



## 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 : 17628

**To cite this version :**

Hugnet, Josselin. *Concordance entre deux troussees sérologiques dans le diagnostic de la paratuberculose ovine : éléments de description à partir de 14 élevages du Lot (France)*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2017, 62 p.

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

# CONCORDANCE ENTRE DEUX TROUSSES SÉROLOGIQUES DANS LE DIAGNOSTIC DE LA PARATUBERCULOSE OVINE : ÉLÉMENTS DE DESCRIPTION À PARTIR DE 14 ÉLEVAGES DU LOT

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

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

*par*

**HUGNET Josselin**  
Né, le 11/11/1991 à THIONVILLE (57)

---

**Directeur de thèse : M. Fabien CORBIERE**

---

## JURY

PRESIDENT :  
**M. Bruno MARCHOU**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :  
**M. Fabien CORBIERE**  
**M. Renaud MAILLARD**

Maître de Conférences 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 VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

**Directrice** : **Madame Isabelle CHMITELIN**

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MILON Alain**, *Microbiologie moléculaire*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 1° CLASSE**

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

**PROFESSEURS 2° CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*

## PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

## MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*  
Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*  
Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **DOSSIN Olivier**, *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. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*  
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*  
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

## MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*  
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*  
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*  
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*  
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*  
Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*  
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*  
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*  
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*  
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*  
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*  
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*  
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*  
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*  
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
Mme **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)*  
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*  
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

## ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*  
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*  
Mme **SABY-CHABAN Claire**, *Gestion de la santé des troupeaux bovins*



## REMERCIEMENTS

### **A notre 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 de notre jury de thèse,

Hommages respectueux.

A Monsieur le Docteur Fabien CORBIERE,

*Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse*

*Pathologie des Ruminants,*

Pour m'avoir confié ce sujet de thèse et l'avoir encadré, pour toute l'aide apportée pendant la réalisation de ce travail,

Sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Renaud MAILLARD,

*Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse*

*Pathologie des Ruminants*

Qui nous fait l'honneur de participer à notre jury de thèse

Sincères remerciements.

### **Aux personnes nous ayant aidé lors de la réalisation de nos expériences :**

Au Dr Yoann MATHEVON pour son encadrement et son aide dans la réalisation de nos expériences.

Sincères remerciements

A Marie BARTOLI et Clotilde MONTOUROY, pour l'aide précieuse apportée dans la réalisation de nos expériences.

Sincères remerciements





## SOMMAIRE

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	9
LISTE DES ABREVIATIONS.....	10
INTRODUCTION.....	11
I. PREMIERE PARTIE : Généralités sur la paratuberculose ovine.....	12
I.1. Contexte actuel.....	12
I.1.1. Répartition géographique.....	12
I.1.2. Prévalence de la maladie.....	13
I.1.3. Impact économique.....	13
I.2. Description de la maladie.....	14
I.2.1. Agent causal.....	14
I.2.2. Aspect clinique et lésionnel.....	14
I.2.2.1. Phases de la maladie.....	14
I.2.2.2. Lésions macroscopiques.....	15
I.2.2.3. Lésions microscopiques .....	16
I.2.3. Epidémiologie.....	17
I.2.3.1. Sources de contamination.....	17
I.2.3.2. Contamination de l'animal.....	18
I.2.3.3. Contamination du troupeau.....	18
I.2.3.4. Facteurs de réceptivité et de sensibilité.....	19
I.2.4 Pathogénie et immunité.....	19
I.3. Examens de laboratoire pour le diagnostic de la paratuberculose.....	20
I.3.1. Méthodes de dépistage direct.....	21
I.3.1.1. La coproculture.....	21
I.3.1.2. La PCR quantitative (qPCR) .....	22
I.3.2. Méthodes de dépistage indirect.....	24
I.3.2.1. Mesure de la réponse cellulaire .....	24
I.3.2.2. Mesure de la réponse humorale.....	25
I.3.3. Tableau bilan.....	27
II. DEUXIEME PARTIE : Etude expérimentale.....	27
II.1. Matériel et méthodes.....	27
II.1.1. Elevages, effectifs et prélèvements.....	27
II.1.2. Evaluation du statut sérologique par ELISA.....	28
II.1.3. Evaluation de l'excrétion de <i>Map</i> par qPCR.....	30
II.2. Résultats.....	32
II.2.1 Tests sérologiques ELISA.....	32
II.2.1.1. Répartition des valeurs S/P.....	32
II.2.1.2. Séroprévalence apparente globale.....	35
II.2.1.3. Séroprévalence apparente intra élevage.....	35
II.2.1.4. Résultats douteux.....	37
II.2.2 Discordances entre les différents tests ELISA.....	38
II.2.2.1. Résultats généraux.....	38
II.2.2.2. Comparaison des tests ELISA deux à deux.....	39
II.2.2.3. Discordances intra élevages.....	41
II.2.2.4. Comparaison entre les valeurs S/P des résultats discordants et celles des résultats concordants.....	42

II.2.3. Test de détection directe de <i>Map</i> par qPCR.....	43
II.2.3.1. Résultats généraux.....	43
II.2.3.2. Discordance entre les tests ELISA et la qPCR.....	44
II.2.3.3. Relation entre la valeur du Ct de la qPCR et les valeurs S/P des tests ELISA.....	45
II.2.3.4. Relation entre le statut PCR et la concordance des tests ELISA.....	47
II.3 Discussion.....	49
II.3.1. Matériel et méthodes.....	49
II.3.2. Résultats.....	49
II.3.2.1. Prévalence.....	49
II.3.2.2. Discordances entre les résultats des différents tests ELISA...	49
II.3.2.3. Discordances entre les résultats des tests ELISA et de la PCR.....	52
CONCLUSION.....	54
BIBLIOGRAPHIE.....	56
ANNEXE : Protocole des tests ELISA.....	61

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### Figures

Figure 1 : pourcentage des cheptels ovins connus infectés en France de 1996 à 2006.....	12
Figure 2 : résultats de PCR en temps réel sur LightCycler.....	23
Figure 3 : Répartition des valeurs S/P pour les 3 trousse ELISA testées.....	32
Figure 4 : Comparaison des séroprévalences apparentes en fonction du nombre de tests positifs considérés.....	36
Figure 5 : Séroprévalence apparente selon les 3 trousse ELISA dans chacun des élevages de notre étude.....	37
Figure 6 : Comparaison des prévalences données par les 4 tests.....	44

### Tableaux

Tableau 1 : Type, description et localisation des lésions de <i>Map</i> .....	17
Tableau 2 : Stades de développement de la maladie après infection orale par <i>Map</i> .....	20
Tableau 3 : Comparaison des différents tests de dépistage, d'après AFFSA (2009).....	27
Tableau 4 : Nombre d'animaux prélevés par élevage.....	28
Tableau 5 : Seuil d'interprétation des 3 trousse ELISA utilisées.....	30
Tableau 6 : Critères de validité de la qPCR.....	30
Tableau 7 : Distribution des valeurs S/P des résultats positifs.....	34
Tableau 8 : Distribution des valeurs S/P des résultats négatifs.....	35
Tableau 9 : Résultats des 3 trousse ELISA.....	35
Tableau 10 : Valeurs de séroprévalence apparente intra élevage.....	36
Tableau 11 : Répartition des résultats douteux.....	37
Tableau 12 : Répartition des résultats positifs à au moins un test ELISA.....	39
Tableau 13 : Comparaison deux à deux des trousse ELISA.....	39
Tableau 14 : Détail des résultats discordants pour chacun des 3 tests.....	40
Tableau 15 : Répartition des résultats discordants entre les élevages.....	41
Tableau 16 : Comparaison des S/P moyennes des résultats positifs.....	42
Tableau 17 : Comparaison des S/P moyennes des résultats négatifs.....	43
Tableau 18 : Répartition des résultats qPCR positifs.....	44
Tableau 19: Répartition des résultats qPCR négatifs.....	45
Tableau 20 : Répartition des résultats selon leur statut ELISA et qPCR.....	45
Tableau 21 : Concordance des résultats ELISA selon leur statut PCR.....	47

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

CN : contrôle négatif

CP : contrôle positif

Ct : Treshold Cycle ou Cycle seuil

dNTPs : désoxyribonucléotides-Tri-Phosphate

DO : densité optique

Dtx : Douteux

ELISA : Absorbed Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

FNGDS : Fédération Nationale des Groupements de Défense Sanitaire

IC : intervalle de confiance

*Map* : *Mycobacterium avium* sbsp. *paratuberculosis*

PCR : Polymerase Chain Reaction

qPCR : quantitative real time Polymerase Chain Reaction

S/P : Sample/Positive ou rapport de la densité optique de l'échantillon sur la densité optique du contrôle positif

UFC : Unité Formant Colonie

## INTRODUCTION

La paratuberculose ou maladie de Johne est une maladie due à *Mycobacterium avium* sbsp. *paratuberculosis* (*Map*), présente dans de nombreux pays et touchant en particulier les ruminants d'élevage. Elle est caractérisée par une entérite granulomateuse chronique à l'origine chez les ovins de baisses de production et d'une perte de poids progressive malgré un appétit conservé.

Les symptômes étant particulièrement frustes et n'apparaissant que tardivement (1,5 à 2 ans minimum après infection), le diagnostic de l'infection est difficile et ne peut être confirmé que grâce à des examens de laboratoire ou une autopsie.

Le test diagnostic employé aujourd'hui le plus souvent en première intention est le test sérologique ELISA de par sa praticité d'utilisation, la rapidité d'obtention des résultats et son faible coût.

Cependant des résultats discordants entre troupes sérologiques sont régulièrement décrits chez les bovins (Brugel, 2014) à la fois au sein de troupeaux ayant un historique de paratuberculose (Dieguez *et al.* 2009, Mc Kenna *et al.* 2005) et au sein de troupeaux indemnes (Collins *et al.* 2005). Ces résultats discordants peuvent avoir des conséquences importantes, en particulier dans une logique de qualification de troupeaux à faible risque d'être infectés. Bien que des discordances soient parfois rapportées chez les ovins, aucune étude n'a été publiée sur des effectifs suffisamment importants dans cette espèce pour permettre d'évaluer leur fréquence.

L'objectif de notre étude était donc de comparer les résultats sérologiques obtenus à partir de 2 troupes sérologiques du commerce sur un échantillon de plus de mille brebis provenant de 14 élevages du Lot infectés par la paratuberculose, afin (i) d'évaluer si ces résultats discordants n'apparaissent que ponctuellement ou sont au contraire fréquents et (ii) de caractériser ces résultats selon le statut excréteur ou non des animaux.

Notre rapport suit un plan en deux parties. La première partie est une revue bibliographique rapide de la paratuberculose ovine et des moyens diagnostiques disponibles à l'heure actuelle. La seconde partie présente le matériel et les méthodes utilisés dans notre étude ainsi que nos principaux résultats.

## I. PREMIERE PARTIE : Généralités sur la paratuberculose ovine

### I.1. Contexte actuel

#### I.1.1. Répartition géographique

La paratuberculose ovine est une maladie à répartition mondiale que l'on retrouve notamment en Nouvelle-Zélande, en Australie, en Amérique du Nord et en Europe, particulièrement dans les pays d'Europe du Nord (France, Royaume Uni, Pays-Bas, Belgique, Scandinavie, ...).

En France, selon une étude réalisée par la Fédération Nationale des Groupements de Défense Sanitaire (FNGDS), en octobre 2004 (Petit, 2006), la majorité des départements touchés se trouve au sud d'une ligne Bordeaux - Lyon.

La paratuberculose a donc un impact marqué dans le Sud - Ouest où l'élevage ovin est particulièrement développé, le taux de cheptels infectés dépassant parfois les 10% (Figure 1).

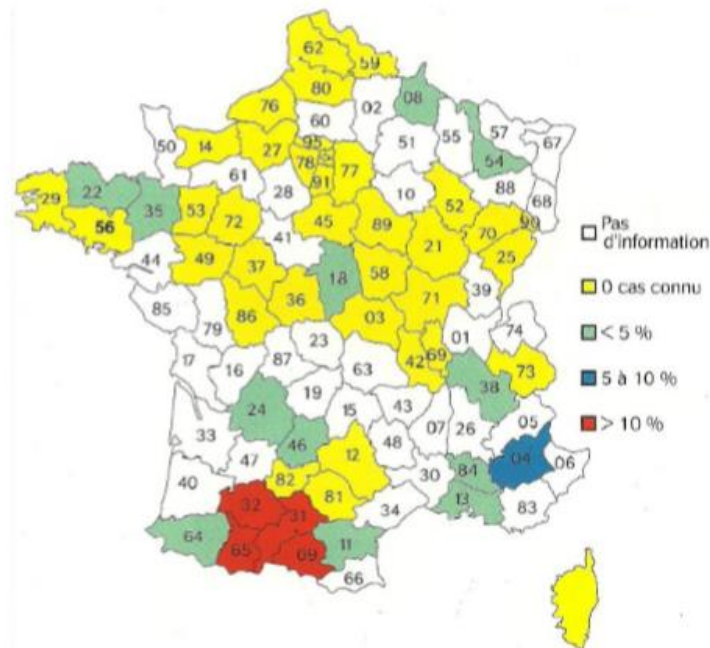


Figure 1 : pourcentage des cheptels ovins connus infectés en France de 1996 à 2006 (Résultats d'une enquête GDS sur la paratuberculose, Le Point Vétérinaire, Hervé Petit, 2006)

Il ne faut cependant pas négliger le fait que 43% des départements ne déclarent aucune information sur la paratuberculose ovine, les autres affirmant l'aspect incomplet de leurs connaissances. La maladie reste donc très méconnue et probablement sous-estimée en France.

### **I.1.2. Prévalence de la maladie**

En France, la seule étude sérologique à grande échelle menée chez les petits ruminants a été réalisée en 2010 sur les caprins.

L'enquête a été conduite sur 105 troupeaux et a montré une prévalence réelle des troupeaux infectés de 63% (IC à 95% [41-84]), une prévalence individuelle réelle de 7% (IC à 95% [6,1-7,0%]), et une prévalence intra-troupeau moyenne (calculée dans les troupeaux ayant au moins une brebis séropositive) de 11,1% (Mercier *et al.*, 2010).

Plusieurs autres études ont été réalisées pour évaluer la prévalence de l'infection par *Map* en Europe mais les comparaisons sont difficiles du fait de protocoles et méthodes non standardisés.

Nielsen et Toft (2009) ont effectué une revue de 34 études réalisées sur la prévalence individuelle et intra-troupeaux de la paratuberculose chez les ruminants en Europe, parmi lesquelles quatre études concernaient des élevages ovins et deux des cheptels mixtes ovins-caprins. Bien que le manque de précision de la majorité des tests utilisés lors de ces études n'ait pas permis d'obtenir de résultats concluants quant à la prévalence de *Map* en Europe, les auteurs ont pu estimer à partir d'études suisses et espagnoles que plus de 20% des troupeaux de petits ruminants européens seraient infectés.

Ainsi, bien qu'aucune étude ne se soit penchée directement sur la situation des élevages ovins en France vis-à-vis de l'infection par *Map*, il semble raisonnable de penser que celle-ci n'est pas rare, voire courante.

### **I.1.3. Impact économique**

La paratuberculose a un impact économique important, essentiellement dû aux pertes liées aux conséquences cliniques de l'infection. L'animal s'amaigrit progressivement, devenant finalement, en fin d'évolution de la maladie, une non-valeur économique.

De plus, l'infection par *Map* est à l'origine d'une baisse des productions, d'un affaiblissement général des animaux à l'origine d'une hausse de la sensibilité à d'autres maladies, et souvent d'une infertilité et d'une diminution de l'espérance de vie.

A cela s'ajoutent les frais de renouvellement du troupeau et le coût des dépistages mis en place.

## **I.2. Description de la maladie**

### **I.2.1. Agent causal**

L'agent causal de la paratuberculose est une bactérie de la famille des *Mycobacteriaceae* appartenant au complexe *Mycobacterium avium* (Biet *et al.* 2014) : *Mycobacterium avium* sbsp. *paratuberculosis*, également appelé Bacille de Johne, du nom de la première personne à avoir précisément décrit la maladie.

