les caractéristiques du test IFN- $\gamma$

en prenant la coproculture comme test de référence on obtient une Se = 25% et une Sp= 98%. Cela reste bien inférieur à ce qui est décrit dans les autres études.

L'ensemble des résultats IFN- $\gamma$  étant négatif au sein des troupeaux A et B supposés indemnes (test non réalisé sur le troupeau C), cela indique que les animaux testés n'ont pas été en contact avec *Map*, puisque le test IFN- $\gamma$  est un marqueur de l'exposition des animaux à *Map* (Jungersen *et al.* 2002).

La présence d'animaux faussement négatifs est peu probable puisque les conditions d'analyse étaient optimales pour permettre une réponse à la stimulation antigénique suffisante et spécifique (les échantillons ayant été traités dans les 10 heures après le prélèvement, transportés à une température comprise entre 16 et 22°C), puis des contrôles de la spécificité de la réaction (PPD avium), et de l'activation ont été inclus. Ainsi la spécificité de ce test est probablement très élevée et proche de 100%, ce qui est cohérent avec les indications fournies et nos observations au sein de troupeaux supposés indemnes.

La méthode de détection de la réponse immunitaire à médiation cellulaire a fait ses preuves pour le diagnostic de la tuberculose bovine lors des campagnes d'éradication. Elle reste cependant une technique expérimentale pour la paratuberculose. Même si un résultat positif ne permet pas de prédire une séroconversion ou une évolution future de la maladie (Mikkelsen *et al.*, 2012), un cas positif sera tout de même un marqueur d'exposition de l'animal à *Map* et un révélateur de la présence du bacille dans l'environnement des animaux (Jungersen, 2002 ; Mikkelsen *et al.* 2012).

#### **4.4.2. Tests sérologiques**

Au sein du troupeau où la paratuberculose est endémique, les tests ELISA des deux trousse commerciales utilisées ont un niveau de détection des animaux positifs (4/60) équivalent à ceux de la coproculture et de la qPCR sans concentration préalable de l'échantillon, soit 4/59 et 4/58 respectivement. Ainsi, la sensibilité et la spécificité estimées (malgré un effectif faible) des deux trousse commerciales ELISA utilisées au sein du troupeau infecté, et en considérant le protocole qPCR avec concentration de l'échantillon



comme test de référence, sont équivalentes :  $Se = 30\%$  et  $Sp = 98\%$ . Cela correspond aux résultats présentés par d'autres auteurs (Wells *et al.*, 2006, Clark *et al.*, 2008).

Dans les troupeaux supposés indemnes de paratuberculose, les trousse ELISA IDEXX® et ID Screen® ont détectés respectivement 14 et 2 animaux positifs (i.e positifs sur au moins un des deux lots de la trousse commerciale) pour la série de tests réalisée en Janvier 2014.

Compte tenu qu'il n'y a pas d'animaux excréteurs au sein des élevages A, B et C, de la physiopathologie de la paratuberculose (un animal excrète généralement *Map* avant la séroconversion) ainsi que l'obtention de résultats négatifs au test IFN- $\gamma$  (marqueur de l'exposition à *Map*), on peut considérer que les résultats sérologiques non-négatifs sont dus à un défaut de spécificité des tests et non à la séroconversion des animaux vis-à-vis de *Map*, l'agent de la paratuberculose.

Nous avons évalué la spécificité de la trousse ID Screen® à 99,2% pour et celle de la trousse IDEXX® à 96,5% ce qui est inférieur aux valeurs présentés par le fabricant ( $Sp = 99,2\%$  à partir de 717 animaux ayant une coproculture négative ou issus d'un troupeau qualifié « indemne » sans plus de précision, données de validation du test IDEXX® Paratuberculosis Screening Ab Test, 2011). Nos valeurs sont probablement approximatives du fait de l'utilisation d'un effectif faible (qui n'est toutefois que moitié plus faible que celui utilisé par ce fabricant pour qualifier la trousse).

Cependant, ce défaut de spécificité des ELISA dans des troupeaux est connu, mais n'a été investigué que rarement. Idéalement, l'estimation de la spécificité doit se faire sur un nombre suffisant d'animaux dont on sait qu'ils sont à priori indemnes de paratuberculose. Ainsi, nos résultats sont cohérents et très proches de ceux rapportés par Wells et Collins en 2006 (analyse réalisée sur 347 vaches, au moins primipares issues de troupeaux indemnes : ELISA IDEXX  $Sp = 95,3\%$ ).

#### ***4.4.2.1. Déficit de spécificité des tests sérologiques***

##### Élimination des réactions croisées avec d'autres bactéries

Les protocoles des deux trousse ELISA utilisées dans notre étude incluent une étape de pré-adsorption sur *M. phlei*, ce qui permet d'augmenter la spécificité du test en éliminant les réactions croisées avec d'autres mycobactéries que *Map* présentes dans l'environnement d'élevage. Ainsi, la probabilité d'avoir des résultats faussement positifs suite à des réactions croisées dues à une exposition des animaux à d'autres mycobactéries que *Map* paraît peu probable. Il faut donc rechercher ailleurs les raisons de ces réactions faussement positives.

##### Réactions sérologiques atypiques

Les cas positifs détectés par la sérologie peuvent aussi être dus à d'autres réactions atypiques. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces réactions.

Premièrement, la présence d'épisodes infectieux bactériens ou viraux pourrait provoquer une augmentation du taux d'anticorps et engendrer des réactions croisées de manière transitoire interférant avec l'analyse sérologique. Dans cette étude, nous ne disposons pas d'informations suffisantes sur d'éventuels épisodes infectieux au moment des différentes périodes de prélèvement au sein des trois troupeaux supposés indemnes pour établir une relation de ce type.

Deuxièmement, une phase très précoce de la maladie, où le taux des anticorps encore très bas, peut se traduire par une réponse sérologique variable et inconstante. Cependant, les animaux ayant séroconverti ou en voie de séroconversion voient le plus souvent le titre d'anticorps croître au cours du temps. Un seul animal a des résultats qui correspondent à cette évolution, c'est-à-dire ayant un résultat IDEXX négatif en Janvier 2013 puis positif sur tous les lots en Janvier 2014. Cependant, tous les échantillons sont négatifs avec la qPCR (en Janvier 2013 et 2014). Ainsi on peut raisonnablement exclure le fait qu'il s'agisse d'un animal infecté, (l'excrétion étant le plus souvent antérieure à la séroconversion) étant donné que l'intervalle entre les prélèvements est de presque 10 mois, et qu'il n'a jamais manifesté de signes cliniques évocateurs de la paratuberculose. De plus, des résultats faussement négatifs à tous les tests de détection de l'excrétion est peu probable.

Il est recommandé de répéter les tests sérologiques à intervalles réguliers pour confirmer le statut d'un animal (Nielsen et Toft, 2008), puisque la production d'anticorps est croissante parallèlement à l'évolution de la maladie. Cependant, bien que nous ayons testé les animaux de manière répétée pendant plus d'une année, nous n'avons pas observé de résultats sérologiques cohérents entre les trousse commerciales et pour une même trousse commerciale, qui permettent de conclure à une possible séroconversion.

#### ***4.4.2.2. Discordance entre les ELISA***

En plus du défaut de spécificité des ELISA, on observe une différence de résultats entre les trousse commerciales et entre les lots de production d'une même trousse commerciale. En effet, au sein des troupeaux indemnes de paratuberculose, le coefficient d'accord kappa est faible (0.18) entre la trousse IDEXX® et la trousse ID Screen® (dichotomie : négatif ; non-négatif pour au moins un des deux lots utilisés au sein de chaque trousse commerciale). Ces défauts de concordance ont été objectivés dans d'autres études, à la fois au sein de troupeaux ayant un historique de paratuberculose (Dieguez *et al.* 2009, Mc Kenna *et al.*, 2006) et au sein de troupeaux indemnes (Collins *et al.*, 2005).

Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces variations entre les trousse commerciales :

##### Choix de l'antigène

Cette différence entre les trousse commerciales est due aux caractéristiques intrinsèques des protocoles, comme le type d'antigène utilisé pour sensibiliser les microplaques. Il existe actuellement une multitude d'antigènes différents utilisés pour préparer les ELISA (extraits purifiés, recombinants...) et de nature différente (antigène sécrété, membranaire, pariétal, lipoprotéiques) (Mikkelsen, 2011). Les deux ELISA utilisés dans notre étude utilisent des antigènes purifiés (nature exacte non communiquée).

Récemment, des analyses par spectrométrie de masse ont permis d'identifier un certain nombre des protéines communes entre les différents PPD (antigènes issus de dérivés protéiques purifiés) utilisés pour le diagnostic de la tuberculose. Ces études ont également montré la très grande hétérogénéité des préparations, ce qui peut expliquer en partie la non-concordance des résultats observés (Subrahmanya, 2013).

L'utilisation d'une approche comparable pourrait permettre de mieux caractériser les préparations antigénique de *Map* afin de les standardiser, voire de privilégier celles qui sont les plus spécifiques de *Map*.