Au sein de cette sous-espèce, deux principaux types de souches ont été décrits. Le premier (Type I, Sheep Type) est majoritairement isolé à partir d'ovins et le second (Type II, Cattle Type) à partir de bovins, de caprins et d'autres espèces. Ces deux types de souches diffèrent à la fois par des critères phénotypiques (pigmentation, vitesse de croissance, facilité de culture) et génotypiques (Fernandez *et al.* 2014).

*Mycobacterium avium* sbsp. *paratuberculosis* est un bacille Gram + de 0,5 µm sur 1,5 µm. De par sa paroi particulièrement riche en lipides, *Map* est acido-alcool résistante, propriété mise à profit pour son identification grâce à l'utilisation d'une coloration particulière, la coloration de Ziehl Nielsen.

*Map* est un parasite intracellulaire obligatoire. La bactérie est en effet incapable de produire la mycobactine, une molécule impliquée dans le transfert du fer, généralement synthétisée par les Mycobactéries et indispensable à leur croissance.

### **I.2.2. Aspect clinique et lésionnel**

#### **I.2.2.1. Phases de la maladie**

Dans la majorité des cas, la contamination des ovins intervient dès les premiers mois suivant la naissance. Il s'en suit une longue période d'incubation, de plusieurs mois à plusieurs années, au cours de laquelle l'animal est infecté mais asymptomatique et non excréteur. Aucun signe clinique n'est alors visible.

L'évolution de la paratuberculose ovine peut être divisée en 4 phases :

- La phase d'incubation : phase asymptomatique de plusieurs mois caractérisée par une absence de signes cliniques et d'excrétion de bacilles.
- La phase subclinique : débutant entre 1,5 et 2 ans après l'infection et consistant principalement en une baisse de production et une plus grande sensibilité à d'autres maladies (mammites, boiteries, ...). Lors de cette phase, certains animaux sont déjà excréteurs, le plus souvent de façon intermittente, mais leur détection est difficile du fait de l'absence de signes cliniques.



- La phase clinique : les premiers signes cliniques sont intermittents et apparaissent 2 à 10 ans après l'infection, selon la charge bactérienne lors de l'infection et les défenses immunitaires de l'individu infecté. Certains facteurs tels que le stress, les carences ou déséquilibres alimentaires et la mise bas favorisent l'expression clinique de la maladie. Chez les ovins, les manifestations cliniques apparaissent généralement à un plus jeune âge que chez les bovins (Ayele *et al.* 2001).

Les principaux signes cliniques chez les ovins sont une perte de poids progressive, liée à une perte de masse musculaire et grasseuse, sans perte d'appétit ainsi qu'une baisse de production laitière.

Contrairement aux bovins, seuls 10 à 20% des petits ruminants infectés cliniques présentent de la diarrhée (Stehman *et al.* 1996). On peut parfois observer un ramollissement des fèces mais tardif et intermittent.

Au stade clinique, les animaux excrètent le plus souvent une grande quantité de bactéries dans leurs fèces. Ils sont alors plus facilement détectables par sérologie ou coproculture.

- La phase terminale : l'animal est faible, cachectique et léthargique. Cette phase peut aboutir à la mort de l'animal par déshydratation.

Au cours de la maladie, une anémie avec diminution de l'hématocrite et du taux d'hémoglobine est observée. Une hypoprotéïnémie ainsi que des modifications du ionogramme (hypomagnésémie, hypocalcémie, hypokaliémie) peuvent également être constatées (*Rapport AFSSA sur la paratuberculose des ruminants*, Mars 2009). Cependant aucune de ces modifications n'est caractéristique de la paratuberculose.

#### **1.2.2.2. Lésions macroscopiques**

Les lésions macroscopiques se localisent principalement sur la partie terminale de l'intestin grêle, particulièrement au niveau de l'iléon, et correspondent à une entérite chronique hypertrophiante. Quelle que soit l'espèce atteinte, la paroi intestinale est épaissie, ce qui est à l'origine d'une malabsorption et du dépérissement de l'animal malade.

Le stade encéphaloïde (muqueuse intestinale présentant des bourrelets transversaux et longitudinaux non effaçables à la traction), caractéristique de la maladie chez les bovins, est particulièrement rare chez les ovins.

En revanche, chez les petits ruminants, les nœuds lymphatiques mésentériques sont couramment le siège d'une nette hypertrophie, et parfois de foyers caséux.

Chez les ovins, une coloration orange ou jaunâtre de la muqueuse intestinale peut être observée lors d'une infection par des souches de Type I (Clarke et Little, 1996).

### **I.2.2.3. Lésions microscopiques**

Deux principaux types de lésions ont été décrits lors de paratuberculose.

Les lésions multibacillaires sont caractérisées par un grand nombre de macrophages épithélioïdes contenant de nombreux bacilles acido-alcool résistants, dans la lamina propria et la sous-muqueuse de l'intestin.

Les lésions paucibacillaires sont, elles, caractérisées par un infiltrat composé principalement de lymphocytes associés à quelques macrophages et cellules géantes de Langhans. Dans ce type de lésions, très peu de bacilles sont observables.

Ces 2 types de lésions semblent être associés à des réponses immunitaires différentes. Les lésions multibacillaires sont associées à une forte concentration en anticorps et une faible réponse cellulaire alors que dans le cas des lésions paucibacillaires, on a peu d'anticorps et une forte immunité cellulaire.

Perez *et al.* (1996) ont proposé une classification précise en 3 types des lésions de paratuberculose chez les ovins. Cette classification est résumée dans le tableau 1.

Tableau 1 : Type, description et localisation des lésions de Map

Type de lésion		Description	Localisation
1		Granulome constitué de macrophages souvent associés à un petit nombre de lymphocytes et de cellules à longs noyaux (cellules endothéliales)  Aucun bacille visible	Exclusivement dans le tissu lymphoïde (plaques de Peyer iléales et nœuds lymphatiques mésentériques)
2		Granulome rond, bien délimité et en nombre variable mais jamais suffisant pour causer une entérite diffuse  <i>Map</i> parfois visible	Plaque de Peyer et muqueuse associée, nœuds lymphatiques mésentériques (moins fréquemment)
3	3 a	Granulome de plus grande taille, multifocaux  <i>Map</i> visible dans les lésions de la muqueuse	Plaques de Peyer et muqueuse intestinale (associée ou non), nœuds lymphatiques mésentériques
	3 b	Entérite granulomateuse diffuse : mosaïque de macrophages associés à quelques cellules géantes de Langhans et quelques lymphocytes  <i>Map</i> toujours visible (en plus grande quantité dans la muqueuse que dans le tissu lymphoïde)	
	3 c	Entérite granulomateuse diffuse : nombreux lymphocytes associés à des macrophages et à des cellules géantes de Langhans de plus grande taille et en plus grand nombre que dans les lésions 3b  <i>Map</i> non visible ou en faible quantité	

### I.2.3.Epidémiologie

#### I.2.3.1. Sources de contamination

Les principales sources de contamination sont les animaux infectés excréteurs et principalement leurs matières fécales.

L'excrétion de *Map* peut survenir avant même l'apparition des premiers symptômes. Les animaux excrètent d'abord uniquement quelques bactéries par grammes de fèces. Cette quantité augmente ensuite progressivement jusqu'à  $10^4$  à  $10^{10}$  UFC/g en phase clinique.

L'environnement est alors contaminé et permet la transmission de l'infection aux autres animaux du troupeau.

Les aliments, l'eau de boisson, le bâtiment et le matériel agricole sont tous susceptibles d'être contaminés et de devenir ainsi des vecteurs de la maladie (Berghaus *et al.* 2006 ; Pillars *et al.* 2009).

Les autres voies de contamination sont le lait, le colostrum et les liquides utérins de femelles infectées, mais ces voies sont d'une importance épidémiologique moindre.

### **I.2.3.2. Contamination de l'animal**

Les animaux sont principalement infectés par voie oro-fécale via l'environnement souillé par les fèces d'animaux excréteurs.

La plupart des infections ont lieu dès le plus jeune âge, l'agneau se contaminant par tétée d'une mamelle souillée par des matières fécales, ou lors d'ingestion de colostrum, de lait, d'eau ou d'aliments contaminés.

Une transmission verticale *in utero* est aussi possible (Whittington et Windsor, 2009). Peu de données sur ce mode de transmission et son importance sont disponibles chez les ovins mais une étude de Muhammed et Eliasson (1979) a montré la présence d'anticorps anti-*Map* dans le sérum d'agneaux prélevé avant toute prise colostrale. La transmission transplacentaire d'anticorps n'étant pas possible chez les ruminants, ces anticorps sont donc d'origine fœtale. De plus une étude de Verin *et al.* (2016) a révélé la présence de *Map* dans des tissus d'iléon provenant d'agneaux nés de mères infectées, séparés de leur mère à la naissance et nourris uniquement avec du colostrum et du lait provenant d'animaux non infectés, ce qui là aussi suggère une transmission *in utéro*.

Enfin la transmission pourrait également se faire par voie respiratoire, en particulier à partir de poussières contaminées par *Map* (Eisenberg *et al.* 2010).

### **I.2.3.3. Contamination du troupeau**

La paratuberculose est principalement une maladie qui s'achète. L'introduction dans un troupeau se fait par le biais d'animaux infectés asymptomatiques. L'animal infecté peut ne pas être excréteur lors de son introduction dans le troupeau mais le devenir avec la progression de la maladie. Une fois l'excrétion de bacilles dans l'environnement commencée, l'infection va se répandre, le plus souvent à bas bruit, par la contamination des jeunes animaux du troupeau.

La maladie n'est souvent détectée que plusieurs années après l'introduction du premier animal infecté, suite à l'apparition des premiers cas cliniques.

#### **I.2.3.4. Facteurs de réceptivité et de sensibilité**

Les animaux les plus sensibles à l'infection sont les nouveaux-nés et les jeunes de moins de six mois. La résistance à l'infection semble augmenter ensuite avec l'âge.

L'infection reste néanmoins possible chez les ovins à l'âge adulte comme l'ont montré Delgado *et al.* en 2013. Cependant les lésions chez les animaux infectés à l'âge adulte sont plus petites et focales que celles des agneaux infectés et elles sont de plus limitées au tissu lymphoïde intestinal. La période d'incubation est aussi plus longue chez les animaux infectés à l'âge adulte que chez ceux infectés à un jeune âge.

L'autre élément important est la dose infectante. Plus celle-ci est importante, plus les lésions seront marquées et les symptômes graves. De plus, plus la dose infectante est élevée, plus la durée de la période d'incubation de la maladie sera courte. La dose minimale infectante reste cependant inconnue à l'heure actuelle.

#### **I.2.4. Pathogénie et immunité**

La voie de contamination majeure de l'organisme est la voie orale. *Map* se localise d'abord aux amygdales et à l'intestin grêle. La bactérie est alors prise en charge par les cellules M situées au niveau des plaques de Peyer. Elle est ensuite phagocytée par les macrophages et transportée de l'épithélium intestinal vers le tissu lymphoïde et les nœuds lymphatiques locorégionaux (Sohal *et al.* 2008).

Les macrophages déclenchent alors l'activation des lymphocytes T. Deux populations de cellules T (Th1 et Th2) sont ainsi activées et vont être responsables de deux types de réactions immunitaires (humorale et cellulaire) à différents stades de l'infection (Koets *et al.* 2015).

Aux premiers stades de l'infection, une réaction immunitaire à médiation cellulaire se met en place. Cette première phase permet un relatif contrôle de l'infection. En effet la sécrétion par les lymphocytes Th1 d'interféron  $\gamma$  et d'autres protéines comme les interleukines IL-2 active les macrophages et favorise la dégradation des bacilles.

L'infection reste alors asymptomatique et les animaux non excréteurs.

Cependant avec le temps, une réponse immunitaire à médiation humorale (Th2) se développe et prend finalement, par des mécanismes mal connus, le dessus sur la réponse à médiation cellulaire. L'action des lymphocytes Th1 est inhibée et la production d'anticorps anti *Map* est activée. Cette réponse humorale est par contre impuissante contre les mycobactéries de par leur caractère intra cellulaire.

Les bactéries vont alors se multiplier et se répandre dans tout l'organisme. L'excrétion fécale devient de plus en plus importante et les premiers symptômes de la maladie peuvent apparaître.

A terme, même cette réponse immunitaire humorale peut diminuer, jusqu'à parfois atteindre le stade de l'anergie sérologique.

*Tableau 2 : stades de développement de la maladie après infection orale par Map*

<b>Événements</b>	<b>Durée après ingestion</b>	<b>Stade de l'infection</b>
Les bactéries ingérées s'attachent à la muqueuse et pénètrent dans les cellules M	Quelques heures	
Phagocytose par les macrophages	Quelques jours	Silencieuse
Réplication puis dissémination dans les macrophages		
Premières lésions focales, paucibacillaires	Quelques semaines	
Début de l'excrétion fécale	Quelques mois	Subclinique, légère excrétion fécale
Développement de la réponse humorale et diminution de la réponse cellulaire	Plusieurs années	Subclinique, forte excrétion fécale
Apparition de lésions extensives multibacillaires (ou extension des lésions paucibacillaires)		
Apparition des premiers signes cliniques		Clinique

### **I.3. Examens de laboratoire pour le diagnostic de la paratuberculose**

Chez les petits ruminants, les symptômes de la paratuberculose apparaissant tardivement et étant peu visibles et non caractéristiques, le diagnostic précoce de l'infection est très difficile à établir. Sa confirmation ne peut ainsi se faire qu'à partir d'examens de laboratoire.

Les examens de laboratoire les plus couramment réalisés aujourd'hui sont la culture fécale, la recherche du génome bactérien par PCR et la recherche d'anticorps anti-*Map* par sérologie ELISA.

La réalisation de ces trois techniques ainsi que leurs avantages et inconvénients respectifs sont explicités ci-après.

### **I.3.1.Méthodes de dépistage direct**

Le principe des méthodes de dépistage direct est de rechercher directement la bactérie ou son ADN, le plus souvent à partir d'échantillons fécaux.

La sensibilité de ces tests va donc dépendre de l'intensité de l'excrétion fécale de *Mycobacterium avium* sbsp. *paratuberculosis* et notamment du caractère intermittent de celle-ci.

#### **I.3.1.1. La coproculture**

La coproculture est un test standardisé (NF U47-103) considéré comme la méthode de référence pour la recherche de *Map*. Cependant elle ne permet de détecter les individus infectés (symptomatiques ou asymptomatiques) qu'au moment des phases d'excrétion de la bactérie. L'excrétion de la bactérie étant d'intensité variable et parfois intermittente, sa détection par cette méthode peut être limitée.

De plus, la croissance de *Map* est particulièrement lente (5 à 12 semaines) et fastidieuse, notamment pour certaines souches ovines particulièrement difficiles à cultiver.

Les milieux de culture les plus classiquement utilisés sont les milieux de Herrold et de Löwenstein-Jensen enrichis en mycobactine, facteur de croissance indispensable à *Map*. Cependant les souches ovines (souches S) sont plus difficiles à cultiver que les souches bovines et particulièrement sur milieu de Herrold. Le milieu le plus favorable à leur croissance est le milieu de Middlebrook 7H10 complémenté en mycobactine (Whittington *et al.* 2011).

Pour réaliser la culture, 1 à 2 grammes de fèces sont prélevés directement dans le rectum de l'animal. Il s'en suit une étape de mise en suspension et de décontamination de l'échantillon visant à détruire la majorité des autres micro-organismes. Les modalités de réalisation de ces étapes varient selon le milieu de culture choisi.

Le milieu de culture est ensuiteensemencé puis placé en incubation.

Chez les ovins la majorité des souches vont présenter une croissance lente et certaines seront pigmentées. Sur le milieu modifié Middlebrook 7H10, les colonies des souches ovines apparaissent convexes, molles, humides, brillantes et d'une couleur allant de blanc à chamois, très semblables à la couleur du milieu. Leur taille va de 0,5 mm (taille d'une tête d'épingle) à 1 mm, voire plus rarement 1,5 mm.

Les premières colonies de *Map* apparaissent en général après 8 et 12 semaines d'incubation. La lecture est réalisée toutes les semaines, un résultat négatif définitif ne pouvant être obtenu qu'après au moins 18 semaines d'incubation.

La sensibilité et la spécificité de ce test chez les ovins infectés par *Map* ont été estimées à respectivement 0,16 (IC à 95% [0,02-0,48]) et 0,97 (IC à 95% [0,95-0,99]) à partir d'une étude réalisée sur 368 brebis (Nielsen *et al.* 2008).

Cette méthode est donc spécifique mais très peu sensible chez les ovins.

### **I.3.1.2. La PCR quantitative (qPCR)**

La PCR est une technique d'amplification génique dont le but est de déterminer la présence ou non d'une séquence d'ADN spécifique de *Map* dans l'échantillon analysé.

Il existe de nombreux protocoles PCR permettant de détecter *Map* à partir de fèces ou dans le lait mais la séquence d'ADN recherchée est dans la majorité des cas la séquence d'insertion IS 900. Cette séquence est assez spécifique de *Map* et est répétée 14 à 18 fois dans le génome bactérien (Kim *et al.* 2002). Cependant des séquences apparentées ont été retrouvées chez d'autres espèces de mycobactéries. La spécificité du test s'en voit diminuée et l'interprétation des résultats obtenus grâce à cette méthode doit donc être faite avec précautions.

Le principe de la PCR en temps réel (ou qPCR) est le même que celui de la PCR classique (amplification par cycles d'un fragment d'ADN basée sur une réaction enzymologique) mais elle permet d'évaluer grâce à un marqueur fluorescent la quantité d'ADN cible synthétisée tout au long de la réaction.

Elle permet donc d'obtenir la cinétique complète de la réaction de polymérisation et donc une quantification de la quantité initiale d'ADN cible.

La PCR sur fèces étant la plus souvent utilisée et ayant été utilisée dans notre étude, celle-ci va maintenant être détaillée plus précisément.

Comme pour la culture fécale, la technique de PCR en temps réel sur des échantillons de fèces permet uniquement de détecter les individus excréteurs, les individus infectés mais non excréteurs ne pouvant être repérés. Elle est donc aussi dépendante de l'excrétion de *Map*, de son intermittence, de son intensité et de la répartition des bactéries dans les fèces.

La technique de PCR se déroule en plusieurs étapes : la préparation de l'échantillon, l'extraction et la purification de l'ADN, l'amplification, la lecture et enfin l'interprétation des résultats.



Là encore, 1 à 10 grammes de fèces sont prélevés directement dans le rectum des animaux, puis mis en suspension dans de l'eau déminéralisée. Le mélange est conservé toute une nuit à température ambiante, ce qui permet sa réhydratation, remélangé et laissé au repos pour permettre la sédimentation.

Les échantillons pouvant ne contenir qu'un faible nombre de bactérie, une étape de concentration et d'extraction de l'ADN bactérien est nécessaire afin d'augmenter la sensibilité de la technique. Cette extraction peut se réaliser de différentes manières : à l'aide de billes magnétiques, par dilution-centrifugation, par hybridation capture, ...

Une ribolyse des échantillons par ajout d'une protéinase K permet d'améliorer le rendement de l'extraction d'ADN. L'ADN est ensuite extrait selon des protocoles assez divers.

Une fois extrait, l'ADN est ajouté à un mélange réactionnel contenant des désoxyribonucléotides-Tri-Phosphate (dNTPs), les amorces (oligonucléotides), l'ADN polymérase et la sonde.

L'amplification se déroule en 3 étapes : la dénaturation des molécules d'ADN de l'échantillon, suivie de l'hybridation des amorces et de l'élongation des brins d'ADN complémentaires grâce à l'ADN polymérase et aux dNTPs.

Au cours de la PCR, lorsque la sonde s'hybride sur sa cible, elle est hydrolysée par l'ADN polymérase. Un signal proportionnel au nombre de sondes hydrolysées est alors émis.

Un nombre de cycles à partir duquel le produit PCR est détectable est ensuite déterminé. On parle alors de cycle seuil ou Ct (Cycle threshold). Le moment d'apparition de ce cycle seuil est dépendant de la quantité d'ADN cible initialement présente dans l'échantillon analysé. Le Ct est inversement proportionnel à la quantité d'ADN cible initialement présente.

Ce résultat est représenté graphiquement sous formes de courbes sigmoïdes comme montré sur la figure 2.

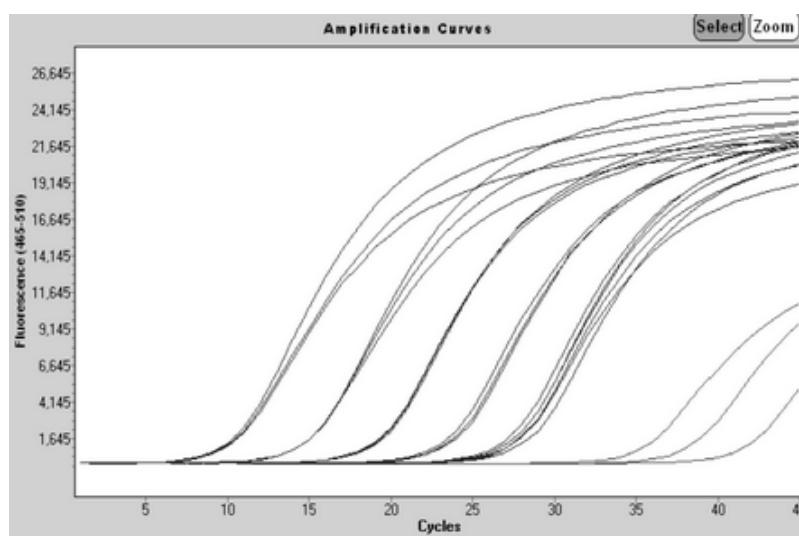


Figure 2 : résultats de PCR en temps réel sur LightCycler

Kawaji *et al.* ont montré en 2011, que la sensibilité de la qPCR était supérieure à celle de la culture fécale, et même à celle de la culture tissulaire, pour la détection de *Map* chez des brebis infectées expérimentalement. Ce résultat s'explique selon eux par le fait que la PCR peut à la fois détecter des bactéries vivantes et mortes alors que la culture n'est positive qu'à partir d'au moins 200 bactéries vivantes/g de fèces. La spécificité de la qPCR est elle aussi élevée, aucune des 20 brebis du groupe contrôle négatif n'ayant donné un résultat positif.

Bauman *et al.* (2016) ont, eux, déterminé la sensibilité et la spécificité d'une qPCR ciblant le gène *hsp-X* pour détecter la présence de *Map* dans les fèces d'ovins et de caprins infectés. Ils estiment la sensibilité de cette PCR à 42,6 (IC 95% : 28,8-63,3 %) et sa spécificité à 97,8 % (IC 95% : 93,0-99,9 %) chez les ovins, et concluent à une sensibilité significativement plus élevée mais une spécificité un peu plus faible que la culture directe utilisée en comparaison.

### **I.3.2.Méthodes de dépistage indirect**

Les méthodes de dépistage indirect sont basées sur la détection de la réponse immunitaire de l'individu infecté.

Lorsqu'un animal est infecté, l'immunité cellulaire se met en place dès le début de l'infection chez des individus encore asymptomatiques puis diminue progressivement tandis que l'immunité humorale se développe.

#### **I.3.2.1. Mesure de la réponse cellulaire**

L'immunité cellulaire peut être détectée de différentes manières et notamment par un test intradermique ou par un test interféron  $\gamma$ .

Dans le cas du test intradermique, un extrait de *Map* est injecté dans le derme de l'animal et une réaction inflammatoire est recherchée 72 h plus tard. Un renflement de la peau de 3 mm ou plus sera signe d'un test positif.

Le test interféron  $\gamma$  consiste à quantifier la réponse cellulaire en mesurant la quantité d'interféron  $\gamma$  produite par les lymphocytes en présence d'un extrait de *Map*.

Ces tests permettent de détecter précocement les animaux infectés, avant même qu'ils ne soient excréteurs, mais la réponse immunitaire cellulaire disparaissant en quelques mois, ils ne sont pas adaptés à la détection des animaux en phase clinique ou subclinique avancée.

De plus Mikkelsen *et al.* ont montré en 2009 que seulement certains veaux positifs au test interféron  $\gamma$  développaient une réponse sérologique dans les années suivantes, indiquant que la réponse cellulaire pouvait contrôler voire éradiquer la maladie chez certains animaux. Un résultat positif à un de ces tests ne donne donc pas d'indication sur le statut futur de l'animal infecté vis-à-vis de la maladie.

### **I.3.2.2. Mesure de la réponse humorale**

La réponse immunitaire humorale est mesurée par sérologie. Là encore plusieurs tests sont disponibles (ELISA indirect, fixation du complément, immunodiffusion en gélose) mais la méthode ELISA est la plus sensible et la seule utilisée en examens de routine en France à l'heure actuelle.

Le test ELISA indirect met en évidence la présence d'anticorps anti *Map* dans le sérum des animaux testés. C'est un test assez tardif, la sécrétion d'anticorps apparaissant le plus souvent après le début de l'excrétion fécale. Elle permet donc de détecter des individus excréteurs et présentant ou non des symptômes de la maladie.

En France, cinq kits ELISA indirects commerciaux sont actuellement disponibles : IDEXX Paratuberculosis Screening Ab Test ; ID Screen Paratuberculosis Indirect – IDVet ; SERELISA® M. ParaTB Ab Mono Indirect, développé par Symbotics et désormais commercialisé par Zoetis ; LSIVet Ruminant Paratuberculosis Advanced Serum ELISA et PARACHEK® 2 (Prionics) tous deux désormais commercialisés par Thermo-Fisher. Ils se différencient notamment par les antigènes de *Map* utilisés dont la nature n'est pas communiquée par les fabricants.

Le principe du test ELISA repose sur la formation et la détection de complexes immuns. Le sérum à tester, contenant potentiellement des anticorps anti *Map*, est placé dans un puits contenant des antigènes de *Map*.

Les anticorps du sérum se fixent sur les antigènes et le reste du sérum est éliminé par lavage. Un conjugué (composé à forte affinité pour les anticorps) couplé à une enzyme est ensuite ajouté dans les puits. En présence de complexes immuns, le conjugué se fixe aux anticorps. Le reste du conjugué est éliminé par lavage et le substrat de l'enzyme est ajouté dans le puits.

Si des anticorps sont présents dans le sérum testé, on a alors, fixé au fond du puits, un complexe antigène – anticorps – conjugué – enzyme. L'enzyme dégrade alors le substrat ce qui produit une réaction colorée dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'anticorps présente dans le sérum.

En l'absence d'anticorps dirigés contre *Map* dans l'échantillon le puits contient uniquement l'antigène initial et le substrat n'est pas dégradé.

La sensibilité et la spécificité des tests ELISA varient en fonction du kit utilisé mais également en fonction du statut de l'animal. En effet d'après Nielsen *et al.*, 2008, chez les ovins, la sensibilité des tests ELISA varie entre 0,36 et 0,85 chez les animaux en phase clinique mais elle n'est seulement que de 0,16 à 0,44 chez les animaux infectés (excréteurs ou non, présentant des symptômes ou non). La spécificité du test est élevée et varie elle entre 0,95 et 0,99 quelle que soit le stade de la maladie.

Un certain nombre d'études rapportent des discordances entre les résultats de trousse ELISA chez les bovins. C'est notamment le cas de Collins *et al.* (2005) qui ont comparé les résultats de 5 trousse ELISA sur des sérums de bovins issus de troupeaux atteints de paratuberculose et de troupeaux indemnes de la maladie. Les 5 tests ELISA présentent des pourcentages de concordance allant de 74,6 % à 94 % soit des pourcentages de discordance assez élevé, de 6 à 25,4 %.

Dieguez *et al* (2007) ont obtenu des pourcentages de discordance similaires en comparant 3 kits ELISA (A, B et C) sur des bovins. Sur les 326 animaux testés seuls 2 (0,6%) ont donné un résultat positif avec les 3 kits et 5 autres (1,5%) avec 2 kits. Les pourcentages de discordance entre les 3 tests sont de 24,8 % entre les tests A et B, 27,6 % entre A et C et 6,4 % entre B et C.

Enfin une étude de McKenna *et al.* (2005) a comparé les résultats de 2 kits ELISA sur des échantillons de sérums bovins américains et a obtenu 18,8 % de discordances entre les 2 kits.

Ces discordances sont donc à priori assez fréquentes chez les bovins et peuvent être problématiques notamment dans une logique de certification des élevages vis-à-vis de la paratuberculose, certains animaux pouvant donner un résultat positif avec un test ELISA et un résultat négatif avec un autre test.

Chez les ovins, aucune étude n'a été publiée sur des effectifs suffisamment importants pour permettre d'évaluer la fréquence des résultats discordants aux tests ELISA dans la détection de la paratuberculose.

### I.3.3. Tableau bilan

Tableau 3 : comparaison des différents tests de dépistage, d'après AFFSA (2009)

	Culture fécale	PCR	ELISA indirect
Dépistage des animaux infectés non excréteurs (stade précoce)	Non	Non	+/-
Dépistage des animaux infectés excréteurs asymptomatiques	++/+++ (sensibilité 10 <sup>2</sup> germes/g)	++/+++ (sensibilité supérieure à celle de la culture fécale)	++/+++
Confirmation d'une suspicion clinique	Oui	Oui	Oui (risque d'anergie sérologique)
Spécificité	+++	+++	+++
Coût moyen en France	+++ (environ 14€/animal)	+++ (22 à 28€/animal)	+ (environ 6€/animal)
Temps de réalisation	5 à 12 semaines	48h	48h
Possibilité de réalisation sur mélange	Oui	Oui, mais aucune donnée validée	Aucune donnée validée
Standardisation de la méthode ou des réactifs en France	Oui Norme U47-103	Non	Non
Contextes habituels d'utilisation	Dépistage	Dépistage ou diagnostic pour confirmation de culture ou coloration de Ziehl non concluante	Dépistage ou diagnostic en association avec un test direct

## II. DEUXIEME PARTIE : Etude expérimentale

### II.1. Matériel et méthodes

#### II.1.1. Elevages, effectifs et prélèvements

Les échantillons testés dans notre étude proviennent de 14 élevages ovins de grande taille (400 à 1000 brebis) situés dans le département du Lot. Dans tous ces élevages, la circulation de *Map*, à des degrés plus ou moins importants, a été confirmée par des résultats positifs en sérologie associés dans certains élevages à la confirmation de suspicions cliniques par autopsie et PCR. Aucun de ces élevages ne pratique de vaccination contre la maladie.

Les prélèvements ont été réalisés entre Mars 2014 et Mars 2015 sur des brebis nées dans ces élevages lors des campagnes 2011 et 2012, ayant donc entre 2 et 3 ans au moment du prélèvement.

Au vue de la taille très importante des élevages, un prélèvement de la totalité des animaux n'était pas envisageable. Un objectif d'environ une centaine de brebis par élevage a donc été fixé. Cet objectif n'a pu être atteint dans certains élevages pour lesquels l'effectif des brebis de la tranche d'âge ciblée présent en bergerie était réduit.

Au sein d'un élevage, tous les prélèvements ont été effectués le même jour. Les animaux ont été choisis au hasard parmi les brebis des cohortes de naissance concernées.

Pour chaque animal, une prise de sang sur tube sec de 5 mL a été réalisée à la veine jugulaire. Un échantillon de fèces a aussi été récupéré directement dans le rectum de l'animal à l'aide d'un gant à usage unique.

Les tubes de sang ont ensuite été centrifugés et les sérums transférés dans des plaques de 96 puits dont les plans ont été dressés à l'aide du code élevage et des numéros de travail des animaux.

Le tableau 4 donne les effectifs d'animaux dont les sérums et les fèces ont été prélevés dans chacun des 14 élevages de notre étude. Au total, l'échantillon d'étude était constitué de 1216 brebis pour lesquelles l'ensemble des résultats de sérologie étaient disponibles. Pour 1198 d'entre elles, un résultat de qPCR sur fèces a aussi été obtenu.