#### Choix du seuil de positivité

Pour la trousse ID Screen®, le seuil fixé pour un résultat douteux (S/P = 60-70 %) est plus élevé que celui de la trousse commerciale IDEXX® (S/P = 45-55 %). Cette valeur intrinsèque à chaque test est fixée par le fabricant d'après des études dont les conditions d'inclusion des animaux testés ne sont pas toujours communiquées.

Par ailleurs, Adaska (2009) suggère que les animaux ayant un rapport S/P > 43% peuvent être considérés comme positifs (IC 95%) dans les troupeaux avec une prévalence non nulle, et Collins (2002) classe un animal suspect si le S/P = 10-24% et faiblement positif si S/P = 25-39%, en s'affranchissant de la prévalence réelle au sein de troupeaux reconnus infectés. Ainsi, il n'existe pas de consensus entre les fabricant sur le choix des seuils de positivité alors que cette valeur est primordiale pour l'interprétation des résultats.

#### ***4.4.2.3. Discordances au sein d'une même trousse commerciale***

Nous avons également observé une variation des résultats entre les lots de fabrication d'une même trousse commerciale même si le coefficient d'accord kappa est raisonnablement élevé (IDEXX : 0,68 ; ID Screen® 0.78) pour une même trousse commerciale. Cette variation, déjà décrite par Dargatz (2004) peut être imputable majoritairement aux différents composants du lot, et notamment au type d'antigène qui peut être variable suivant les lots de production comme indiqué plus haut, (les deux lots ID Screen® testés utilisent un antigène différent) et de façon minoritaire aux erreurs de manipulation au laboratoire.

#### ***4.4.2.4. Analyse quantitative des résultats***

L'analyse quantitative des résultats au sein du troupeau où la maladie est endémique indique une différence significative des valeurs de densité optique entre les animaux classés positifs et ceux classés négatifs, quelle que soit la trousse commerciale utilisée. Cependant, ce résultat est difficilement interprétable et extrapolable du fait du faible effectif de l'étude.

En outre, Sweeney et Whitlock (2006) estiment que le changement de la valeur de densité optique au cours du temps, sur des animaux ayant une culture fécale négative, n'est pas prédictive de l'infection chez les animaux séronégatifs au sein de troupeaux infectés (i.e dont les résultats sont inférieurs au seuil S/P=25%, test HerdCheck®IDEXX).

## CONCLUSION

L'objet de cette étude était de mieux définir la spécificité des tests sérologiques utilisés pour le dépistage de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* au sein de troupeaux supposés indemnes de paratuberculose (pas d'historique de cas cliniques, contrôlés régulièrement séronégatifs depuis des années, et avec des introductions contrôlées) alors qu'ils ont des résultats non-négatifs de façon répétée. L'objectif était de déterminer si ces résultats étaient dus à un changement du statut du troupeau, ou à un défaut de spécificité des trousseuses ELISA utilisées sur des échantillons de sérum individuels. Un dépistage des animaux de plus de 24 mois au sein de ces troupeaux a été réalisé à l'aide de la coproculture, du test interféron gamma (IFN- $\gamma$ ), de la PCR quantitative (qPCR) et de la sérologie avec deux trousseuses commerciales différentes.

A partir d'un troupeau témoin positif, nous avons constaté que le protocole qPCR utilisant une étape de centri-filtration à partir de six grammes de fèces détecte trois fois plus d'animaux excréteurs que la coproculture sur mélange de 10 échantillons ou un protocole de qPCR classique sans étape de concentration. La prévalence apparente était de 16,6% si l'on considère cette qPCR comme le test de référence. De plus, les deux trousseuses commerciales ELISA ont un niveau de détection similaire à ceux de la coproculture, et permettent donc une bonne détection des animaux excréteurs au sein d'un élevage à forte prévalence.

A l'inverse, au sein de trois troupeaux supposés indemnes de paratuberculose comme suggéré par l'ensemble des résultats négatifs des tests de détection directe de la mycobactérie (qPCR et coproculture), et de dosage de l'IFN- $\gamma$  permettant de détecter l'exposition à la mycobactérie, des résultats sérologiques non-négatifs ont été obtenus avec les deux trousseuses commerciales utilisées. La spécificité des trousseuses ELISA utilisées (deux lots de production testés sur 375 animaux par trousse) au sein de ces troupeaux supposés indemnes est estimée à 99.5% (IDEXX®) et à 96,5 % (ID Screen®, ID.vet).

L'utilisation des tests sérologiques au sein d'un troupeau présentant une prévalence très faible voire nulle, révèle une fréquence non négligeable de réactions atypiques, qui conduit à conclure, par erreur, à la présence d'animaux infectés. Cela a des conséquences sur la qualification du troupeau, et peut nuire aux activités commerciales de l'élevage et à la

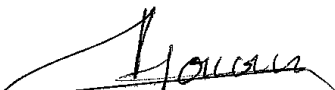
valorisation de ses produits. La détermination de l'origine de ces réactions non spécifiques nécessiterait de plus amples investigations.

Dans ce contexte, il est donc recommandé de privilégier la recherche directe de *Map* par la méthode actuellement la plus sensible, qui associe outre une qPCR sensible, une étape de concentration de l'échantillon par centri-filtration.



**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

**En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire**

Je soussigné, **Gilles FOUCRAS**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **BRUGEL Charlotte** intitulée « *Interprétation des réponses sérologiques non-négatives vis-à-vis de Mycobacterium avium subsp paratuberculosis dans des situations de faible prévalence de l'infection.* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.



Fait à Toulouse, le 17 novembre 2014  
Professeur Gilles FOUCRAS  
Enseignant chercheur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse


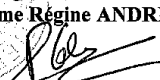


Vu :  
Le Directeur de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Professeur Alain MILON

Vu : le 28 novembre 2014  
Le Président du jury :  
Professeur Bruno MARCHOU



Vu et autorisation de l'impression :  
Le Président de l'Université  
Paul Sabatier  
Professeur Bertrand MONTHUBERT  
Par délégation, la Vice-Présidente du CEVU  
Madame Régine ANDRÉ OBRECHT



Melle **BRUGEL Charlotte**  
a été admis(e) sur concours en : 2009  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 25/06/2013  
a validé son année d'approfondissement le : 17/07/2014  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.





## BIBLIOGRAPHIE

**Adaska J M, Munoz Zanzi C A and Hietala S K. 2002.** Evaluation of result variability with a commercial Johne's disease enzyme-linked immunosorbent assay kit and repeat testing of samples. *J Vet Diagn Invest*, 14: 423 – 426.

**Alinovi C A, Ward M P, Lin T L, Moore G E and Wu C C. 2009.** Real-Time PCR, compared to liquid and solid culture media and ELISA, for the detection of *Mycobacterium avium* ssp paratuberculosis. *Vet.Microbiol*, 136: 177- 179.

**Begg DJ, Whittington RJ, 2008** Experimental animal infection models for Johne's disease, an infectious enteropathy caused by *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Vet J*. 2008 May;176(2):129-45. Epub 2007 Apr 20. Review.

**Bradner, Robbe-Austermann S, Beitz D C, Stabel J R, 2013.** Short communication: Application of an N-acetyl-l-cysteine-NaOH decontamination method for the recovery of viable *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from milk of naturally infected cows. *Journal of Dairy Science* (Impact Factor: 2.57). 03/2014.

**Berghaus R D, Farver T B, Anderson R J, Jaravata C C and Gardner I A. 2006.** Environmental sampling for detection of *Mycobacterium avium* ssp paratuberculosis on large Californian dairies. *J Dairy Sci*, 89: 963-970.

**Buza JJ, Hikono H, Mori Y, Nagata R, Hirayama S, Aodon-geril, Bari AM, Shu Y, Tsuji NM, Momotani E, 2004.** Neutralization of interleukin-10 significantly enhances gamma interferon expression in peripheral blood by stimulation with Johnin purified protein derivative and by infection with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in experimentally infected cattle with paratuberculosis. *Infect Immun*. 2004 Apr;72(4):2425-8.

**Chiodini RJ, Rossiter CA, 1996.** Paratuberculosis: a potential zoonosis? *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 1996 Jul;12(2):457-67.

**Chiodini RJ, Van Kruiningen et al, 1984.** Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): current status and future prospects. *Cornell Vet* 74(3): 218-62.

**Chognard T, 2011.** Evaluation du statut des troupeaux bovins vis-à-vis de l'infection a *Mycobactérium avium* subspecies paratuberculosis, ONIRIS, Nates, 149p.

**Clarke CJ, 1997.** The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J Comp Pathol*. 1997 Apr;116(3):217-61.

**Collins M T. 1996.** Diagnosis of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 12:357- 371.

**Collins DM, Stephens DM, de Lisle GW, 1993.** Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium* paratuberculosis in bovine faeces. *Vet Microbiol*. 1993 Sep;36(3-4):289-99. Erratum in: *Vet Microbiol* 1995 Mar;43(4):331.

**Collins M T. 2002.** Interpretation of a commercial bovine paratuberculosis enzyme-linked immunosorbent assay by using likelihood ratios. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9: 1367-1371.

**Collins M T, Gardner I A, Garry F B, Roussel A J and Wells S J. 2006.** Consensus recommendations on diagnostic testing for the detection of paratuberculosis in cattle in the United States. *J Am Vet Med Assoc*, 229: 1912-1919.