*Tableau 4 : Nombre d'animaux prélevés par élevage*

Élevage	AY	CB	EG	EL	FAS	GG	IS	LA	MG	PB	PI	PO	RE	TL
<b>Total</b>	59	143	71	86	68	80	92	66	93	104	95	100	78	81

### **II.1.2. Evaluation du statut sérologique par ELISA**

Le statut sérologique des brebis a été évalué à l'aide de deux trousse commerciales ELISA au laboratoire d'immunologie de l'UMR 1225 INRA/ENVIT IHAP. Pour une de ces trousse, (ID Screen Paratuberculosis Indirect, IdVet, France) deux lots de fabrication différents ont été utilisés sur l'ensemble des échantillons : IdVet lot 602 et IdVet lot 800. La deuxième trousse est la trousse Paratuberculosis Screening Ab Test (lot de fabrication 5074) du laboratoire IDEXX. Par commodités dans la suite du manuscrit, nous parlerons de 3 trousse ELISA, bien qu'il s'agisse en réalité de 2 trousse, dont l'une est représentée par 2 lots de fabrication différents, nommés ci-après IdVet 602 et IdVet 800.

Ces trousse sont des tests immunoenzymatiques visant à détecter la présence d'anticorps dirigés contre *Map* à partir d'échantillons de sérum ou de plasma de bovins et petits ruminants ou de lait de bovins.

Ils comprennent tous une plaque de 96 puits sensibilisée avec de l'extrait purifié de *Map*, sur lequel vont pouvoir se fixer des anticorps anti-antigène de *Map*, présents dans les sérums testés.

Les 4 étapes suivantes sont communes aux 3 tests :

- Pré-incubation : Les échantillons à tester sont prédilués et incubés en présence de *Mycobacterium phlei* afin de limiter d'éventuelles réactions croisées.
- Fixation de l'anticorps recherché : Les échantillons sont ensuite transférés dans la plaque sensibilisée où les anticorps spécifiques anti *Map* vont se fixer aux antigènes se trouvant au fond des puits. Les plaques sont ensuite laissées en incubation pendant 45 minutes (protocole court) ou une nuit (entre 16 et 20 heures, protocole long) à 4° C. Dans notre étude, une période d'incubation longue a été choisie afin de maximiser la sensibilité des tests.  
Après incubation un lavage des puits est réalisé pour éliminer les anticorps non fixés.
- Fixation de l'anticorps de détection : dans chaque puits est ajouté un conjugué immunoglobuline anti-ruminant couplé à une peroxydase. Ce conjugué se fixe alors sur les immuns complexes antigène – anticorps fixés au fond des puits. Là encore, après incubation, un lavage des puits est réalisé pour éliminer les anticorps non fixés.
- Révélation : le substrat de la peroxydase est alors ajouté. En présence d'enzymes, le substrat est oxydé et donne une coloration bleue qui vire au jaune après distribution de la solution d'arrêt.  
L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la quantité d'enzymes présente et donc à la quantité d'anticorps anti *Map*.

La lecture des plaques est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à deux longueurs d'onde, 450 nm et 650 nm.

Le test est validé si les 2 critères suivants sont respectés :

- la moyenne des densités optiques des 2 contrôles positifs ( $DO_{CP}$ ) est supérieure à 0,350.
- le rapport entre la moyenne des densités optiques des contrôles positifs et la moyenne des densités optiques des 2 contrôles négatifs ( $DO_{CN}$ ) est supérieure à 3,00.

La valeur S/P de chaque échantillon est alors calculée en comparant la densité optique de l'échantillon à celles des contrôles de la façon suivante :

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

L'interprétation des résultats se fait selon les seuils fixés par les fabricants comme indiqué dans le tableau 5.

Tableau 5 : Seuil d'interprétation des 3 trouses ELISA utilisées

		Trousse		
		IdVet 602	IdVet 800	IDEXX
Statut	Positif	S/P ≥ 70 %	S/P ≥ 70 %	S/P ≥ 55 %
	Douteux	60 % < S/P < 70 %	60 % < S/P < 70 %	45 % < S/P < 55 %
	Négatif	S/P ≤ 60%	S/P ≤ 60%	S/P ≤ 45%

### II.1.3. Evaluation de l'excrétion de *Map* par qPCR

Une PCR quantitative (qPCR) directe en système TaqMan a été réalisée selon le protocole fourni par Adiagene et à l'aide du kit ADIAVET.

Dans notre cas, le test repose sur l'amplification génique du segment d'ADN IS900 présent en 12 à 18 copies dans le génome de *Map*.

Avant l'étape d'amplification, les échantillons sont préparés à l'extraction puis extraits. La préparation des échantillons comporte plusieurs étapes clés :

- Réhydratation des fèces pendant une nuit
- Sédimentation de 20 min après vortex
- Concentration de l'échantillon par filtration du surnageant avec un filtre ADIAFILTER
- Centrifugation et récupération du culot
- Remise en suspension et broyage du culot obtenu
- Transfert sur plaque

Ensuite les acides nucléiques sont extraits puis purifiés. Pour cela, une étape de lyse cellulaire est réalisée à l'aide d'une protéinase K (digestion enzymatique). A cette étape, un contrôle externe d'extraction est inclus aux échantillons. Celui-ci permet de vérifier les étapes d'extraction et d'amplification pour chaque échantillon. Le test est considéré comme valide s'il répond aux caractéristiques données dans le tableau 6.

Tableau 6 : Critères de validité de la qPCR

Contrôle	Témoin négatif qPCR	Témoin positif qPCR	Témoin positif d'extraction
FAM amplification *	Non	Oui	Oui
VIC amplification **	Non	Non / Oui	Non / Oui
Critère validé	Absence de contamination pendant l'amplification	Amplification de la cible	Etapes d'amplification

\* FAM amplification : lecture entre 450 – 500 nm      \*\* VIC amplification : lecture entre 523 – 568 nm



L'extraction est ensuite entièrement réalisée par l'automate KingFisher Flex. Celui-ci va capter les acides nucléiques à l'aide de billes magnétiques (purification).

Suite à l'extraction, les extraits d'ADN peuvent être amplifiés. Pour cela, un mélange réactionnel est ajouté aux extraits d'ADN des échantillons, à la gamme (préparée à partir d'ADN pur) et aux contrôles. Puis, les échantillons sont amplifiés dans le LightCycler 480.

Cette amplification comporte, elle aussi, plusieurs étapes clés :

- la dénaturation : Les extraits d'ADN sont chauffés à 94°C, ce qui provoque la séparation des brins d'ADN
- l'hybridation : la température redescend autour de 40-65°C, ce qui provoque l'hybridation des amorces par complémentarité avec leurs séquences cibles situées sur l'ADN.
- L'élongation : la température augmente à 72°C, ce qui permet à l'enzyme Taq de synthétiser les brins d'ADN complémentaires en ajoutant des désoxynucléotides triphosphates à la suite des amorces.

Ces trois étapes (dénaturation, hybridation et élongation) correspondent à 1 cycle de PCR, à la suite duquel le nombre de fragment d'ADN cible initial est doublé. Dans notre expérience de qPCR, une quarantaine de cycles est effectuée. Après 40 cycles, notre ADN cible est donc amplifié  $2^{40}$  fois.

La PCR en temps réel ou qPCR combine par ailleurs l'amplification et la révélation des produits amplifiés grâce à la détection d'un signal fluorescent, émis à chaque cycle. Dans notre étude, nous avons utilisé le procédé TaqMan.

Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la qPCR par le logiciel du LightCycler 480 et représentent la quantité de produits amplifiés à l'instant de la mesure.

Au cours du temps, la fluorescence d'une PCR en temps réel augmente en 3 phases :

- Phase de bruit de fond : La quantité de fragment amplifié est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond. La « ligne de base » (ou « base line ») correspond à ce bruit de fond et qualifie la partie non caractéristique des courbes observées pendant les premiers cycles de l'amplification.
- Phase exponentielle : La quantité de fragment amplifié génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil. Il apparaît alors un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme le Ct (« threshold cycle » ou « cycle seuil ») et apparaît en début de phase exponentielle. Pour obtenir le Ct, une « ligne de seuil » (« threshold line ») doit être placée au-dessus de la ligne de base, de préférence au point d'inflexion de la phase exponentielle d'amplification.

- Phase de plateau (ou de saturation) : certains composants de la réaction (et en particulier le nombre de molécules de Taq disponibles) deviennent limitants. Le système ne permet plus une amplification exponentielle.

Le Ct obtenu pour chacun des échantillons est comparé au Ct du témoin positif de la PCR et le résultat exprimé est alors qualitatif (positif/négatif).

De manière générale, le Ct est inversement proportionnel à la quantité d'ADN cible présente initialement dans l'échantillon.

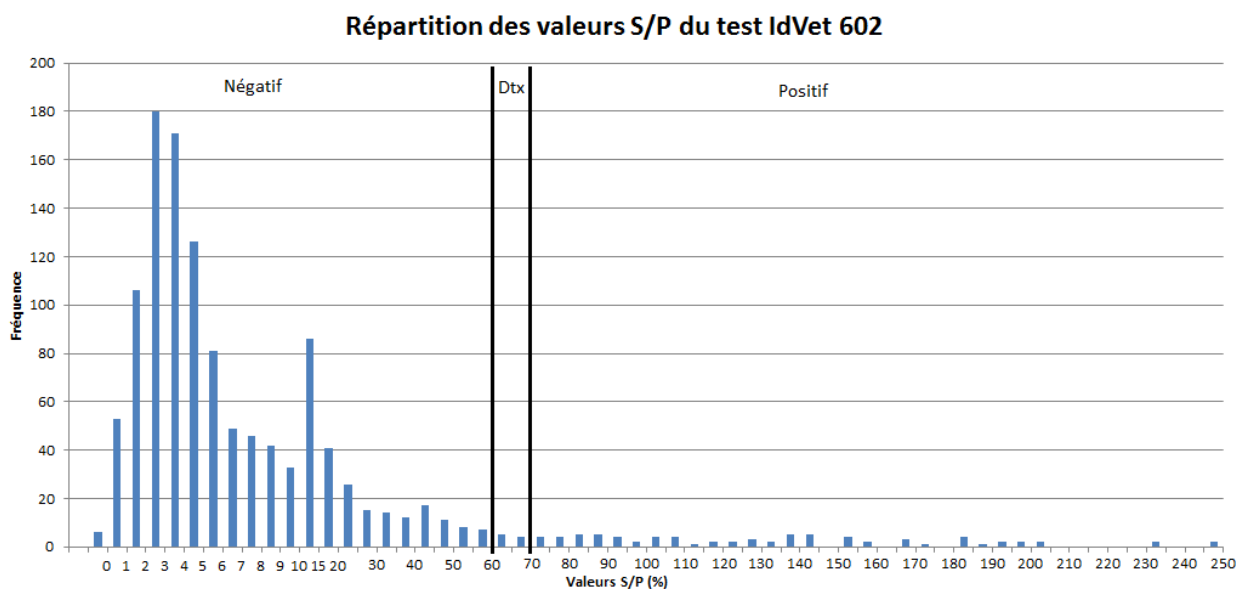
## II.2. Résultats

### II.2.1. Tests sérologiques ELISA

#### II.2.1.1. Répartition des valeurs S/P

Comme visible sur la figure 3, les valeurs S/P des 3 kits ELISA ont une répartition assez similaire, avec un pic de fréquence dans les valeurs négatives, autour de 2 – 4 %.

La répartition est par ailleurs continue jusqu'aux très fortes valeurs (200 % pour les tests IdVet, 110 % pour le test IDEXX), y compris autour des valeurs seuils fixées par les fabricants (60 et 70 % pour les kits IdVet, 45 et 55 % pour le kit IDEXX). Il n'y a donc pas, pour les trois trousse, de discrimination nette entre les résultats positifs et les résultats négatifs.



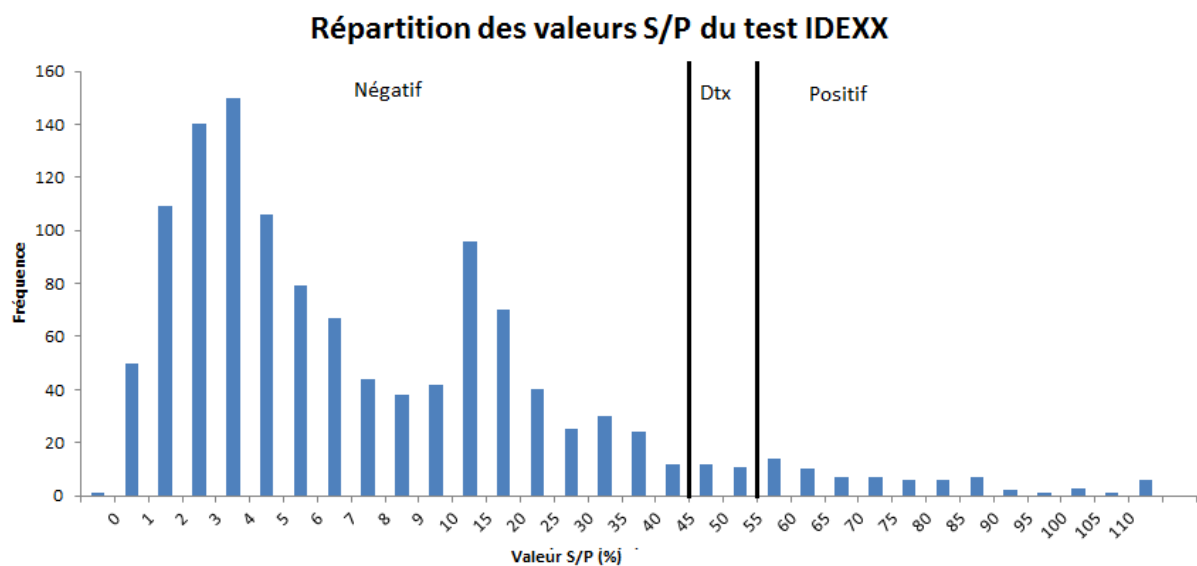
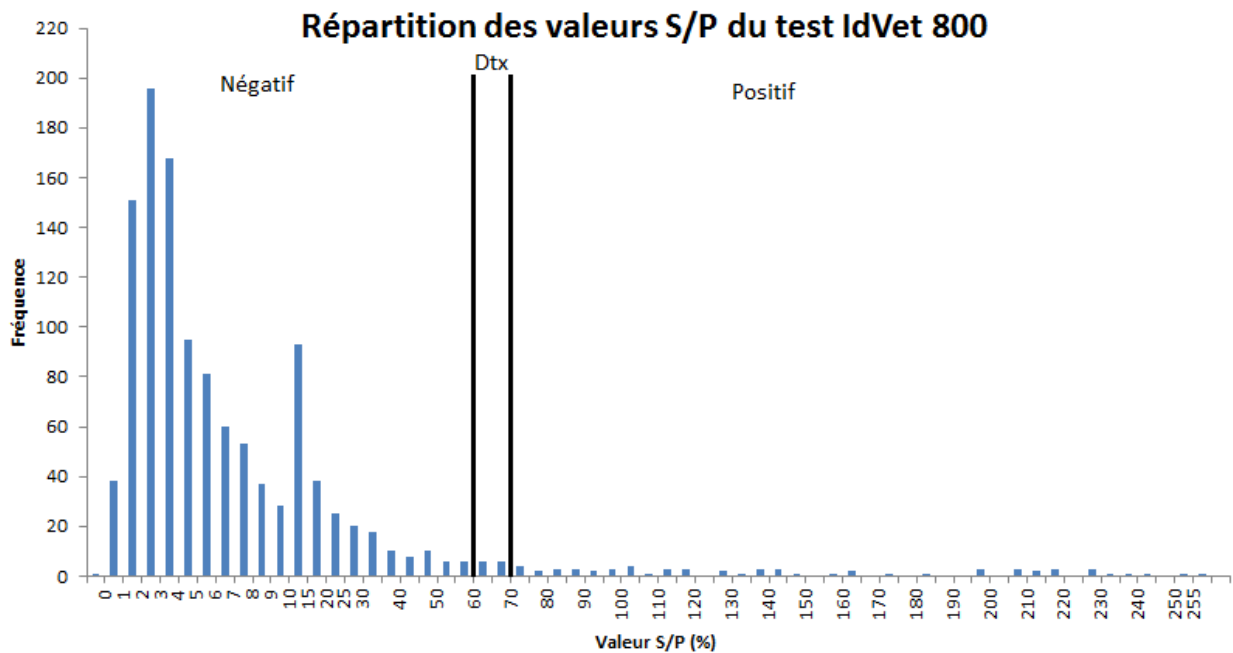


Figure 3 : Répartition des valeurs S/P pour les 3 trouses ELISA testées

En ce qui concerne les résultats positifs, comme le montre le tableau 7, les médianes des valeurs S/P positives sont, pour les 3 trouses, bien éloignées des valeurs seuil fixées par les fabricants (70 % pour les kits IdVet, 55% pour les kits IDEXX). Il en est de même pour les premiers quartiles des tests IdVet. Les résultats positifs ont donc en majorité des valeurs S/P élevées, bien supérieures aux seuils de positivité.

En ce qui concerne le test IDEXX, un quart des tests positifs ont tout de même une valeur S/P inférieure à 62,2 % et sont donc très proche du seuil de 55%.

Les valeurs seuil fixées par les fabricants étant différentes selon le test considéré, il n'est pas possible de comparer directement entre elles les valeurs des médianes et des quartiles. Ces valeurs ont donc été rapportées au seuil de positivité de leur test respectif.

Rapporté au seuil de positivité, les quartiles et la médiane du kit IDEXX sont tous inférieurs à ceux des 2 kits IdVet.

Les résultats positifs au test IDEXX sont donc généralement moins fortement positifs que ceux des 2 tests IdVet.

Par la suite, les résultats positifs dont la valeur S/P est supérieure à la médiane des S/P positives seront considérés fortement positifs. A l'inverse les résultats positifs dont la valeur S/P est inférieure à la médiane des S/P positives seront considérés faiblement positifs.

*Tableau 7 : Distribution des valeurs S/P des résultats positifs*

Trousse (seuil de positivité)	Nombre de résultats positifs	Valeur S/P (%) (Rapport entre S/P et seuil de positivité du kit)		
		1 er Quartile	Médiane	3ème Quartile
<b>IdVet 602</b> (70 %)	77	91,3 <b>(1,3)</b>	128,2 <b>(1,8)</b>	157,9 <b>(2,2)</b>
<b>IdVet 800</b> (70 %)	68	108,6 <b>(1,5)</b>	148,8 <b>(2,1)</b>	183,3 <b>(2,6)</b>
<b>IDEXX</b> (70%)	70	62,2 <b>(1,1)</b>	86,5 <b>(1,6)</b>	104,9 <b>(1,9)</b>

Nous avons fixé arbitrairement un seuil correspondant à la moitié du seuil inférieur des résultats douteux fixé par le fabricant (soit 30 % pour les kits IdVet et 22,5 % pour le kit IDEXX). Les résultats négatifs dont la valeur S/P est inférieure à ce seuil sont considérés comme fortement négatifs. Les résultats négatifs dont la valeur est comprise entre ce seuil et le seuil inférieur des résultats douteux fixé par le fabricant sont considérés faiblement négatifs. La répartition des résultats négatifs entre ces 2 catégories est donnée dans le tableau 8.

Rapporté au nombre total de tests négatifs, la proportion de résultats faiblement négatifs est significativement plus importante pour le kit IDEXX que pour les 2 kits IdVet (test exact de Fischer,  $p=2E-5$  pour IDEXX et IdVet 800 ;  $p=1,7 E-3$  pour IDEXX et IdVet 602). La différence entre les 2 kits IdVet n'est pas significative.

Tableau 8 : Distribution des valeurs S/P des résultats négatifs

Kit (Seuil Dtx/2)	Fortement négatifs (négatifs <Dtx/2) (% des négatifs totaux)	Faiblement négatifs (négatifs >Dtx/2) (% des négatifs totaux)	Négatifs totaux
<b>IdVet 602</b> (30 %)	1061 (93,9 %)	69 (6,1 %)	1130
<b>IdVet 800</b> (30 %)	1084 (94,9 %)	58 (5,1 %)	1142
<b>IDEXX</b> (22,5 %)	1014 (90,3 %)	109 (9,7 %)	1123

### II.2.1.2. Séroprévalence apparente globale

Sur les 1216 sérums testés avec les 3 kits ELISA, 40 seulement ont donné un résultat positif aux 3 tests ce qui correspond à une séroprévalence apparente de 3,3 % (40/1216).

En revanche, 105 sérums ont donné un résultat positif à au moins l'un des 3 tests ELISA. La séroprévalence apparente est alors significativement plus importante et vaut 8,6 % (105/1216,  $p=2,6 \text{ E-}8$ ).

Les résultats détaillés des 3 troussees ELISA sont donnés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Résultats des 3 troussees ELISA

	Positif	Douteux	Négatif	Total
<b>Idvet 602</b>	77 (6,3%)	9 (0,7%)	1130 (92,9%)	1216
<b>Idvet 800</b>	62 (5,1%)	13 (1,1%)	1141 (93,8%)	1216
<b>Idexx</b>	70 (5,8%)	23 (1,9%)	1123 (92,4%)	1216

En considérant les 3 kits séparément, la prévalence la plus élevée est donnée par le kit Idvet 602 avec une prévalence de 6,3 % (77/1216). La prévalence la plus faible, de 5,1 % (62/1216), est celle obtenue à l'aide du kit Idvet 800. Celle obtenue avec le kit Idexx est intermédiaire et de 5,8 % (70/1216).

### II.2.1.3. Séroprévalence apparente intra élevage

En tenant compte uniquement des brebis positives aux 3 tests, la séroprévalence apparente dans les 14 élevages de notre étude est très hétérogène et varie entre 0 % et 9,3 %. La séroprévalence apparente est alors nulle dans 2 élevages (FAS et PI).

Tableau 10 : Valeurs de séroprévalence apparente intra élevage

Élevage	Nombre de brebis			Séroprévalence apparente (%)	
	Positives aux 3 tests	Positives à au moins un test	Total	Brebis positives aux 3 tests	Brebis positives à au moins un test
AY	2	6	59	3,39	10,17
CB	3	7	143	2,10	4,90
EG	1	1	71	1,41	1,41
EL	8	14	86	9,30	16,30
FAS	0	1	68	0,0	1,47
GG	2	9	80	2,5	11,25
IS	7	16	92	7,61	17,39
LA	2	8	66	3,03	12,12
MG	2	12	93	2,15	12,90
PB	5	15	104	4,81	14,42
PI	0	4	95	0,0	4,21
PO	3	4	100	3,00	4,00
RE	3	5	78	3,85	6,41
TL	2	3	81	2,47	3,70

En revanche, lorsque l'on tient compte de toutes les brebis positives à au moins un test, la prévalence apparente augmente dans tous les élevages (à l'exception d'un seul où une seule brebis a été détectée positive et a donné un résultat positif aux 3 tests) (figure 4). Elle varie alors entre 1,41 % et 17,39 % et plus aucun élevage n'a alors de séroprévalence apparente nulle.

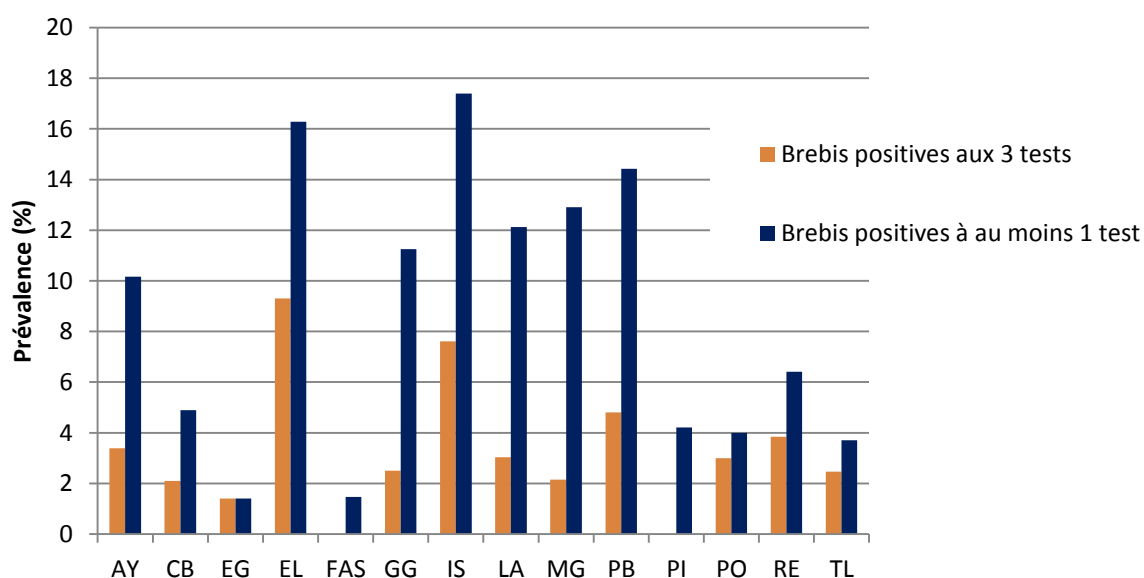


Figure 4 : Comparaison des séroprévalences apparentes en fonction du nombre de tests positifs considérés

La figure 5 compare les résultats des 3 kits ELISA dans chaque élevage de notre étude. Les trousse IdVet 602 et IDEXX donnent chacune la prévalence la plus élevée dans 4 élevages sur les 14 de notre étude (AY, EL, PB et PI pour IdVet 602 ; IS, LA, MG et RE pour IDEXX). Dans les autres élevages, plusieurs trousse ELISA ont donné des résultats similaires.

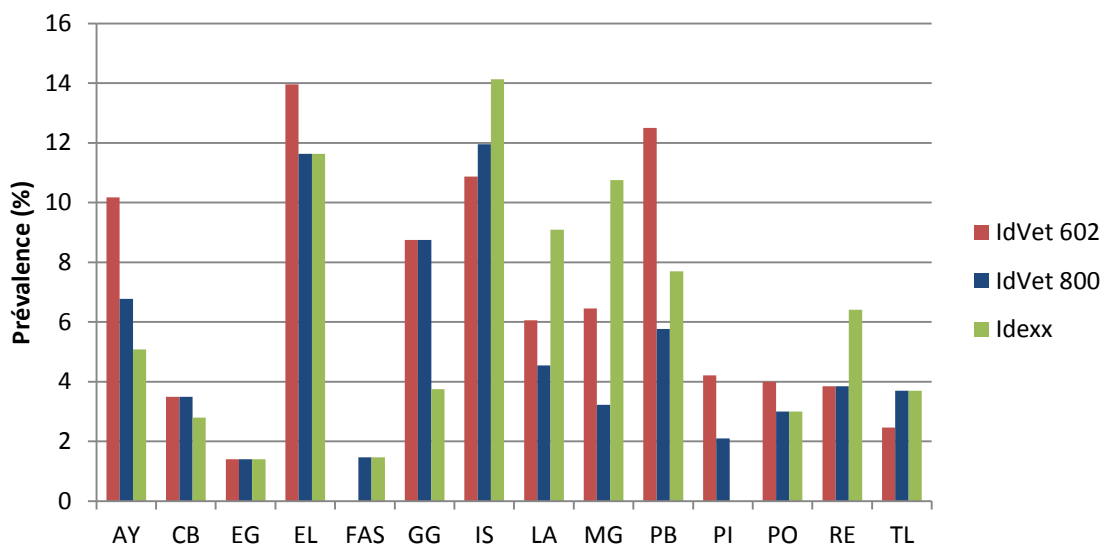


Figure 5 : Séroprévalence apparente selon les 3 trousse ELISA dans chacun des élevages de notre étude

#### II.2.1.4. Résultats douteux

Sur les 3648 tests ELISA effectués au total dans notre étude, 45 seulement ont donné un résultat douteux (1,23 %).

Le kit IDEXX est celui pour lequel le plus de résultats douteux a été obtenu. Avec ce kit, la fréquence des résultats douteux (23/1216) est significativement plus importante qu'avec le kit IdVet 602 (9/1216, test exact de Fisher,  $p=0,02$ ), mais ne diffère pas significativement de celle obtenue avec le kit IdVet 800 (13/1216,  $p=0,12$ ).

La répartition précise de ces résultats douteux en fonction de leur statut aux 2 autres tests est donnée dans le tableau 11.

Tableau 11 : Répartition des résultats douteux

		Nombre de résultats				Total
		Positifs aux 2 autres tests	Positifs à un autre test	Douteux à un autre test	Négatif aux 2 autres tests	
Kit ayant donné le résultat douteux	IDEXX	4	8	2	9	23
	IdVet 602	1	1	1	6	9
	IdVet 800	0	6	1	6	13
	Total	5	15	4	21	45

La très grande majorité des tests douteux se sont révélés négatifs à au moins l'un des 2 autres tests ELISA (40/45, 88,8 %), près de la moitié étant négatifs aux 2 autres tests ELISA (21/45, 46,7 %).

Cependant des différences dans la répartition de ces résultats douteux existent selon les kits considérés. En effet pour le kit IDEXX, plus de la moitié des résultats douteux (12/23, 52 %) ont donné un résultat positif à au moins un autre test, 4 tests ayant même donné un résultat positif avec les 2 kits IdVet. Ces résultats douteux positifs aux autres tests se retrouvent en proportion moins importante pour les 2 autres kits, notamment les douteux positifs aux 2 autres tests que l'on trouve presque uniquement avec le kit IDEXX.

Une modification des seuils fixés par le fabricant, dans le but de diminuer ce nombre de douteux et d'augmenter la concordance des tests, a été explorée, en particulier pour le kit IDEXX qui possède le plus grand nombre de douteux positifs avec les autres kits. Cependant aucune des nouvelles valeurs seuils envisagées n'a permis d'augmenter cette concordance, le nombre de résultats discordants devenant concordants étant plus que largement compensé par le nombre de nouveaux discordants qui apparaissent.

Dans la description des résultats discordants effectuée ci-après, les résultats ELISA douteux ont été arbitrairement considérés comme négatifs. Les résultats sont globalement similaires si les résultats douteux sont arbitrairement considérés comme positifs.

## **II.2.2. Discordances entre les différents tests ELISA**

Un résultat est dit discordant lorsqu'au moins 2 des tests effectués ont donné à l'échantillon testé un statut différent vis-à-vis de l'infection par *Map*.

### **II.2.2.1. Résultats généraux**

Sur les 1216 sérums testés, 1151 (94,7 %) ont obtenu un résultat concordant pour les 3 tests ELISA et 65 (5,3 %) un résultat discordant.

Cependant l'immense majorité des résultats concordants provient de tests ayant donné 3 résultats négatifs (1111 / 1151 tests concordants soit 96,5 % des résultats concordants).

Sur les 105 échantillons ayant donné un résultat positif à au moins l'un des tests ELISA, seuls 40 (38%) sont totalement concordants entre les 3 kits. La répartition de ces résultats est précisée dans le tableau 12. 23 % (24/105) des résultats positifs l'ont été à 2 tests ELISA et 39 % (41/105) n'étaient positifs qu'à un seul des 3 tests.



Tableau 12 : Répartition des résultats positifs à au moins un test ELISA

<b>Positif aux 3 tests ELISA</b>	40 (38 %)
<b>Positif à 2 tests ELISA</b>	24 (23 %)
<b>Positif à 1 test ELISA</b>	41 (39 %)
<b>Total (Positif à au moins un ELISA)</b>	105 (100 %)

Le coefficient Kappa de Fleiss, permettant d'évaluer la concordance entre plusieurs tests ou évaluateurs est de 0,68 (IC 95% : 0,65 – 0,72) sur l'ensemble de l'échantillon d'étude, et apparaît très bon selon la grille de lecture proposée par Landis et Koch (1977).

Cependant la faible prévalence de la séropositivité globale a une influence très forte dans l'évaluation des coefficients de concordance (Kappa de Cohen et de Fleiss) (Feinstein *et al.* 1990). Le calcul a donc aussi été effectué sur le sous-ensemble des 105 sérums ayant donné au moins un résultat positif avec une des trousse ELISA.

Le kappa de Fleiss calculé entre les 3 kits ELISA sur ce sous-ensemble est alors beaucoup moins élevé et vaut 0,1 (IC 95% : -0,01 – 0,2) ce qui correspond à une valeur de concordance très faible.

#### II.2.2.2. Comparaison des tests ELISA deux à deux

De même que précédemment, seul le sous-ensemble des 105 sérums ayant donné au moins un résultat positif avec une des trousse ELISA a été utilisé pour le calcul des Kappa de Cohen, permettant de juger de la concordance entre 2 tests.