**Collins MT, Wells SJ, Petrini KR, Collins JE, Schultz RD, Whitlock RH, 2005.** Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005 Jun;12(6):685-92.

**Crossley B M, Zagmutt-Vergara F J, Fyock T L, Whitlock R H and Gardner I A. 2005.** Fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by dairy cows. *Vet Microbiol*, 107: 257-263.

**Coussens PM, 2004.** Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in cattle. *Infect Immun*. 2004 Jun;72(6):3089-96.

**Coussens PM, 2001.** *Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system. *Anim Health Res Rev*. 2001 Dec;2(2):141-61.

**Curtis MM. and Way SS, 2009.** Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology*. 2009; 126: 177–185.

**Dargatz D, Byrum B, Collins et al., 2004,** A Multilaboratory Evaluation of a Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Test for the Detection of Antibodies against *Mycobacterium Avium* Subsp. *Paratuberculosis* in Cattle, *J VET Diagn Invest* 2004 16: 509.

**Delbrouck Y, 2008.** Valeur informative d'outils utilisables à grande échelle pour déterminer le statut de troupeaux bovins laitiers vis-à-vis de l'infection à mycobactérium avium spp paratuberculosis, ONIRIS 106p.

**Diéguez FJ, González AM, Menéndez S, Vilar MJ, Sanjuán ML, Yus E, Arnaiz I, 2009.** Evaluation of four commercial serum ELISAs for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in dairy cows. *Vet J*. 2009 May;180(2):231-5.

**Douarre PE, Cashman W, Buckley J, Coffey A, O'Mahony JM, 2010.** Isolation and detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP) from cattle in Ireland using both traditional culture and molecular based methods. *Gut Pathog*. 2010 Sep 27;2(1):11.

**Dudemaine PL, Fecteau G, Lessard M, Labrecque O, Roy JP, Bissonnette N, 2014.** Increased blood-circulating interferon- $\gamma$ , interleukin-17, and osteopontin levels in bovine paratuberculosis. *J Dairy Sci*. 2014 Jun;97(6):3382-93.

**Eamens G J, Walker D M, Porter NS, Fell SA, 2008.** Radiometric pooled faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis in low-shedder cattle. *Aust Vet J*. 2008 Jul;86(7):259-65.

**Eamens GJ, Whittington RJ, Marsh IB, Turner MJ, Saunders V, Kemsley PD, Rayward D, 2000.** Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease. *Vet Microbiol*. 2000 Dec 20;77(3-4):357-67

**Eisenberg S W, Koets A P, Nielen M, Heedrik D, Mortier R, Debuck J and Orsel K. 2011.** Intestinal infection following aerosol of calves with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *VET RES*, 42: 117.

**Eisenberg S W, Nielen M, Hoeboer J, Rutten V, Heederik D and Koets A P. 2012.** Environmental contamination with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* within and around a dairy barn under experimental conditions. *J Dairy Sci*, 92: 6477-6482.

**Englund S, Bölske G, Johansson KE, 2002.** An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2002 Apr 9;209(2):267-71

**Fernandez B, Gilardoni L R, Jolly A, Colavecchia S B, Paolicchi F A and Mundo S L. 2012.** Detection of Bovine IgG Isotypes in a PPA-ELISA for Johne's Disease Diagnosis in Infected Herds. *Vet Med Int*.

**Gao A, Odumeru J, Raymond M and Mutharia L. 2005.** Development of improved method for isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bulk tank milk: effect of age of milk, centrifugation, and decontamination. *Can J Vet Res*, 69: 81-87.

**Gollnick NS, Mitchell RM, Baumgart M, Janagama HK, Sreevatsan S, Schukken YH, 2007.** Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine monocyte-derived macrophages is not affected by host infection status but depends on the infecting bacterial genotype. *Vet Immunol Immunopathol*. 2007 Dec 15;120(3-4):93-105.

**Guatteo R, Joly A, Beaudeau F Chognard T and Fourichon C. 2012.** Evaluation of combined environmental and pooled animals sampling to determinate dairy cattle herd infection status for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP). In *11 th International Colloquium on Paratuberculosis (ICP)*, pp 349-351.

**Guatteo R, Joly A, Seegers H, Burbán E and Fourichon C. 2012.** Shedding patterns over time of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) in cattle. In *11 th International Colloquium on Paratuberculosis (ICP)*, pp 352-354.

**Gaucharnaud M, 2009.** Description de la prévalence de la paratuberculose chez les bovins maitiers dans le monde : revue et analyse. ENVN. Nantes 139p.

**Gumber S, Taylor DL, Whittington RJ, 2009.** Evaluation of the immunogenicity of recombinant stress-associated proteins during *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection: Implications for pathogenesis and diagnosis. *Vet Microbiol*. 2009 Jun 12;137 (3-4):290-6.

**Hendrick SH, Kelton DF, Leslie KE, Lissemore KD, Archambault M, Duffield TF, 2005.** Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. *J Am Vet Med Assoc*. 2005 Oct 15;227(8):1302-8.

**Herd-book de la race Limousine, 2013,** Règlement intérieur du Herd-Book de la race Limousine, <http://www.limousine.org/UserFiles/file/PDF/2013-HBL-REGLEMENT-INTERIEUR.pdf>

**Herthnek D, Nielsen S S, Lindberg A and Bolske G 2008.** A robust method for bacterial lysis and DNA purification to be used with real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk *J Microbiol Methods*, 75: 335-340.

**Huda A, Jungersen G, Lind P, 2004.** Longitudinal study of interferon-gamma, serum antibody and milk antibody responses in cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Microbiol*. 2004 Nov 30;104(1-2):43-53.

**Joly A, Beaudeau F, Guatteo R, Seegers H, Fourichon C and Roger G. 2009.** Evaluation du statut de cheptels laitiers vis-à-vis de la paratuberculose par combinaison de tests de dépistage direct et indirect. In 17. *Rencontres Recherches Ruminants (RRR)*, pp 79-82.

**Jungersen G, Huda A, Hansen JJ, Lind P, 2002.** Interpretation of the gamma interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002 Mar;9(2):453-60.

**Kalis C H, Hesselink J W, Russchen E W, Barkema H W, Collins M T and Visser I J.2000.** Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine fecal samples. *J Vet Diagn Invest*, 11: 345-351.

**Khare S, Ficht T A, Santos R L, Romano J, Ficht A R, Zhang S, Grant I R, Libal M, Hunter D and Adams L G. 2004.** Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 42: 1075-1081.

**Kim SG, Kim EH, Lafferty CJ, Miller LJ, Koo HJ, Stehman SM, Shin SJ, 2004.** Use of conventional and real-time polymerase chain reaction for confirmation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a broth-based culture system ESP II. *J Vet Diagn Invest*. 2004 Sep;16(5):448-53.

**Koets AP, Rutten VP, de Boer M, Bakker D, Valentin-Weigand P, van Eden W, 2001.** Differential changes in heat shock protein-, lipoarabinomannan-, and purified protein derivative-specific immunoglobulin G1 and G2 isotype responses during bovine *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Infect Immun*. 2001 Mar;69(3):1492-8.

**Leite K, Stokes D et al. 2013, Comparison of fecal extraction kits for the detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* by polymerase chain reaction, *J VET Diagn Invest* 2013 25: 27.**

**Li L, Bannantine JP, Zhang Q, Amonsin A, May BJ, Alt D, Banerji N, Kanjilal S, Kapur V. 2005.** The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 12344-12349.

**Logar K, Kopinc R, Bandelj P, Staric J, Lapanje A and Ocepek M. 2012.** Evaluation of combined high-efficiency DNA extraction and real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in subclinically infected dairy cattle: comparison with faecal culture, milk real-time PCR and milk ELISA. *BMC Vet Res*, 8: 49.

- Lombarde JE, Wagner BA, Smith RL, McCluskey BJ, Harris BN, Payeur JB, Garry FB and Salman MD. 2006.** Evolution of environmental sampling and culture to determine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* distribution and herd infection status on US dairy operations *J Dairy Sci*, 89: 4163-4171.
- McKenna SL, Sockett DC, Keefe GP, McClure J, VanLeeuwen JA, Barkema HW, 2006.** Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Vet Diagn Invest*. 2005 Sep;17(5):463-6.
- Mikkelsen H, Aagaard C, Nielsen SS, Jungersen G, 2011.** Review of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antigen candidates with diagnostic potential. *Vet Microbiol*. 2011 Aug 26;152(1-2):1-20.
- Mikkelsen H, Aagaard C, Nielsen SS, Jungersen G, 2012.** Correlation of antigen-specific IFN- $\gamma$  responses of fresh blood samples from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infected heifers with responses of day-old samples co-cultured with IL-12 or anti-IL-10 antibodies. *Vet Immunol Immunopathol*. 2012 Jun 15;147(1-2):69-76.
- Mitchell RM, Medley GF, Collins M T, Schukken Y H., 2011.** A meta-analysis of the effect of dose and age at exposure on shedding of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) in experimentally infected calves and cows. *Epidemiol Infect*. 2012 Feb;140(2):231-46.
- Mon ML, Viale M, Baschetti G, Alvarado Pinedo F, Gioffre A, Travería G, Willemsen P, Bakker D, Romano MI, 2012.** Search for *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* Antigens for the Diagnosis of Paratuberculosis. *Vet Med Int*. 2012;2012:860362.
- Moriceau C, 2013.** Evaluation de la valeur informative d'outils diagnostiques utilisés seuls ou en combinaison pour définir le statut des troupeaux bovins vis-à-vis de l'infection par *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. Docteur vétérinaire, ONIRIS,170.
- Mortier RA, Barkema HW, Bystrom JM, Illanes O, Orsel K, Wolf R, Atkins G, De Buck J, 2013.** Evaluation of age-dependent susceptibility in calves infected with two doses of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* using pathology and tissue culture. *Vet Res*. 2013 Oct 7;44:94.
- Nielsen SS, 2009.** Programmes on paratuberculosis in Europe. In *10th International Colloquium on Paratuberculosis (ICP)*, p 101-108.
- Nielsen SS. 2008.** Transition in diagnostic tests used for detection of *Mycobacterium avium* subsp.*paratuberculosis* infections in cattle. *Vet Microbiol*, 132: 274-282.
- Nielsen SS, Enevoldsen C and Grohn YT. 2002.** The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ELISA response by parity and stage of lactation. *Pres Vet Med*, 54: 1-10.
- Nielsen SS, Ersbøll AK, 2006.** Age at occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in naturally infected dairy cows. *J Dairy Sci*. 2006 Dec;89(12):4557-66.

- Nielsen SS, Grohn YT and Enevoldsen C. 2002.** Variation of the milk antibody response to paratuberculosis in naturally infected dairy cows. *J Dairy Sci*, 85: 2795-2802.
- Nielsen SS, Gronbaek C, Agger J F and Houe H. 2002.** Maximum-likelihood estimation of sensitivity and specificity of ELISAs and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis. *Prev Vet Med*, 53: 191-204.
- Nielsen SS, Thamsborg SM, Houe H and Bitsch V. 2002.** Bulk –tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds *Prev Vet Med*, 44: 1-7.
- Nielsen SS and Toft N, 2008.** Ante mortem diagnosis of paratuberculosis a review of accuracies of ELISA, interferon- gamma assay and faecal culture techniques. *Vet Microbiol*, 129: 217-235.
- Nielsen SS and Toft N, 2012.** Effect of days in milk and milk yield on testing positive in milk antibody ELISA to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle. *Vet Immunol Immunopathol*, 149: 6-10.
- Olsen I, Boysen P, Kulberg S, Hope JC, Jungersen G, Storset AK, 2005.** Bovine NK cells can produce gamma interferon in response to the secreted mycobacterial proteins ESAT-6 and MPP14 but not in response to MPB70. *Infect Immun*. 2005 Sep;73(9):5628-35.
- Park K.T, Allen A.J, Bannantine, JP, Seo K.S, Hamilton MJ, Abdellrazeq G.S, Rihan, HM, Grimm A., Davis WC, 2011.** Evaluation of two mutants of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* as candidates for a live attenuated vaccine for Johne's disease. *Vaccine*. 2011; 29: 4709–4719.
- Petit E, 2001.** Enquête sérologique sur la paratuberculose bovine menée dans l'Yonne lors de la campagne 98-99. *Epidemiol. Sante Anim.*, 40 : 23-39.
- Pfeiffer DU, Corner LA, 2004.** Abbott KA. The respiratory tract as a hypothetical route of infection of cattle with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Aust Vet J*. 2004 Mar;82(3):170-3.
- Pillai S and Jayarao B. 2002.** Application of IS900 PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* directly from raw milk. *J Dairy Sci*, 85: 1052-1057.
- Pillars RB, Grooms DL and Kaneene JB. 2009.** Longitudinal study of the distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment of dairy herds in the Michigan John's disease control demonstration herd project. *Can Vet J*, 50: 1039-1046.
- Poitras E., Houde A. 2002,** La PCR en temps réel : principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology*. , 2(2): 2-11.
- Pozzato N, Gwozdz J, Gastaldelli M, Capello K, Dal Ben C, Stefani E, 2011.** Evaluation of a rapid and inexpensive liquid culture system for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine faeces. *J Microbiol Methods*. 2011 Mar;84(3):413-7.

**Pradhan A K, Mitchell R M, Kramer A J, Zurakowski M J, Fyock T L, Whitloch R H, Smith J M, Hovingh E, Van Kessel J A, Karns J S and Schukken Y H. 2011.** Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a longitudinal study of three dairy herds. *J Clin Microbiol* , 49: 893-901.

**Pradhan AK, et al. 2009.** Dynamics of endemic infectious diseases of animal and human importance on three dairy herds in the northeastern United States. *J. Dairy Sci.* 92:1811–1825.

**Raizman EA, Wells SJ, Godden SM, Bey RF, Oakes MJ Bentley DC and Olsen KE. 2004.** The distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in the environment surrounding Minnesota dairy farms. *J Dairy Sci*, 87: 2959-2966.

**Rapport du groupe de travail relatif a la certification en paratuberculose bovine, Version 6. 8 03 2002**

**Reddacliff LA, McGregor H, Abbott K, Whittington RJ, 2004.** Field evaluation of tracer sheep for the detection of early natural infection with *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *Aust Vet J.* 2004 Jul;82(7):426-33.

**Reddacliff L, Vadali A, Whittington R. 2003.** The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from tissues and faeces. *Vet. Microbiol.*95:271–282

**Ristow P, Gomes Silva M, de Souza Fonseca L, Lilenbaum W, 2006.** Evaluation of *Mycobacterium avium*. subsp. *paratuberculosis* *paratuberculosis* faecal culture protocols and media. *Pesq. Vet. Bras.* 26(1):1-4, jan./mar. 2006.

**Sergeant ES, Nielsen SS and Toft N . 2008.** Evaluation of test-strategies for estimating probability of low prevalence of *paratuberculosis* in Danish dairy herds. *Prev Vet Med*, 85: 92-106.

**Shu D, Subharat S, Wedlock D.N, Luo D, de Lisle G.W, Buddle B.M, 2011.** Diverse cytokine profile from mesenteric lymph node cells of cull cows severely affected with Johne's disease. *Clin. Vaccine Immunol.* 2011;18: 1467–1476.

**Slana I, Kralik P, Kralova A, Babek V and Pavlik I. 2012.** Short communication: Examination of milk filters by real-time PCR as a herd-level indicator of the presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy herds. *J Dairy Sci*, 95: 1162-1165.

**Slana I, Kralik P, Kralova A and Pavlik I. 2008.** On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. *Int J Food Microbiol*, 128: 250-257.

**Smith RL, Schukken YH, Pradhan AK, Smith JM, Whitlock RH, Van Kessel JS, Wolfgang DR and Grohn YT. 2011.** Environmental contamination with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in endemically infected dairy herds *Prev Vet Med*, 102: 1-9.

**Stabel JR .2000.** Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis* *Vet Microbiol*, 77: 465-473.



**Stabel JR, 1997.** An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine faecal samples & comparison to three other methods. *J. Vet. Diag. Invest.* 9:375-380.

**Stehman SM, 1996.** Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1996 Jul;12(2):441-55. Review.

**Stich RW, Byrum B, Love B, Theus N, Barber L, Shulaw WP, 2004.** Evaluation of an automated system for non-radiometric detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis* in bovine feces. *J Microbiol Methods.* 2004 Feb;56(2):267-75.

**Subrahmanya T, Prasad K, Verma R., Kumar S, 2013,** Proteomic analysis of purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* Prasad et al. *Clinical Proteomics* 2013, 10:8 <http://www.clinicalproteomicsjournal.com/content/10/1/8>.

**Sweeney RW, Jones DE, Habecker P, Scott P, 1998.** Interferon-gamma and interleukin 4 gene expression in cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res.* 1998 Jul;59(7):842-7.

**Sweeney RW, Whitlock RH, McAdams S, Fyock T, 2006.** Longitudinal study of ELISA seroreactivity to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected cattle and culture-negative herd mates. *J Vet Diagn Invest.* 2006 Jan;18(1):2-6.

**Tavornpanich S, Gardner IA, Anderson RJ, Shin S, Whitlock RH, Fyock T, Adaska J M, Walker R L and Hietala SK. 2004.** Evaluation of microbial culture of pooled fecal samples for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in large dairy herds. *Am J Vet Res,* 65: 1061-1070.

**Tavornpanich S, Wells SJ , Fossler C P, Roussel A J and Gardner I A. 2012.** Evaluation of an alternative method of herd classification for infection with paratuberculosis in cattle herds in the United States. *Am J Vet Res,* 73: 248-256.

**Tiwari A, VanLeeuwen J A, McKenna S L, Keefe G P and Barkema H W. 2006.** John's disease in Canada Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Can Vet J,* 47: 874-882.

**Toma B, Dufour B, Sanaa M, Benet JJ, outon F, Louza A, 2001.** Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies transmissibles majeures. Maisons-Alfort, Association pour l'Etude de l'Epidémiologie des maladies animales.