Tableau 13 : Comparaison deux à deux des trousse ELISA

		IdVet 800		Total des positifs à au moins un test
		Négatif	Positif	
IdVet 602	Négatif	20	8	28
	Positif	23	54	77
Total des positifs à au moins un test		43	62	105

Kappa de concordance de Cohen: 0,38 (IC 95% : 0,2 ; 0,57)

		IDEXX		Total des positifs à au moins un test
		Négatif	Positif	
IdVet 602	Négatif	3	25	28
	Positif	32	45	77
Total des positifs à au moins un test		35	70	105

Kappa de concordance de Cohen : - 0,23 (IC 95% : - 0,39 ; - 0,071)

		IDEXX		Total des positifs à au moins un test
		Négatif	Positif	
IdVet 800	Négatif	18	25	43
	Positif	17	45	62
Total des positifs à au moins un test		35	70	105

Kappa de concordance de Cohen: 0,14 (IC 95% : - 0,048 ; 0,33)

Lorsque l'on compare les trousse ELISA deux à deux, les 2 kits qui ont donné le moins de résultats discordants sont les kits IdVet 602 et 800 (31 résultats discordants soit 43,7 % des résultats positifs à IdVet 602 et/ou 800).

Les kits IdVet 800 et IDEXX ont donné un nombre de discordants plus élevé avec 42 résultats discordants (51,2 % des résultats positifs à IdVet 800 et/ou IDEXX)

Les deux kits les plus discordants sont les kits IdVet 602 et IDEXX avec 57 discordants (59 % des résultats positifs à IdVet 602 et/ou IDEXX).

Les coefficients kappa de Cohen de concordance sont mauvais (<0,2) à médiocre (de 0,2 à 0,4)

Les valeurs S/P moyennes de ces résultats discordants sont données dans le tableau 14 pour chaque paire de trousse.

Tableau 14 : Détail des résultats discordants pour chacun des 3 tests

Résultat du test		Nombre de brebis
IdVet 602 (S/P moyen +/- écart type)	IdVet 800 (S/P moyen +/- écart type)	
Positif (90 +/- 20)	Négatif (41 +/- 16)	23
Négatif (21 +/- 21)	Positif (95 +/- 19)	8

Résultat du test		Nombre de brebis
IdVet 800 (S/P moyen +/- écart type)	IDEXX (S/P moyen +/- écart type)	
Positif (98 +/- 23)	Négatif (19 +/- 15)	17
Négatif (26 +/- 18)	Positif (69 +/- 17)	25

Résultat du test		Nombre de brebis
IdVet 602 (S/P moyen +/- écart type)	IDEXX (S/P moyen +/- écart type)	
Positif (104 +/- 59)	Négatif (27 +/- 13)	32
Négatif (18 +/- 22)	Positif (69 +/- 16)	25

Pour une paire de kits donnée, il existe une dissymétrie des résultats discordants. C'est particulièrement vrai pour les tests IdVet 602 et 800, pour lesquels les trois quarts (23/31) des discordants sont positifs en IdVet 602 et négatifs en 800 et un quart seulement (8/31) sont positifs en IdVet 800 et négatifs en IdVet602.

### II.2.2.3. Discordances intra élevages

Au moins un résultat discordant a été trouvé dans chacun des 14 élevages impliqués dans notre étude, à l'exception de l'élevage EG où une seule brebis est revenue positive aux 3 tests sur les 71 brebis testées.

Le pourcentage de résultats discordants parmi les résultats positifs à au moins un test est élevé et varie de 25 % à 100 % selon les élevages. Les valeurs de 100 % proviennent de l'élevage FAS où un seul résultat positif a été obtenu, ce résultat étant discordant, et de l'élevage PI où les 4 résultats positifs ont tous été discordants.

Tableau 15 : Répartition des résultats discordants entre les élevages

Elevage	Nombre de tests effectués		Pourcentage de tests discordants par rapport aux tests positifs à au moins une troupe (%)
	Discordants	Positifs à au moins une troupe	
AY	4	6	67 %
CB	4	7	57 %
EG	0	1	0 %
EL	6	14	43 %
FAS	1	1	100 %
GG	7	9	78 %
IS	9	16	56 %
LA	6	8	75 %
MG	10	12	83 %
PB	10	15	67 %
PI	4	4	100 %
PO	1	4	25 %
RE	2	5	40 %
TL	1	3	33 %

#### II.2.2.4. Comparaison entre les valeurs S/P des résultats discordants et celles des résultats concordants

Comme le montrent les tableaux 16 et 17, les résultats discordants ont des valeurs S/P moyennes bien différentes de celles des résultats concordants.

Quel que soit le test considéré, la valeur S/P moyenne des résultats discordants positifs (positif au test considéré mais négatif à au moins un des 2 autres tests) est significativement inférieure à celle des résultats concordants positifs aux 3 tests.

Par exemple, la valeur S/P moyenne des tests IdVet 602 ayant donné un résultat positif en IdVet 602 mais négatif à au moins l'un des tests IdVet 800 et IDEXX n'est que de 103,44 % contre 148,75 % pour la moyenne des S/P des tests IdVet 602 ayant donné un résultat positif aux 3 tests (test de Mann Whitney, p value = 1,27 E-7).

Tableau 16 : Comparaison des S/P moyennes des résultats positifs

Test	S/P moyen % (écart type ; <i>effectif</i> )		p value (test de Mann Whitney)
	Discordant positif	Concordant positif	
<b>IdVet 602</b>	103,44 (54,9 ; <b>37</b> )	148,75 (36,4 ; <b>40</b> )	1,27 E-7
<b>IdVet 800</b>	100 (33,4 ; <b>22</b> )	160 (54,2 ; <b>40</b> )	3,48 E-6
<b>IDEXX</b>	69,3 (16,2 ; <b>30</b> )	79,4 (17,8 ; <b>40</b> )	6,01 E-3

De même, pour les 3 tests, la valeur S/P moyenne des résultats discordants négatifs (négatif au test considéré mais positif à au moins un des 2 autres tests) est très supérieure à celle des résultats concordants négatifs aux 3 tests.

Par exemple, la valeur S/P moyenne des tests IdVet 800 ayant donné un résultat négatif au test IdVet 800 mais positif à au moins un des tests IdVet 602 ou IDEXX est de 27,1 % contre 4,5 % pour la moyenne des S/P des tests IdVet 800 dont le résultat a été négatif aux 3 tests.

Tableau 17 : Comparaison des S/P moyennes des résultats négatifs

Test	S/P moyen % (écart type, <i>effectif</i> )		p value (test de Mann Whitney)
	Discordant négatif	Concordant négatif	
<b>IdVet 602</b>	15,6 (20,3 ; <b>28</b> )	4,9 (10,8 ; <b>1111</b> )	8,36 E-9
<b>IdVet 800</b>	27,1 (18,1 ; <b>43</b> )	4,5 (9,4 ; <b>1111</b> )	1,36 E-23
<b>IDEXX</b>	20,1 (11,3 ; <b>35</b> )	5,3 (9,5 ; <b>1111</b> )	1,12 E-17

Les résultats discordants ont donc en moyenne des valeurs S/P plus proches des seuils de décision fixés par les fabricants que les résultats concordants.

Cependant, bien que toutes les possibilités de changement de seuil n'aient pas été envisagées, un tel changement ne semble pas améliorer la concordance des résultats.

Ainsi, en abaissant par exemple les seuils du test IDEXX de 45 et 55 % à 35 et 45 %, 7 résultats préalablement discordants deviennent concordants mais 36 nouveaux discordants apparaissent.

### II.2.3. Test de détection directe de *Map* par qPCR

#### II.2.3.1. Résultats généraux

*Map* a été recherchée par qPCR sur les fèces de 1198 des 1216 brebis dont les sérums ont été testés.

Sur ces 1198 brebis, 108 PCR ont donné un résultat positif soit une prévalence de 9 %, du même ordre de grandeur que la prévalence de 8,6 % obtenue en considérant les brebis séropositives à au moins un test ELISA.

En considérant toutes les brebis positives à au moins un test ELISA ou à la PCR, 190 animaux sont revenus positifs soit une prévalence apparente de 15,8 % (190/1216).

Dans notre étude, la plus faible valeur de Ct a été de 20,78 cycles. La valeur moyenne du Ct est de 33,1 cycles (+/- 5,66).

Sur les 108 PCR positives, 31 sont considérées fortement positives (Ct < 30), 31 moyennement positives (30 ≤ Ct < 37) et 46 faiblement positives (37 ≤ Ct < 40).

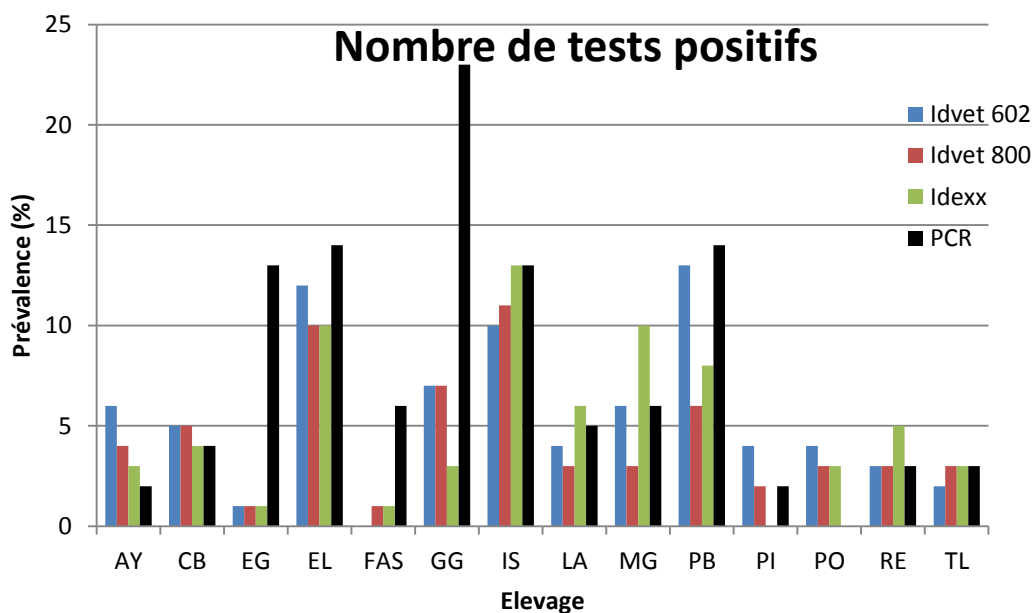


Figure 6 : Comparaison des prévalences données par les 4 tests

La figure 6 montre que la PCR a donné une prévalence supérieure à celle obtenue par les tests ELISA dans 5 des 14 élevages de notre étude (EG, EL, FAS, GG, PB) et en particulier dans les élevages EG et GG où la prévalence apparente passe respectivement de 1,5 et 8,8 % avec les tests ELISA à 19,7 et 29,1 % avec la PCR.

### II.2.3.2. Discordance entre les tests ELISA et la qPCR

Seulement 30 % (32/108) des résultats PCR positifs concordent avec un résultat ELISA positif à l'un des 3 tests, 13 % (14 / 108) concordant avec 3 tests ELISA positifs (tableau 18). La plupart des résultats PCR positifs sont associés à des résultats ELISA négatifs aux 3 tests (70%, 76/108).

Tableau 18 : Répartition des résultats qPCR positifs

<b>Positif aux 3 tests ELISA</b>	14 (13 %)	Positif à au moins un test ELISA 32 (30 %)
<b>Positif à 2 tests ELISA</b>	5 (5 %)	
<b>Positif à 1 test ELISA</b>	13 (12 %)	
<b>Négatif aux 3 tests ELISA</b>	76 (70 %)	
<b>Total</b>	108 (100 %)	

En ce qui concerne les résultats PCR négatifs, 93,3 % (1017/1090) concordent avec des résultats négatifs aux 3 tests ELISA (tableau 19). Cependant 73 PCR négatives sont associées à un résultat positif à au moins l'un des 3 tests ELISA.

Tableau 19 : Répartition des résultats qPCR négatifs

<b>Positif aux 3 tests ELISA</b>	26 (2,4 %)	Positif à au moins un test ELISA 73 (6,7 %)
<b>Positif à 2 tests ELISA</b>	19 (1,7 %)	
<b>Positif à 1 test ELISA</b>	28 (2,6 %)	
<b>Négatif aux 3 tests ELISA</b>	1017 (93,3 %)	
<b>Total</b>	1090 (100 %)	

### II.2.3.3. Relation entre la valeur du Ct de la qPCR et les valeurs S/P des tests ELISA

Dans les tableaux 20, les statuts des tests ELISA sont tels que définis au paragraphe II.2.1.1 : un test ELISA positif est considéré fortement positif si sa valeur S/P est supérieure à la médiane des valeurs S/P des tests positifs, et faiblement positif si elle est inférieure à cette médiane. Un test négatif est considéré faiblement négatif si sa valeur S/P est supérieure à la moitié du seuil des résultats douteux fixé par le fabricant et fortement négatif si elle est inférieure à cette valeur.

Le statut des PCR est défini comme au paragraphe II.2.3.1 : une PCR est considérée fortement positive si le Ct est <30, moyennement positive s'il est compris entre 30 et 37, faiblement positive s'il est compris entre 37 et 40 et négative si le Ct est supérieur ou égale à 40.

Tableau 20 : Répartition des résultats selon leur statut ELISA et qPCR

		Nombre de PCR				
		Fortement positive	Moyennement positive	Faiblement positive	Négative	Total
Nombre de test IdVet 602	Fortement positif	4	3	7	25	39
	Faiblement positif	0	4	2	32	38
	Douteux	0	0	1	7	8
	Faiblement négatif	2	2	3	60	67
	Fortement négatif	25	22	33	966	1046
	Total	31	31	46	1090	1198

Jaune : résultats concordants

Blanc : résultats discordants

		Nombre de PCR				
		Fortement positive	Moyennement positive	Faiblement positive	Négative	Total
Nombre de test IdVet 800	Fortement positif	4	2	4	21	31
	Faiblement positif	1	5	4	21	31
	Douteux	0	1	1	10	12
	Faiblement négatif	1	3	1	51	56
	Fortement négatif	25	20	36	987	1068
	Total	31	31	46	1090	1198

		Nombre de PCR				
		Fortement positive	Moyennement positive	Faiblement positive	Négative	Total
Nombre de test IDEXX	Fortement positif	4	5	7	19	35
	Faiblement positif	1	5	3	26	35
	Douteux	0	0	3	20	23
	Faiblement négatif	2	6	3	95	106
	Fortement négatif	24	15	30	930	999
	Total	31	31	46	1090	1198

Le kit ELISA présentant le plus de résultats discordants avec la qPCR est le kit IdVet 602 avec 145 résultats discordants (12,1 %). A l'inverse le kit pour lequel les résultats concordent le plus avec la PCR est le kit IDEXX pour qui seuls 128 résultats discordent avec les résultats PCR (10,7 %). Le kit IdVet 800 présente un nombre de discordances quasi équivalent à celui du kit IDEXX avec 130 discordants (10,9 %).

Dans notre étude, quel que soit le test ELISA considéré, aucune relation n'a pu être établie entre la valeur S/P du test et la valeur du Ct de la PCR.



#### II.2.3.4. Relation entre le statut PCR et la concordance des tests ELISA

La concordance entre les 3 tests ELISA semble plus importante chez les brebis ayant donné un résultat positif à la PCR comparées à celles dont le résultat de PCR est négatif (43,8 % des résultats positifs à au moins un test ELISA contre 35,6%) (tableau 21). Cette différence n'est cependant pas significative (test exact de Fisher,  $p=0,69$ ).

Cette concordance des 3 tests ELISA est encore plus importante lorsque l'on s'intéresse aux brebis ayant été définies comme fortement et moyennement positives à la PCR ( $Ct < 37$ ) : 53 % des tests positifs à au moins un ELISA ont alors donné un résultat concordant. Compte tenu des faibles effectifs de brebis avec des Ct faibles ( $n=17$ ), cette différence n'est cependant pas significative (test exact de Fisher,  $p=0,46$ ).