**Tasara T, Stephan R, 2005.** Development of an F57 sequence-based real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Oct;71(10):5957-68.

**Van der Giessen JW, Haring RM, Vaclare E, Eger A, Haagsma J, van der Zeijst BA, 1992.** Evaluation of the abilities of three diagnostic tests based on the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle: application in a control program. *J Clin Microbiol.* 1992 May;30(5):1216-9.

**Van Roermund HJ, Bakker D, Willemsen PT and de Jong MC. 2007.** Horizontal transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in an experimental setting: calves can transmit the infection to other calves. *Vet Microbiol*, 122: 270-279.

**Van Schaik G, Stehman S M, Schukken Y H, Rossiter C R and Shin S J. 2003.** Pooled fecal culture sampling for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at different herd sizes and prevalence *J Vet Diagn Incest* 15: 233-241.

**Van Schaik G, Pradenas F M, Mella N A, Kruze V J, 2007.** Diagnostic validity and costs of pooled fecal samples and individual blood or fecal samples to determine the cow- and herd-status for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Prev Vet Med.* 2007 Nov 15;82(1-2):159-65. Epub 2007 Jun 26.

**Van Weering H, Van Schaik G, Van der Meulen A, Waal M, Franken P and Van Maanen K, 2007.** Diagnostic performances of the Pourquier ELISA for detection of antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in individual milk and bulk milk samples of dairy herds. *Vet Microbiol*, 125: 233-244.

**Weber M F, Kogut J, de Bree J, Van Schaik G and Nielen M, 2009.** Age at which dairy cattle become *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* faecal culture positive. *Prev Vet Med*, 97: 29-36.

**Weiss DJ, Evanson OA, de Souza C, Abrahamsen MS, 2005.** A critical role of interleukin-10 in the response of bovine macrophages to infection by *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *Am J Vet Res.* 2005 Apr;66(4):721-6.

**Wells S J, Collins MT, Faaberg KS, Wees C, Tavoranpanich S, Petrini KR, Collins JE, Cernicchiaro N and Whitlock RH. 2006.** Evaluation of a rapid fecal PCR for detection for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle. *Clin Vaccine Immunol*, 13: 1125-1130.

**Whipple DL, Kapke PA, Andersen PR, 1992.** Comparison of a commercial DNA probe test and three cultivation procedures for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. *J Vet Diagn Invest.* 1992 Jan;4(1):23-7.

**Whitlock RH, 2008.** Cattle Shedding MAP: a new Paradigm, Passive shedding or active shedding? In *JDIP annual conference*.

**Whitlock RH, 2006.** Johne's disease: *Mycobacterium paratuberculosis* super-shedders: detection and contribution to passive shedding (false positive fecal culture) In *39th Annual conference of the American Association of Bovine Practitioner*, pp. 286-288.

**Whitlock RH, Wells S J, Sweeney R W and Van Tiem J, 2000.** ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet Microbiol*, 77: 387-398.

**Whitlock RH, et Rosenberger AE, 1990.** Faecal culture protocol for *Mycobacterium paratuberculosis* a recommended procedure. In: *Proc. Annual Meeting U.S. Animal Health Association* 94:280-285.

**Whittington RJ, Marshall D , Nicholls P , Marsh I and Reddacliff L . 2004.** Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl Environ Microbiol*, 70: 5792-5797

**Whittington RJ, Windsor PA., 2009.** In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. *Vet J*. 2009 Jan;179(1):60-9. Epub 2007 Oct 24.

**Williams-Bouyer N, Yorke R, Lee HI, Woods GL,2000.** Comparison of the BACTEC MGIT 960 and ESP culture system II for growth and detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol*. 2000 Nov;38(11):4167-70.

**Wilson DJ, Rood K, Biswas P and Byrem TM. 2010.** Herd-level prevalence of Johne's disease in Utah and adjacent areas of the intermountain west as detected by a bulk-tank milk surveillance project. *J Dairy Sci*, 93: 5792-5797.

**Windsor PA and Whittington R J. 2010.** Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Vet J*, 184: 37-44.

ANNEXES



## ANNEXE 1 : PROTOCOLE PCR INDIVIDUELLES SAN ENRICHISSEMENT

**Tableau 21. Protocole qPCR LSi VetMax® M. partuberculosis Advanced**

<b>Extraction d'ADN avec MAGVET® Life technologies</b>	
<b>Préparation des échantillons</b>	2g de fèces dans 30 ml d'eau Vortexer, laisser sédimenter 5-10 minutes Centrifuger 10 minutes à 15000g
<b>Broyage</b>	Ajouter 700µl de tampon T1 au culot Transférer le tout dans les tubes de broyage contenant de la poudre de billes de zirconium Broyage : 4 x 45 secondes à 6.5m/s Centrifuger 3 minutes à 15000g
<b>Extraction automatisée KingFisher 96 avec le Mag Vet Universal Isolation Kit®LSI</b>	
<b>Lyse/fixation</b>	Libération des acides nucléiques et fixation sur les billes magnétiques et transfert des billes dans les tampons de lavages
<b>3 Lavages</b>	Lavages des billes de 1 à 2 minutes
<b>Séchage</b>	Séchage des billes hors du puit pendant 5 minutes
<b>Elution</b>	10 minutes dans le tampon d'élution puis capture des billes
<b>PCR LSI VetMAX® Triplex M. paratuberculosis</b>	
<b>Mix de PCR</b>	Séquence MPTSA (primer et sondes Taqman® ; cible : <i>IS900</i> ) Master Mix MPTSA (tampon et enzymes PCR)
<b>Réaction PCR</b>	20µl du Mix de PCR + 5µl ADN extrait + 5µl EPC MPTSA (acide nucléique des cibles <i>IS900</i> ; contrôle positif externe) + 5µl IPC MPTSA (contrôle positif interne de l'extraction) + 5µl de contrôle négatif d'extraction et d'amplification
<b>PCR</b>	1x 50°C pendant 2 minutes, 1x 95°C pendant 10 minutes, 45x (95°C pendant 15 secondes, 60°C pendant 1 minute)
<b>Lecture</b>	Les échantillons sont lus en FAM et les contrôles IPC en VIC.

## ANNEXE 2 : PROTOCOLE PCR AVEC CENTRI-FILTRATION PREALABLE

**Tableau 22. Protocole adapté ADIAVET® PARATB REAL TIME, avec ADIAFILTER®**

ETAPES	ADIAVET® PARATB REAL TIME adapté
<b>Préparation des échantillons</b>	
6 g de fèces dans 40 mL d'eau, vortexer et laisser sédimenter 10, à 20 minutes	
<b>Traitement avec ADIAFILTER®</b>	
Déposer 10mL du surnageant sur ADIAFILTER Centrifuger 10 minutes à 3810 trs/min	
<b>Broyage avec Precellys®24</b>	
Mettre le culot en suspension dans 500µl d'eau bidistillée Transvaser dans des microtubes contenant 300 mg de poudre de verre Broyage : 3 cycles de 30 secondes à 6800 rpm avec des pauses de 30 secondes entre chaque cycle	
<b>Extraction d'ADN avec NucleoSpin® 96Tissue, MACHEREY-NAGEL</b>	
<b>Lyse</b>	Transférer 200µl du surnageant dans les puits de la plaque MN-Square Well block contenant 200µl de tampon BQ1 + 5µl de protéinase K + 5µl EPC-Extraction ; Homogénéiser
<b>Incubation</b>	Incuber 15 minutes à 56°C
<b>Polarisation des acides nucléiques</b>	Ajouter 210µl d'éthanol 100% dans chaque puits Homogénéiser
<b>Transfert sur plaque et fixation à la membrane de silice</b>	Déposer la totalité de chaque puits dans ceux de la plaque 96 Nucleo Spin®Tissue Binding Plate Centrifuger 3 minutes à 2100g
<b>Lavage 1</b>	Ajouter 500µL de tampon BW Centrifuger 3 minutes à 2100g
<b>Lavage 2</b>	Ajouter 700µL de tampon B5 Centrifuger 3 minutes à 2100g
<b>Séchage de la plaque</b>	Placer la plaque NucleoSpin®Tissue Binding Plate sur une plaque 96 puits neuve Centrifuger 12 minutes à 2100g
<b>Elution en plaque 96 puits</b>	Placer la plaque NucleoSpin®Tissue Binding Plate sur la plaque d'élution Rack of MN tube Strips Déposer 100µL de tampon d'élution BE à 56°C Incuber 10 minutes Centrifuger 3 minutes à 2100g
<b>Conservation</b>	24heures à +2-8°C, ou -20°C (±5°C) au-delà de 24 heures
<b>Amplification avec le Light Cycler 480®Roche</b>	
<b>Préparation des mélanges d'amplification</b>	Ajouter 20µL de l'Amplification Solution A5 dans chaque puits de la plaque PCR + 5µL d'extraits d'ADN issus des échantillons, ou+ 5µL du PARA positive control ou rien ajouter pour avoir le témoin négatif PCR ou + 5µL d'ADN positif
<b>PCR</b>	1x 50°C pendant 2 minutes, 1x 95°C pendant 10 minutes, 45x (95°C pendant 15 secondes, 60°C pendant 1 minute)
<b>Lecture</b>	Echantillons lus en FAM (450-500 nm), contrôle EPC-extraction et PARA+ control en VIC (523-568 nm)
<b>Analyse : logiciel Light Cycler 480®Roche</b>	Placement manuel (Quant/abs ; Fit points) de la ligne seuil au milieu de la partie linéaire (échelle logarithmique) commune à l'ensemble des courbes d'amplification caractéristiques

### ANNEXE 3 : PROTOCOLES ELISA UTILISES

**Tableau 23. Protocoles ELISA utilisés**

ETAPES	IDEXX® Paratuberculosis Ab Test, IDEXX	ID Screen® Paratuberculois Indirect Screening Test, ID.vet
<b>Pré incubation des échantillons et contrôles</b>	Diluer les échantillons, les contrôles négatifs et positifs au 1/20 dans le tampon de dilution et distribuer dans un puits de la plaque de pré-dilution. Incuber 15 minutes à 2 heures à 18–26°C.	Diluer les échantillons, les contrôles négatifs et positifs au 1/12 avec le tampon de dilution 6 et distribuer dans la plaque de pré-dilution Incuber 5 à 45 minutes à 21°C (±5°C)
<b>Incubation des échantillons</b>	Transférer 100 µl de chaque puits dans la microplaque sensibilisée Incuber 45 minutes (±5 min.) à 18–26°C ou durant la nuit (16–24 heures) à 2–8°C	Transférer 100 µl de chaque puits dans la microplaque sensibilisée Incuber 45 minutes (±5 min.) à 21°C (± 5°C) ou durant la nuit (16–24 heures) à 4°C (± 2°C)
<b>Lavage des plaques</b>	Eliminer le contenu des puits et laver 3 à 5 fois chaque puits avec environ 300 µl de la solution de lavage.	Eliminer le contenu des puits et laver 3 fois chaque puits avec environ 300 µl de la solution de lavage.
<b>Distribution du conjugué</b>	Distribuer 100 µl de Conjugué dilué par puits.	
<b>Incubation du conjugué</b>	Incuber 30 minutes (±3 min.) à 18–26°C.	Incuber 30 minutes (±3 min.) à 21°C (± 5°C)
<b>Lavage des plaques</b>	Vider les puits et laver 3 fois chaque puits avec approximativement 300 µl de la solution de lavage.	
<b>Distribution du substrat</b>	Distribuer 100 µl de solution de révélation (TMB) par puits.	
<b>Incubation du substrat</b>	Incuber 10 minutes (±3 min.) à 18–26°C à l'abri de la lumière.	Incuber 15 minutes (±2 min) à 21°C (± 5°C)
<b>Arrêt de la réaction</b>	Distribuer 100 µl de solution d'arrêt par puits.	
<b>Lecture de la plaque</b>	Mesurer et enregistrer les densités optiques en monochromatisme à 450nm.	



## ANNEXE 4 : PROTOCOLES IFN- $\gamma$ ID.VET

La détection de l'interféron gamme (IFN- $\gamma$ ) par la méthode ELISA sandwich est largement utilisée pour la mise en évidence de la réponse cellulaire à des agents pathogènes comme *Map* ou *Mycobacterium bovis*.

Après prélèvement du sang total dans des tubes avec héparinate de lithium de 10 mL, les échantillons ont été transportés à une température ambiante comprise entre 16 et 22 °C, et ont été traités dans les 8 à 10 heures après le prélèvement.

### Stimulation sur sang total

Afin de déterminer la réponse spécifique des lymphocytes T à un antigène, chaque échantillon de sang total a été incubé durant 20 heures à 37°C avec différents antigènes dans des plaques de culture cellulaire stériles (200 $\mu$ l de sang pour 20 $\mu$ l d'antigènes activateurs et contrôle). Pour l'activation cellulaire, chaque échantillon a été incubé en parallèle avec 25  $\mu$ l de :

- l'antigène spécifique de *Map* (ie PPD johnin, échantillon activé)
- l'antigène de contrôle non spécifique (e.x. PPD avium)
- un contrôle positif d'activation (mitogène). ID.vet recommande l'utilisation du mitogène afin de vérifier l'intégrité des lymphocytes et leur capacité à synthétiser de l'interféron gamma.
- un contrôle négatif d'activation (PBS)

Les plaques sont ensuite centrifugées à 3000g durant 10 minutes à température ambiante. Le plasma prélevé est alors utilisé immédiatement avec le kit ELISA ID Screen® Ruminant IFN- $\gamma$ .

### Test ELISA ID Screen® Ruminant IFN- $\gamma$

Les cupules des microplaques sont sensibilisées avec un anticorps monoclonal (Ac M) anti-IFN- $\gamma$ . Les échantillons à tester et les contrôles sont distribués dans les cupules. Si l'IFN- $\gamma$  est présent alors il se forme un complexe Ac M-antigène. Après lavage, un conjugué anti-ruminants (anti-IFN- $\gamma$ -HRP) est distribué dans les cupules. Il se fixe à l'IFN- $\gamma$ , formant un complexe Ac M-antigène-conjugué-HRP. Après élimination du conjugué en excès par lavage, la réaction est révélée par une solution de révélation (TMB).

La coloration qui en résulte est liée à la quantité d'IFN- $\gamma$  présente dans l'échantillon à tester:

- en présence d'IFN- $\gamma$  dans l'échantillon, il apparaît une coloration bleue qui devient jaune après blocage.
- en l'absence d'IFN- $\gamma$  dans l'échantillon, il n'apparaît pas de coloration.

La lecture de la densité optique est réalisée à 450 nm.

Pour chaque échantillon, on calcule le ratio S/P en fonction des valeurs moyennes de densité optique des contrôles positifs (DO<sub>CP</sub>) et des contrôles négatifs (DO<sub>CN</sub>) et celle du contrôle non spécifique :

$$S/P (\%) = \frac{DO \text{ échantillon activé} - DO \text{ échantillon contrôle (ex PPD avium)} \times 100}{DO_{CP} - DO_{CN}}$$

## ANNEXE 5 : PROTOCOLE DE CULTURE EN MILIEU LIQUIDE

**Tableau 24. Protocole de culture en milieu Para JEM® TREK et confirmation par PCR LSI VetMAX® Triplex *M. paratuberculosis***

ETAPES	Para-JEM®TREK
<b>Protocole de décontamination</b>	
<b>Préparation</b>	Mixer 2 g de fèces dans 35 mL d'eau Laisser sédimenter pendant 30 minutes
<b>Centrifugation 1</b>	Récupérer 50 mL du surnageant Centrifuger 20 minutes à 1700g (3000 rpm)
<b>Décontamination 1</b>	Suspendre le culot dans 30 mL de solution BHI 1/2X-0.9% HPC Incuber 18-24h à 35-37°C
<b>Centrifugation 2</b>	Centrifuger 30 minutes à 1700g (3000 rpm)
<b>Décontamination 2</b>	Suspendre le culot dans 2mL de MIX Antibiotique Incuber 18-24h à 35-37°C
<b>Reconstitution des flacons de culture liquide</b>	
<b>para-JEM®broth</b>	milieu Middlebrook 7H9 modifié, avec entre autre de la mycobactine J
<b>para-JEM® GS</b>	+ 1mL (milieu Middlebrook OADC)
<b>para-JEM® EYS</b>	+ 1mL (solution d'enrichissement à base de jaune d'œuf)
<b>para-JEM® AS</b>	+ 500µL (vacomycine, amphotéricine B, acide nalidixique)
<b>para-JEM® blue</b>	+ 50 µL (réactif colorimétrique)
	Déposer 500µL de cette solution dans le flacon para-JEM®broth
<b>Incubation dans l'armoire Versa TREK® jusqu'à 42 jours à 37°C</b>	
<b>Extraction d'ADN</b>	
<b>Boyage avec le Tissue Lyser® QIAGEN</b>	Déposer 1mL du bouillon homogénéisé dans un microtube contenant des billes de zirconium Broyage : 10 minutes à 30 Herz Centrifuger 3 minutes à 15000 g
<b>Extraction automatisée KingFisher96</b>	
<b>Lyse/fixation</b>	Libération des acides nucléiques et fixation sur les billes magnétiques et transfert des billes dans les tampons de lavages
<b>3 Lavages</b>	Lavages des billes de 1 à 2 minutes
<b>Séchage</b>	Séchage des billes hors du puits pendant 5 minutes
<b>Elution</b>	10 minutes dans le tampon d'élution puis capture des billes
<b>PCR LSI VetMAX® Triplex <i>M. paratuberculosis</i></b>	
<b>Mix de PCR</b>	Séquence TMPT (primer et sondes Taqman® ; cible IS900 et F57 de <i>Map</i> et IPC) Master Mix TMPT (tampon et enzymes PCR)
<b>Réaction PCR</b>	20 µL du MIX PCR + 5 µL ADN extrait + 5 µL EPC TMPT (acide nucléique des cibles IS900 et F57 ; contrôle positif externe) + 5 µL IPC TMPT (contrôle positif interne de l'extraction)
<b>PCR</b>	1x 50°C pendant 2 minutes, 1x 95°C pendant 10 minutes, 45x (95°C pendant 15 secondes, 60°C pendant 1 minute)
<b>Lecture</b>	Cible IS 900 lue en FAM, Cible F57 lue en VIC, Cible IPC lue en Cyanine red CYS