Tableau 21 : Concordance des résultats ELISA selon leur statut PCR

		Résultat PCR			
		Positif	Fortement et moyennement positif ( $Ct < 37$ )	Négatif	Total
Résultats ELISA globaux	Concordants positifs / nombre de brebis positives à au moins un ELISA	43,8 % (14/32)	53 % (9/17)	35,6 % (26/73)	38,1 % (40/105)
	Discordants / nombre de brebis positives à au moins un ELISA	56,2 % (18/32)	47 % (8/17)	64,4 % (47/73)	61,9 % (65/105)

		Résultat PCR			
		Positif	Fortement et moyennement positif ( $Ct < 37$ )	Négatif	Total
Résultats ELISA IdVet 602 - 800	Concordants positifs / nombre de brebis positives à un des 2 tests ELISA	73,9 % (17/23)	76,9 % (10/13)	59,7 % (37/62)	63,5 % (54/85)
	Discordants / nombre de brebis positives à un des 2 tests ELISA	26,1 % (6/23)	23,1 % (3/13)	40,3 % (25/62)	36,5 % (31/85)

		Résultat PCR			
		Positif	Fortement et moyennement positif (Ct<37)	Négatif	Total
<b>Résultats ELISA IdVet 602 - IDEXX</b>	<b>Concordants positifs / nombre de brebis positives à au moins un ELISA</b>	45,2 % (14/31)	53 % (9/17)	43,7 % (31/71)	44,1 % (45/102)
	<b>Discordants / nombre de brebis positives à au moins un ELISA</b>	54,8 % (17/31)	47 % (8/17)	56,3 % (40/71)	55,9 % (65/102)

		Résultat PCR			
		Positif	Fortement et moyennement positif (Ct<37)	Négatif	Total
<b>Résultats ELISA IdVet 800 - IDEXX</b>	<b>Concordants positifs / nombre de brebis positives à au moins un ELISA</b>	55,2 % (16/29)	68,8 % (11/16)	50 % (29/58)	51,7 % (45/87)
	<b>Discordants / nombre de brebis positives à au moins un ELISA</b>	44,8 % (13/29)	31,2 % (5/16)	50 % (29/58)	48,3 % (42/87)

Cette tendance se retrouve quelles que soient les trousse ELISA que l'on considère, et apparaît plus marquée entre les kits Idvet 602 et Idvet 800. Le pourcentage de tests concordants est toujours plus important chez les brebis ayant donné un résultat positif en PCR que chez celles ayant donné un résultat négatif. Et ce pourcentage de concordants est là encore supérieur chez celles pour lesquelles la PCR a été fortement ou moyennement positive (Ct <37).

En raison des faibles effectifs, cette différence est cependant là aussi non significative, quelles que soient les trousse considérées.

## **II.3. Discussion**

### **II.3.1. Matériel et méthodes**

Dans notre étude, les tests ELISA IdVet800 et IDEXX ayant été réalisés par des manipulateurs inexpérimentés, au moins lors des premières manipulations, des erreurs de manipulation ne peuvent être totalement exclues pour expliquer certains résultats et notamment certaines discordances. Ces éventuelles erreurs de manipulation auraient pu être évitées en testant 2 fois chaque sérum comme réalisé dans l'étude de Gumber *et al.* (2006). Dans cette étude, tous les échantillons de sérum étaient présents en 2 exemplaires sur la même plaque et testés en même temps. Si les valeurs S/P des 2 échantillons d'un même sérum différaient de 15 % ou plus, l'échantillon était testé à nouveau.

Cette méthode n'a pu être appliquée ici du fait du surcoût important qu'aurait représenté le double testage, pour chacune des 3 trousse, des 1216 sérums de notre étude. La très grande majorité des échantillons positifs a cependant été ré-analysée à l'aide des kits IdVet 800 et IDEXX dans le cadre d'autres manipulations, et a donné des résultats identiques à ceux obtenus ici.

Cependant malgré la possibilité de ponctuelles erreurs de manipulation, celles-ci ne peuvent suffire à expliquer à elles seules le fort pourcentage de résultats discordants obtenus.

### **II.3.2. Résultats**

#### **II.3.2.1. Prévalence**

Des brebis ont été testées positives dans tous les élevages de notre étude mais avec des séroprévalences apparentes très variables selon les élevages. Cette séroprévalence, de 1,41 à 17,39 % si l'on considère les brebis positives à au moins l'un des tests ELISA, est assez semblable à la prévalence moyenne intra troupeau de 11,1 % qu'avaient estimé Mercier *et al.* (2010) dans les élevages caprins français.

L'utilisation conjointe de la qPCR et des tests ELISA permet de détecter près de 2 fois plus d'animaux positifs que ces tests utilisés séparément, faisant passer la prévalence apparente globale de 8,6 % (brebis positives à un test ELISA au moins) à 15,8 % (brebis positives en PCR et / ou en ELISA).

#### **II.3.2.2. Discordances entre les résultats des différents tests ELISA**

Bien que les résultats des 3 tests ELISA de notre étude soient très majoritairement concordants, un nombre non négligeable de résultats discordants a été mis en évidence, les pourcentages de discordances variant de 2,55 % à 4,69 %.

Bien que non négligeables, ces pourcentages de discordances sont bien inférieurs aux 6,4 à 27,6 % de discordances obtenus chez des bovins par Dieguez *et al.* (2009) en comparant 3 kits ELISA et des 18,8 % obtenus en comparant 2 kits ELISA, là aussi chez des bovins, par McKenna *et al.* (2005).

Cette plus forte concordance des kits dans notre étude peut être en partie expliquée par le plus faible nombre de résultats positifs, la très grande majorité des résultats concordants étant dû à des animaux négatifs à 3 tests. Ainsi dans l'étude de Dieguez *et al.*, 17,8 % des animaux ont été positifs à au moins l'un des 3 tests ELISA contre 8,6 % dans notre étude. De même, les 2 kits ELISA utilisés par McKenna *et al.* ont donné 12,8 et 13,7 % de résultats positifs ce qui est 2 fois plus élevé que les 6,3 % de positifs obtenus dans notre étude avec le kit IdVet 602, test ayant donné la séroprévalence la plus élevée.

Seules les données de l'étude de Dieguez *et al.* étaient assez détaillées pour nous permettre de ramener le pourcentage de discordances aux seuls tests ayant donné un résultat positif. Cependant, ces pourcentages restent encore bien plus importants que ceux de notre étude (88,2 % à 90 % pour Dieguez *et al.* contre 43,7 à 59% dans notre étude).

Les tests comparés dans ces études et dans la nôtre n'étant pas les mêmes, les différences observées sont difficilement comparables, mais ces études montrent cependant que chez les bovins, comme chez les ovins, le nombre de résultats discordants est très loin d'être négligeable, et particulièrement en ce qui concerne les tests ayant donné un résultat positif.

Contrairement à ce qui aurait pu être attendu, le nombre de résultats discordants est assez similaire que l'on compare 2 trousseaux provenant de fabricants différents ou les 2 lots différents d'une même trousse.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer les discordances entre tests provenant de fabricants différents, le plus probable étant une différence dans les antigènes utilisés pour sensibiliser les microplaques. Un grand nombre d'antigènes de natures différentes sont utilisés dans les tests ELISA pour le diagnostic de la paratuberculose. Malgré l'absence de communication par les laboratoires d'informations sur la nature des antigènes utilisés dans les trousseaux de notre étude, il est raisonnable de penser que ces antigènes varient entre les trousseaux.

De même les discordances entre lots de trousseaux provenant d'un même fabricant peuvent aussi être imputables à des variations dans les composants des lots et en particulier les antigènes anti *Map* présents sur les plaques du kit. Là encore la composition des antigènes de chaque lot étant inconnue, il nous est impossible de confirmer cette hypothèse.

Très peu de données sont disponibles sur les discordances existant entre différents lots de fabrication d'une même trousse et dans la plupart des études publiées, le lot de fabrication n'est en général pas rapporté.

Dans une communication affichée proposée par le laboratoire IDVet au XII<sup>e</sup> Colloque International sur la Paratuberculose à Parme (Verité *et al.* 2014), un certain nombre d'éléments descriptifs sont néanmoins fournis sur ces discordances inter-lots de fabrication. Dans cette étude, les auteurs présentent des résultats de sérologie ELISA obtenus à partir de 4 lots de fabrication d'une trousse A, 2 lots de fabrication d'une trousse B et un dernier lot d'une trousse C.

Ainsi sur 33 bovins issus de 2 troupeaux connus pour être infectés, 18 seulement (54,5%) obtiennent des résultats concordants positifs aux 7 trousses évaluées. Pour la trousse A, 4 échantillons sur 33 (12,1%) ont des résultats différents avec au moins un des 4 lots de fabrication. Pour la trousse B, seuls 2 échantillons fournissent des résultats discordants entre les 2 lots de fabrication.

Dans 6 troupeaux bovins considérés comme indemnes (n=648 bovins testés), 38 animaux (5,9%) fournissent un résultat positif ou douteux avec au moins une des 6 à 7 trousses testées. Pour la trousse A, 16 échantillons sont discordants avec au moins un des 4 lots de fabrication (2,46%). Pour la trousse B, 5 échantillons sont discordants entre les 2 lots de fabrication. Notons par ailleurs que sur 11 échantillons fournissant des résultats concordants positifs avec les 2 lots de fabrication de la trousse B, seuls 6 obtiennent un résultat positif avec au moins un des lots de fabrication des autres trousses testées.

Ainsi, même si le pourcentage de discordances entre lots de fabrication d'une même trousse apparaissait moins important dans cette étude que dans la nôtre, leur fréquence apparaît comme non négligeable (entre 2 et 10% selon les trousses).

Les 3 trousses testées dans notre étude ne détectent ainsi probablement pas exactement les mêmes anticorps anti *Map*. Il est possible que certains résultats discordants proviennent d'animaux en début de séroconversion et produisant au moment du test, en faible quantité les anticorps détectés par une trousse et en forte quantité ceux détectés par une autre trousse. Cette hypothèse est appuyée par le fait que les valeurs S/P des tests discordants négatifs sont en moyenne significativement plus proches des seuils fixés par les fabricants que celles des tests concordants, indiquant ainsi la détection d'anticorps anti *Map* à un niveau supérieur à celui des tests concordants mais encore insuffisants pour dépasser le seuil de positivité. Il en est de même pour les valeurs S/P des discordants positifs qui sont elles aussi plus proches du seuil de positivité que celles des tests concordants.

Un moyen d'évaluer cette hypothèse serait de prélever à nouveau les animaux discordants quelques mois après le premier prélèvement pour les tester à nouveau et voir si leur statut sérologique a ou non évolué. Hirst *et al.* (2002) ont testé des bovins par ELISA vis-à-vis de *Map*, à au moins 2 mois d'intervalle. 39,5 % (59/157) des animaux testés positifs au premier test ont changé de statut entre les 2 tests, passant de positifs à douteux ou négatif, et 9,8 % (210/2151) des animaux testés négatifs ont, eux, été retestés positifs.

Le changement de statut sérologique vis-à-vis de *Map* ne semble donc pas rare, au moins chez les bovins, et mériterait d'être évalué chez les ovins.

Une modification des seuils fixés par les fabricants a aussi été envisagée dans le but d'améliorer la concordance des tests mais le nombre de nouveaux résultats concordants après modification des seuils était systématiquement compensé et surpassé par l'apparition de nouveaux discordants.

Une autre hypothèse permettant d'expliquer la présence de résultats discordants serait cette fois un défaut de spécificité des tests. La spécificité des tests ELISA pour rechercher *Map* est considérée bonne par la majorité des auteurs, mais rarement excellente voire parfaite. Ainsi Nielsen *et al.* (2008) l'ont évalué entre 0,95 et 0,99 dans leur revue des tests diagnostiques de la paratuberculose. Cependant des mycobactéries environnementales sont connues pour positiver les tests ELISA de détection de la paratuberculose. Une étape de pré incubation en présence d'antigènes de *Mycobacterium phlei* a donc été intégrée à la plupart des trousse afin de limiter ces défauts de spécificité. Cependant la composition des antigènes de *M. phlei* utilisés par les différentes trousse ainsi que les éventuelles différences entre lots n'étant pas connues, il ne peut être exclu que certains anticorps dirigés contre des mycobactéries environnementales puissent passer outre cette étape et positiver un test ELISA et non les autres. Les importantes différences entre les pourcentages de résultats discordants dans les élevages de notre étude pourraient être dues à la présence dans certains élevages d'espèces ou de souches de mycobactéries particulières pouvant faire uniquement réagir l'un des tests et pas les autres.

### **II.3.2.3. Discordances entre les résultats des tests ELISA et de la PCR**

Bien que certains tests ELISA positifs concordent avec des résultats positifs en PCR, la concordance entre ELISA et PCR est assez mauvaise. En effet, la majorité des PCR positives sont associées à 3 résultats ELISA négatifs (76/108 soit 70 %) et de même la majorité des résultats positifs à au moins un test ELISA est négative en PCR (74/105 résultats positifs à au moins un test ELISA, soit là aussi 70%). Les pourcentages de discordances entre un test ELISA et la qPCR varient dans notre étude entre 10,7 et 12,1 %. Ces pourcentages sont là encore inférieurs à ceux obtenus par McKenna *et al.* (2005) pour qui les 2 trousse ELISA testées discordaient avec la qPCR de 27,0% et 35,2%. Là encore, tout comme pour les discordances entre ELISA, ces différences dans l'intensité des discordances peuvent être dues à un nombre inférieur d'animaux positifs dans notre étude.

L'association entre un résultat positif en PCR et négatif en ELISA est probablement due à l'apparition tardive de la séropositivité lors de l'infection par *Map*, celle-ci apparaissant généralement après le début de l'excrétion fécale.

Cependant, bien que la PCR soit généralement considérée comme une méthode très spécifique, des séquences IS 900, recherchées dans notre protocole, ont également été mises en évidence dans le génome de mycobactéries autres que *Map*. *Mycobacterium scrofulaceum* a notamment été isolée par Cousins *et al* (1999) dans des échantillons ayant donné un résultat positif à une PCR utilisant la séquence IS 900. Nous ne pouvons donc écarter la possibilité de faux positifs dus à l'amplification de fragments d'ADN provenant d'autres mycobactéries.

Une partie des résultats positifs en PCR peuvent aussi provenir d'un transport passif de *Map* dans le tube digestif de certains animaux. Des bactéries se retrouvent alors dans les fèces de ces animaux ce qui peut positiver la PCR, bien qu'ils soient en réalité non infectés et donc forcément séronégatifs. Cette possibilité est en particulier possible pour les animaux faiblement positifs en PCR (Ct <37) qui représentent tout de même 42 % des résultats PCR positifs de notre étude.

A l'inverse l'association entre un résultat ELISA positif et un résultat PCR négatif peut être due à l'excrétion fécale intermittente de bacilles, en particulier chez les animaux en début d'évolution de la maladie ou à la répartition inégale de *Map* dans les fèces des animaux excréteurs. Un défaut de spécificité des tests ELISA ne peut là aussi pas être exclu.

La proportion de tests ELISA discordants semble cependant moins importante chez les animaux ayant donné un résultat positif en PCR et encore plus chez ceux fortement positifs en PCR. Cette différence n'est cependant pas ici significative du fait du faible nombre de brebis positives en PCR et du nombre encore plus faible de brebis fortement positives. Cette tendance mériterait d'être étudiée à nouveau sur un échantillon d'animaux dans lequel la prévalence vis-à-vis de *Map* serait plus élevée.

## CONCLUSION

L'objectif principal de notre étude était d'évaluer la fréquence des résultats discordants entre trousse ELISA rapportés ponctuellement par des observations de terrain, à l'aide d'un échantillon important de brebis provenant de 14 élevages du Lot.

Il ressort de notre étude que les résultats discordants entre tests ELISA sont effectivement assez fréquents chez les ovins et cela que l'on considère 2 trousse ELISA provenant de 2 fabricants différents ou 2 lots de fabrication d'une même trousse. Les résultats discordants sont même majoritaires lorsque l'on considère uniquement les tests ayant donné un résultat positif. Ces discordances peuvent être source de difficultés d'interprétation pour établir le statut d'un animal, notamment dans une logique de certification de troupeau, certains animaux pouvant donner un résultat positif avec une trousse ELISA et négatif avec une autre. Ces discordances ne semblent de plus pas être un phénomène isolé, des résultats discordants ayant été obtenus dans la quasi-totalité des élevages de notre étude. Les valeurs S/P des tests ayant donné des résultats discordants diffèrent de celles des concordants et sont significativement plus proches des seuils de décision fixés par les fabricants.