## ANNEXE 6 : SYNTHESE DES QUESTIONNAIRES

**Tableau 25. Synthèse des réponses au questionnaire dans l'élevage D**

ELEVAGE		D	
<b>Cheptel</b>			
		Mères	Taureaux
2011		62	3
2012		56	2
2013		60	2
<b>Conduite du troupeau</b>			
Période de sortie des animaux		Avril – fin Novembre	
Lieu de vie des jeunes jusqu'à la sortie de l'élevage		Avec les mères jusqu'au sevrage	
Lieu de vie des génisses de renouvellement		Avec les mères jusqu'au sevrage	
Utilisation de nourrices		Oui : Brune ou Prim Holstein	
Age de vente	Mâles	Broutards : 6 - 7 mois Veaux de boucherie : 5 mois	
	Femelles		
<b>Gestion des introductions</b>			
numéros de travail des animaux introduits en 2011, 2012, 2013 et statuts sanitaires des élevages d'origine des animaux		Pas d'achat de Limousine depuis 3 ans 2012 : 2 Brune	
Contrôles fait à l'introduction		IBR / leucose / brucellose	
Mise en place d'une quarantaine		Non, introduction après le résultat de la PS d'achat	
<b>Gestion de la reproduction</b>			
Répartition des naissances sur l'année		Janvier – Juin	
Mode d'insémination		Monte naturelle (MN)	
<b>Gestion des vêlages</b>			
Box de vêlage durant la période de stabulation		Non, vaches à l'attache	
Hygiène du box de vêlage (paillage, défumage, désinfection)		Paillage abondant au moment du vêlage	
Surveillance de la prise colostrale		Fait téter le veau dès que possible	
Temps que passe le nouveau-né exclusivement avec sa mère		12 - 24 heures	
<b>Traitements systématiques</b>			
Vermifugation		Strongles / douves (Ivomec®)	
Vaccinations		IBR, Rispoval®RSPi3 intranasal, Cloxavax	
<b>Gestion de l'environnement en stabulation</b>			
Paillage des stabulations (kg/m <sup>2</sup> )		?	
Surface disponible par animal		?	
Fréquence de défumage		quotidien	
Désinfection / vide sanitaire		Annuel : curage + nettoyage (pas de désinfection)	
<b>Paratuberculose</b>			
Apparition de résultats positif/ douteux		2008	
Présence de symptômes cliniques (diarrhées, amaigrissements)		Oui, 2013 : 2 Limousines : non testées / abattoir en Mars 2013 1 Normande (N°4973) : non testée 1 Montbéliarde (N° 6900)	

**Tableau 26. Synthèse des réponses au questionnaire dans les élevages A et B (1/2)**

ELEVAGE		A		B	
<b>Cheptel</b>					
		Mères	Taureaux	Mères	Taureaux
2011		92	2	87	7
2012		92	3	86	6
2013		88	3	88	6
Date entrée au Herd Book Limousin		1988		1992	
Fréquence des contrôles paratuberculose (sérologie)		Annuel		Annuel	
<b>Conduite du troupeau</b>					
Période de sortie des animaux en pâtures		Avril - Novembre		Avril - Novembre	
Lieu de vie des jeunes jusqu'à la sortie de l'élevage		Avec les mères		Stabulation ou extérieur	
Lieu de vie des génisses de renouvellement		Avec les mères		Extérieur et stabulation en hiver	
Utilisations de nourrices		Oui (10 Montbéliardes)			
Age de vente	Femelles	Boucherie Reproduction (±pleine) : > 1 an		Gravides : 3 ans	
	Mâles	Boucherie : 4 - 5 mois Broutards : 6 - 7 mois Reproduction : > 1 an		Broutards : 7 mois	
<b>Gestion des introductions</b>					
Animaux introduits en 2011 2012 2013 et statuts sanitaires des élevages d'origine des animaux		Achats dans des élevages qualifiés IBR et supposés indemnes de paratuberculose Entre 2007 et fin 2012 : 7 nourrices et 12 limousines, dont 1 taureau		Achats de 6 taureaux depuis 2011 issus d'élevages supposés indemnes en paratuberculose	
Contrôles fait à l'introduction		IBR/leucose/brucellose/ paratuberculose		IBR/leucose/brucellose paratuberculose/BVD/tuberculose	
Mise en place d'une quarantaine		Non		Oui (2 mois dans un bâtiment isolé)	
<b>Gestion de la reproduction</b>					
Age au premier vêlage		3 ans		3 ans	
Répartition des naissances au cours de l'année		Septembre - Décembre		Septembre - Décembre	
Mode d'insémination		40 % IA 60 % MN		50 % IA (puis retours MN) 50 % MN	

**Tableau : synthèse des réponses au questionnaire dans les élevages A et B (2/2)**

ELEVAGE		A	B
<b>Gestion des vêlages</b>			
Box de vêlage		Vêlages à l'extérieur	Vêlages à l'extérieur en majorité
Hygiène du box de vêlage (paillage, défumage, désinfection)		-	Pas de curage, ni de désinfection entre chaque utilisation
Surveillance de la prise colostrale		?	Surveillance des premières tétées dès que possible
Temps moyen que passe le nouveau-né avec sa mère		15 jours	7 jours
<b>Traitements systématiques</b>			
Vermifugation		Ivomec® à l'automne (jeunes à partir de 3 mois)	Ivomec® et Zanil® 1 fois par an sur tout le troupeau
Vaccination		Veaux fin de l'automne : Bovilis®Bovigrip, Vecoxan®, Entéro-toxémie	Reproductrices : BVD Veaux : Bovilis®Bovigrip Vaches : ?
<b>Gestion de l'environnement</b>			
Paillage des stabulations (kg/m <sup>2</sup> )		Quotidien (1 kg / m <sup>2</sup> )	Quotidien (0,4 kg/m <sup>2</sup> )
Surface disponible par animal		9,6 m <sup>2</sup> ou 7,5 m <sup>2</sup>	14 m <sup>2</sup> / couple
Fréquence de défumage		3 fois par an	3 fois par an
Désinfection / vide sanitaire		1 fois par an (curage total ± désinfection)	1 fois par an (curage total, pas de désinfection)
<b>Paratuberculose</b>			
Apparition de résultats non-négatifs durant les contrôles annuels		2013	2010
Historique des résultats non-négatifs en ELISA IDEXX® et contrôles PCR			
2010		0	1 vache positive, PCR négative
2011		0	1 vache positive, PCR négative
2012	Négatif mais dans «la zone d'incertitude du résultat positif »		4, PCR négatives
	Douteux		0
	Positif		0
2013	Négatif mais dans «la zone d'incertitude du résultat positif »	0	4, PCR négatives
	Douteux	1	1, PCR négative
	Positif	3	2, PCR négatives
Présence de symptômes cliniques (diarrhée, amaigrissement)		Non	Non
Gestion des animaux positifs		Boucherie	Boucherie (2011 et 2012)
Gestion des animaux douteux			Boucherie (2011, 2012) Conservés à partir de 2013



**ANNEXE 7 : RESULTATS DES TESTS POUR LE TROUPEAU AVEC DE LA PARATUBERCULOSE ENDEMIQUE**

**Tableau 27. Résultats des tests au sein du troupeau avec de la paratuberculose endémique (1/3)**

Identification des animaux	qPCR avec ADIAFILTER® (Ct 38)	qPCR (sans enrichissement) (Ct 40)	Culture (Mélange de 10)	Sérologie IDScreen®				Sérologie IDEXX®				IFN-γ IDve		Mélanges culture
				Lot 602 (lot actuel)		Lot 445 (ancien lot)		Lot 3031 (lot actuel)		Lot 3283 (lot actuel)		S/P%	Statut	
				S/P%	Statut	S/P%	Statut	S/P%	Statut	S/P%	Statut			
5279	Neg	Neg	Neg	16	Neg	19	Neg	2	Neg	3	Neg	-1	Neg	Pool 1
0159	Neg	Neg	Neg	24	Neg	15	Neg	4	Neg	2	Neg	-1	Neg	
8400	Neg	Neg	Neg	18	Neg	31	Neg	8	Neg	10	Neg	-3	Neg	
0105	28,78	Neg	Neg	12	Neg	15	Neg	1	Neg	1	Neg	0	Neg	
5350	36,54	Neg	Neg	19	Neg	37	Neg	4	Neg	5	Neg	-1	Neg	
0392	-	Neg	Neg	12	Neg	18	Neg	3	Neg	4	Neg	-2	Neg	
2698	23,68	Neg	Neg	6	Neg	16	Neg	2	Neg	1	Neg	-3	Neg	
0900	Neg	Neg	Neg	8	Neg	11	Neg	7	Neg	9	Neg	4	Neg	
9739	Neg	Neg	Neg	45	Neg	50	Neg	21	Neg	27	Neg	2	Neg	
7088	36,46	Neg	Neg	16	Neg	21	Neg	12	Neg	12	Neg	-1	Neg	
7100	22,28	22,94	POS	285	POS	325	POS	297	POS	253	POS	0	Neg	Pool 2
5555	34,99	Neg	POS	36	Neg	19	Neg	6	Neg	5	Neg	1	Neg	
7111	Neg	Neg	POS	17	Neg	15	Neg	6	Neg	6	Neg	0	Neg	
7085	Neg	Neg	POS	10	Neg	12	Neg	3	Neg	3	Neg	-2	Neg	
1451	Neg	Neg	POS	11	Neg	23	Neg	4	Neg	2	Neg	0	Neg	
9778	Neg	Neg	POS	18	Neg	16	Neg	13	Neg	8	Neg	-1	Neg	
1895	Neg	Neg	POS	12	Neg	16	Neg	6	Neg	3	Neg	-3	Neg	
4973	Neg	Neg	POS	12	Neg	18	Neg	2	Neg	3	Neg	-2	Neg	
4217	30,15	Neg	POS	10	Neg	17	Neg	2	Neg	3	Neg	3	Neg	
3439	Neg	Neg	POS	23	Neg	20	Neg	8	Neg	13	Neg	0	Neg	

Tableau : résultats des tests au sein du troupeau avec de la paratuberculose endémique (2/3)

Identification des animaux	qPCR avec ADIAFILTER® (Ct 38)	qPCR (sans enrichissement) (Ct 40)	Culture (Mélange de 10)	Sérologie IDScreen®				Sérologie IDEXX®				IFN-γ IDve		Mélanges culture
				Lot 602 (lot actuel)		Lot 445 (ancien lot)		Lot 3031 (lot actuel)		Lot 3283 (lot actuel)				
				Statut	Statut	S/P%	Statut	S/P%	Statut	S/P%	Statut	S/P%	Statut	
1092	Neg	Neg	POS	16	Neg	19	Neg	7	Neg	9	Neg	-3	Neg	Pool 3
8512	Neg	Neg	POS	14	Neg	19	Neg	11	Neg	22	Neg	-6	Neg	
5549	Neg	Neg	POS	21	Neg	22	Neg	27	Neg	25	Neg	-5	Neg	
5058	Neg	Neg	POS	24	Neg	30	Neg	10	Neg	24	Neg	-3	Neg	
5091	Neg	Neg	POS	16	Neg	16	Neg	4	Neg	2	Neg	2	Neg	
6866	Neg	Neg	POS	14	Neg	12	Neg	3	Neg	2	Neg	0	Neg	
1467	32,79	32,88	POS	272	POS	235	POS	210	POS	166	POS	16	Neg	
5568	Neg	Neg	POS	11	Neg	17	Neg	1	Neg	2	Neg	-1	Neg	
6870	Neg	Neg	POS	12	Neg	18	Neg	2	Neg	1	Neg	0	Neg	
6907	Neg	Neg	POS	20	Neg	18	Neg	5	Neg	4	Neg	-2	Neg	
5550	34,82	Neg	POS	14	Neg	14	Neg	2	Neg	1	Neg	-1	Neg	Pool 4
5095	Neg	Neg	POS	17	Neg	43	Neg	3	Neg	95	POS	-1	Neg	
9751	Neg	Neg	POS	16	Neg	18	Neg	7	Neg	8	Neg	0	Neg	
0252	Neg	Neg	POS	22	Neg	32	Neg	15	Neg	14	Neg	-3	Neg	
0397	Neg	Neg	POS	26	Neg	29	Neg	6	Neg	5	Neg	-3	Neg	
1442	Neg	Neg	POS	17	Neg	29	Neg	4	Neg	5	Neg	-11	Neg	
8475	Neg	Neg	POS	17	Neg	16	Neg	3	Neg	4	Neg	1	Neg	
1011	Neg	Neg	POS	11	Neg	15	Neg	7	Neg	3	Neg	0	Neg	
6910	27,74	26,8	POS	263	POS	178	POS	156	POS	118	POS	64	POS	
1446	Neg	Neg	POS	13	Neg	21	Neg	6	Neg	11	Neg	-2	Neg	



Tableau : résultats des tests au sein du troupeau avec de la paratuberculose endémique (3/3)

Identification des animaux	qPCR avec ADIAFILTER® (Ct 38)	qPCR (sans enrichissement) (Ct 40)	Culture (Mélange de 10)	Sérologie IDScreen®				Sérologie IDEXX®				IFN-γ IDve		Méélanges culture
				Lot 602 (lot actuel)		Lot 445 (ancien lot)		Lot 3031 (lot actuel)		Lot 3283 (lot actuel)		S/P%	Statut	
				S/P%	Statut	S/P%	Statut	S/P%	Statut	S/P%	Statut			
1013	Neg	Neg	POS	14	Neg	19	Neg	4	Neg	5	Neg	-1	Neg	Pool 5
5552	Neg	Neg	POS	13	Neg	15	Neg	4	Neg	4	Neg	-1	Neg	
8465	Neg	Neg	POS	32	Neg	28	Neg	10	Neg	11	Neg	1	Neg	
7092	Neg	Neg	POS	14	Neg	25	Neg	5	Neg	9	Neg	2	Neg	
7132	Neg	Neg	POS	13	Neg	10	Neg	3	Neg	2	Neg	-1	Neg	
7121	Neg	Neg	POS	16	Neg	23	Neg	7	Neg	8	Neg	-1	Neg	
6900	Neg	Neg	POS	14	Neg	21	Neg	30	Neg	33	Neg	-1	Neg	
1017	Neg	Neg	POS	11	Neg	16	Neg	1	Neg	3	Neg	-1	Neg	
8462	Neg	Neg	POS	24	Neg	17	Neg	9	Neg	10	Neg	-3	Neg	
1009	Neg	Neg	POS	13	Neg	12	Neg	1	Neg	2	Neg	40	POS	
1460	Neg	Neg	Neg	14	Neg	16	Neg	3	Neg	4	Neg	-6	Neg	Pool 6
5541	Neg	36	Neg	18	Neg	18	Neg	9	Neg	6	Neg	28	Neg	
5540	Neg	Neg	Neg	16	Neg	15	Neg	8	Neg	2	Neg	6	Neg	
8450	Neg	Neg	Neg	72	POS	45	Neg	25	Neg	28	Neg	0	Neg	
1816	Neg	Neg	Neg	26	Neg	34	Neg	5	Neg	6	Neg	-3	Neg	
8456	Neg	Neg	Neg	11	Neg	21	Neg	3	Neg	5	Neg	-11	Neg	
6424	Neg	Neg	Neg	11	Neg	15	Neg	5	Neg	5	Neg	-1	Neg	
1456	-	-	-	278	POS	308	POS	263	POS	201	POS	6	Neg	
7098	Neg	Neg	Neg	27	Neg	27	Neg	11	Neg	12	Neg	2	Neg	
7099	Neg	Neg	Neg	18	Neg	18	Neg	3	Neg	2	Neg	-3	Neg	

NOM : BRUGEL

PRENOM : Charlotte

**TITRE : Interprétation des réponses sérologiques non-négatives vis-à-vis de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) dans des situations de faible prévalence de l'infection.**

RESUME : La spécificité des tests sérologiques pour la paratuberculose bovine est considérée comme élevée. L'objectif de cette étude a été de mieux définir la spécificité des tests sérologiques au sein de trois élevages régulièrement contrôlés et négatifs jusqu'alors pour la paratuberculose, dans lesquels des résultats non-négatifs sont apparus récemment.

Suite à l'identification du problème, un dépistage exhaustif a été réalisé l'année suivante au sein de ces troupeaux à l'aide de deux troussees commerciales ELISA (ID.vet et IDEXX), un test interféron-gamma, et la recherche directe de *Map* avec deux protocoles de PCR quantitative et une coproculture de mélange (n = 10 échantillons). Les résultats des ELISA se sont révélés incohérents au cours du temps et entre les troussees commerciales, suggérant que la réponse sérologique détectée n'est pas spécifique de *Map*.

Les résultats sérologiques non-négatifs au sein de troupeaux supposés indemnes de paratuberculose doivent être interprétés avec prudence, et nécessitent une confirmation par qPCR avec une étape de centrifugation préalable de l'échantillon de fèces.

MOTS-CLES : paratuberculose, bovin, spécificité, ELISA

---

**TITLE: Interpretation of non-negative serological results towards *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) in a situation of low prevalence.**

ABSTRACT: Serological assays for paratuberculosis in cattle are considered to have a high specificity. The aim of the study was to define the specificity of serological assays in three paratuberculosis-free herds where non-negative serology results were recently observed.

After identification of the problem, a whole herd screening was done the year after, using two commercial ELISA (IDEXX, and ID-Vet), two quantitative PCR assays on feces, an interferon-gamma assay, and culture on pooled feces (n = 10 samples). The results of the ELISA did not correlate over time and between the commercial kits, indicating that the non-negative results were assay-dependent and not *Map*-specific.

In herds with a *Map*-free status, non-negative serological results should be considered with caution and need confirmation using cross-comparison with PCR assays and prior concentration of the fecal sample.

KEY WORDS: paratuberculosis, cattle, specificity, ELISA