Dans notre étude, les résultats des tests ELISA discordent aussi fortement avec ceux de la qPCR. Il nous a de plus été impossible de trouver une relation entre le statut PCR d'un animal et son statut ELISA. En l'état actuel des choses, il ne nous apparaît donc pas possible de présumer du statut ELISA d'un animal à partir d'un résultat PCR et inversement.

Une différence de sensibilité entre les différents tests ELISA peut être évoquée pour expliquer au moins en partie les résultats discordants mais un défaut de spécificité ne peut non plus être exclu, l'absence de gold standard dans le diagnostic de la paratuberculose ne permettant pas de privilégier l'une ou l'autre de ces hypothèses.

En attendant de nouvelles études, un résultat positif isolé à un test ELISA de recherche de la paratuberculose ovine nous paraît devoir être considéré avec prudence et cela d'autant plus si sa valeur S/P n'est pas très éloignée du seuil de positivité.




**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

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

Je soussigné, Fabien CORBIERE, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **HUGNET Josselin** intitulée « **Concordance entre deux trousseaux sérologiques dans le diagnostic de la paratuberculose ovine : éléments de description à partir de 14 élevages de Lot.** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 14 décembre 2016  
Docteur fabien CORBIERE  
Maître de Conférences  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :  
La Directrice de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Isabelle CASMIERAIN



Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur Bruno MARCHOU

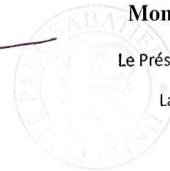
Professeur Bruno MARCHOU  
Service des Maladies Infectieuses et Tropicales  
CHU de Toulouse - Site de Purpan - TSA 40031  
31059 TOULOUSE Cedex 9  
Tél. 05 61 77 94 82 - Fax : 05 61 77 21 38  
RPPS : 10064004283

M. HUGNET Josselin  
a été admis(e) sur concours en : 2011  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 25/06/2015  
a validé son année d'approfondissement le : 30/05/2016  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Vu et autorisation de l'impression :  
Président de l'Université  
Paul Sabatier  
Monsieur Jean-Pierre VINEL

Le Président de l'Université Paul Sabatier  
par délégation,  
La Vice-Présidente de la CFVU

Régine ANDRÉ-OBRECHT



## BIBLIOGRAPHIE

AFSSA (2009). Rapport sur la paratuberculose des ruminants. Rapport d'expertise collective [en ligne], 87p, <https://www.anses.fr/fr/system/files/SANT-Ra-Paratuberculose.pdf> (consulté le 20/12/2016).

Ayele WY, Machackova M, Pavlik I (2001). The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. *Veterinarni Medicina*, **46**, 205–224.

Bauman CA, Jones-Bitton A, Jansen J, Kelton D, Menzies P (2016). Evaluation of fecal culture and fecal RT-PCR to detect *Mycobacterium avium* sbsp. *paratuberculosis* fecal shedding in dairy goats and dairy sheep using latent class Bayesian modeling. *BMC Veterinary Research*, **12**, 212.

Berghaus RD, Farver TB, Anderson RJ, Jaravata CC, Gardner IA (2006). Environmental sampling for detection of *Mycobacterium avium* sbsp. *paratuberculosis* on large California dairies. *Journal of dairy science*, **89**, 963–970.

Biet F, Boschioli ML (2014). Non-tuberculous mycobacterial infections of veterinary relevance. *Research in Veterinary Science*, **97**, S69–S77.

Bruegel C (2014). *Interprétation des réponses sérologiques non-négatives vis-à-vis de Mycobacterium avium* sbsp. *paratuberculosis* dans des situations de faible prévalence de l'infection. Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse 3, 130 p.

Clarke CJ, Little D (1996). The pathology of ovine paratuberculosis: gross and histological changes in the intestine and other tissues. *Journal of comparative pathology*, **114 (4)**, 419-437.

Collins MT, Wells SJ, Petrini KR, Collins JE, Schultz RD, Whitlock RH (2005). Evaluation of Five Antibody Detection Tests for Diagnosis of Bovine Paratuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, **12**, 685–692.

Cousins DV, Whittington R, Marsh I, Masters A, Evans RJ, Kluver P (1999). Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable by IS900 polymerase chain reaction : implication for diagnosis. *Mol. Cell. Proces*, **13**, 431.

Delgado L, Garcia Marin JF, Munoz M, Benavides J, Juste RA, Garcia-Pariente C, Fuertes M, Gonzalez J, Ferreras MC, Perez V (2013). Pathological Findings in Young and Adult Sheep Following Experimental Infection With 2 Different Doses of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis*. *Veterinary Pathology*, **50**, 857–866.

Diéguez FJ, Gonzalez AM, Menedez S, Vilar MJ, Sanjuan ML, Yus Y, Arnaiz I (2009). Evaluation of four commercial serum ELISAs for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy cows. *The Veterinary Journal*, **180**, 231–235.

Eisenberg SW, Nielen FM, Santema W, Houwers DJ, Heederik D, Koets AP (2010). Detection of spatial and temporal spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment of a cattle farm through bio-aerosols. *Veterinary Microbiology*, **143**, 284–292.

Feinstein AR, Cicchetti DV (1990). High agreement but low kappa: I. The problems of two paradoxes. *Journal of clinical epidemiology*, **43**, 543–549.

Fernández M, Benavides J, Sevilla IA, Fuertes M, Castaño P, Delgado L, García Marín JF, Garrido JM, Ferreras MC, Pérez V (2014). Experimental infection of lambs with C and S-type strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: immunological and pathological findings. *Veterinary research*, **45**, 1.

Gumber S, Eamens G, Whittington R (2006). Evaluation of a Pourquier ELISA kit in relation to agar gel immunodiffusion (AGID) test for assessment of the humoral immune response in sheep and goats with and without *Mycobacterium paratuberculosis* infection. *Veterinary Microbiology*, **115**, 91–101.

Hirst HL, Garry FB, Salman MD (2002). Assessment of test results when using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paratuberculosis in repeated samples collected from adult dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **220**, 1685–1689.

Kawaji S, Begg DJ, Plain KM, Whittington RJ (2011). A longitudinal study to evaluate the diagnostic potential of a direct faecal quantitative PCR test for Johne's disease in sheep. *Veterinary Microbiology*, **148**, 35–44.

Kim SG, Shin SJ, Jacobson RH, Miller LJ, Harpending PR, Stehman SM, Rossiter CA, Lein DA (2002). Development and application of quantitative polymerase chain reaction assay based on the ABI 7700 system (TaqMan) for detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **14**, 126–131.

Koets AP, Eda S, Sreevatsan S (2015). The within host dynamics of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in cattle: where time and place matter. *Veterinary Research*, **46**, 46-51.

Landis JR, Koch GG (1977). The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*, **33**, 159.

McKenna SLB, Sockett DC, Keefe GP, McClure J, VanLeeuwen JA, Barkema HW (2005). Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, **17**, 463–466.

Mercier P, Baudry C, Beaudreau F, Seegers H, Malher X (2010). Estimated prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in herds of dairy goats in France. *Veterinary Record*, **167**, 412–415.

Mikkelsen H, Jungersen G, Nielsen SS (2009). Association between milk antibody and interferon-gamma responses in cattle from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infected herds. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **127**, 235–241.

Muhammed SI, Eliasson EC (1979). The prevalence of antibodies to *Mycobacterium johnei* in colostrum deprived lambs. *The Veterinary Record*, **105 (1)**, 11-12.

Nielsen SS, Toft N (2008). Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon- $\gamma$  assay and faecal culture techniques. *Veterinary Microbiology*, **129**, 217–235.

Nielsen SS, Toft N (2009). A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Preventive Veterinary Medicine*, **88**, 1–14.

Petit H (2006). La paratuberculose des petits ruminants : résultats d'une enquête GDS sur la paratuberculose. *Le Point Vétérinaire*, **263**, 46-50.

Perez V, Garcia Marin JF, Badiola JJ (1996). Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *Journal of Comparative Pathology*, **114 (2)**, 107-122.

Pillars, R. B., Grooms, D. L., Kaneene, J. B (2009). Longitudinal study of the distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment of dairy herds in the Michigan Johne's disease control demonstration herd project. *Can. Vet. J*, **50**, 1039–1046.

Sohal J, Singha SV, Tyagi P, Subhodh S, Singh PK, Singh AV, Narayanasamy K, Sheoran N, Singh Sandhu K (2008). Immunology of mycobacterial infections: With special reference to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Immunobiology*, **213**, 585–598.

Stehman SM (1996). Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* **12(2)**, 441-455.

Verin R, Perroni M, Rossi G, De Grossi L, Botta R, De Sanctis B, Rocca S, Cubeddu T, Crosby-Durrani H, Taccini E (2016). Paratuberculosis in sheep: Histochemical, immunohistochemical and in situ hybridization evidence of in utero and milk transmission. *Research in Veterinary Science*, **106**, 173–179.

Verité S, De Sartiges A, Comtet L, Bevilacqua P, Pourquier P (2014). Paratuberculosis ELISAs: improvements on the horizon ? International Colloquium on Paratuberculosis, Parme, Italy, June 22-26.

Whittington RJ, Windsor PA (2009). In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A critical review and meta-analysis. *The Veterinary Journal*, **179**, 60–69.

Whittington RJ, Marsh IB, Saunders V, Grant IR, Juste R, Sevilla IA, Manning EJB, Whitlock RH (2011). Culture Phenotypes of Genomically and Geographically Diverse *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Isolates from Different Hosts. *Journal of Clinical Microbiology*, **49**, 1822–1830.

## **ANNEXE : Protocole des tests ELISA :**

### Préparation de la Solution de lavage

- Si nécessaire, ramener la Solution de lavage concentrée (20X) à température ambiante (21°C +/- 5°C) et bien agiter pour assurer la dissolution des cristaux.
- Préparer la Solution de lavage (1X) par dilution au 1/20ème de la solution de lavage (20X) dans de l'eau distillée (soit pour une plaque, 20mL dans 380mL d'eau bi distillée).

### Protocole de sérologie IdVet :

- Ramener tous les réactifs à température ambiante (21°C +/- 5°C) avant l'emploi et les homogénéiser par retournement ou au Vortex.
- Dans une plaque de pré-dilution format 96 puits, diluer les échantillons et contrôles au 1/12ème avec le tampon de dilution 6. Pour cela, distribuer :
  - 10 µL de contrôle négatif dans les cupules A1 et B1
  - 10 µL de contrôle négatif dans les cupules C1 et D1
  - 10 µL de chaque échantillon dans les cupules restantes selon le plan de plaque
  - 110 µL de Tampon de dilution 6 dans chaque puits.
- Incuber 20 min à 21°C (+/- 5°C).
- Transférer 100µL des contrôles et échantillons dans les plaques ELISA sensibilisées.
- Incuber une nuit entre 16 et 20 heures à 4°C (+/- 2°C).
- Vider les puits. Laver 3 fois chaque cupule avec environ 300µL de Solution de lavage. Eviter le dessèchement des cupules entre les lavages.
- Préparer le Conjugué en diluant le Conjugué concentré au 1/25ème avec le Tampon de dilution 3.
- Distribuer 100µL de Conjugué dilué dans chaque cupule.
- Incuber 30 min +/- 3min a 21°C (+/- 5°C).
- Vider les puits. Laver 3 fois chaque cupule avec environ 300µL de Solution de lavage.
- Distribuer 100µL de Solution de révélation dans chaque cupule.
- Incuber 15 min +/- 2min a 21°C (+/- 5°C) à l'obscurité.
- Distribuer 100µL de Solution d'arrêt dans chaque cupule pour arrêter la réaction.
- Mesurer et enregistrer les densités optiques à 450 nm.

Protocole de sérologie IDEXX :

- Ramener tous les réactifs à température ambiante (21°C +/- 5°C) avant l'emploi et les homogénéiser par retournement ou au Vortex.
- Dans une plaque de pré-dilution format 96 puits, diluer les échantillons et contrôles au 1/20ème avec le tampon de dilution N°12. Pour cela, distribuer :
  - 10 µL de contrôle négatif dans les cupules A1 et B1
  - 10 µL de contrôle négatif dans les cupules C1 et D1
  - 10 µL de chaque échantillon dans les cupules restantes selon le plan de plaque
  - 190 µL de Tampon de dilution N°12 dans chaque puits.
- Incuber 30 min à 21°C (+/- 5°C).
- Transférer 100µL des contrôles et échantillons dans les plaques ELISA sensibilisées.
- Incuber une nuit entre 16 et 20 heures à 4°C (+/- 2°C).
- Vider les puits. Laver 3 fois chaque cupule avec environ 300µL de Solution de lavage. Eviter le dessèchement des cupules entre les lavages.
- Préparer le Conjugué en diluant le Conjugué concentré au 1/25ème avec le Tampon de dilution N°1.
- Distribuer 100µL de Conjugué dilué dans chaque cupule.
- Incuber 30 min +/- 3min à 21°C (+/- 5°C).
- Vider les puits. Laver 3 fois chaque cupule avec environ 300µL de Solution de lavage.
- Distribuer 100µL de Substrat TMB N°9 dans chaque cupule.
- Incuber 10 min +/- 3min à 21°C (+/- 5°C) à l'obscurité.
- Distribuer 100µL de Solution d'arrêt N° 3 dans chaque cupule pour arrêter la réaction.
- Mesurer et enregistrer les densités optiques à 450 nm.





Toulouse, 2017

NOM : HUGNET

PRENOM : Josselin

TITRE : Concordance entre deux troussees sérologiques dans le diagnostic de la paratuberculose ovine : éléments de description à partir de 14 élevages du Lot (France)

RESUME : La paratuberculose ovine est une maladie incurable due à *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (*Map*) dont l'impact économique en élevage peut être fort et dont le diagnostic est difficile au stade préclinique du fait de la physiopathologie complexe de l'infection et de l'absence de test de référence parfait.

L'objectif de ce travail était de décrire et comparer les résultats de sérologie ELISA obtenus avec deux troussees du commerce sur un échantillon de 1216 brebis provenant de 14 troupeaux du Lot, infectés par la paratuberculose.

Les résultats indiquent un pourcentage de concordance globalement faible entre les troussees, y compris pour 2 lots d'une même trousse utilisés en parallèle, conduisant à des estimations de prévalence apparente intra-troupeau très différentes. Le travail réalisé a permis de montrer que les résultats discordants avaient, en moyenne, des titres anticorps (valeurs S/P) significativement plus élevés que les cas négatifs concordants, semblant indiquer qu'ils pourraient correspondre à des animaux en cours de séroconversion. La modification des seuils de décision ne permet cependant pas de réduire le nombre de cas discordants. Par ailleurs l'inclusion des résultats de qPCR sur fèces pour définir le statut infectieux des animaux n'a pas permis d'améliorer la concordance entre tests.

Un résultat positif isolé en ELISA doit donc être considéré avec prudence, en particulier s'il est proche des seuils de décision.

MOTS CLES : paratuberculose, ovins, sérologie, ELISA, qPCR, discordance

---

TITLE : Concordance between two serological kits for the diagnosis of paratuberculosis in sheep : parts of description from 14 flocks in south – west France (Lot)

ABSTRACT : Paratuberculosis in sheep is a chronic and fatal infection due to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (*Map*) which may cause important economic losses. The complex pathophysiology of the infection and the lack of a perfect Gold Standard test make its diagnostic difficult in subclinically infected animals.

This work aimed at describing and comparing the ELISA serological results yielded by two commercial kits in a sample of 1216 ewes from 14 paratuberculosis infected flocks from South West France (Lot).

Overall, the concordance between diagnostic kits was weak, even between two batches from the same producer used in parallel. This leads to very different intra-herd estimates of apparent prevalence. The discordant results' antibody titers (S/P values) were, on average, significantly higher than those of the negative concordant results, suggesting that they might come from seroconverting animals. However, changing the decision thresholds did not reduce the number of discordant cases. Moreover, adding qPCR feces results to define the individual infectious status of ewes didn't allowed improving the tests' concordance.

An isolated positive ELISA result should therefore be considered carefully, especially if close to the decision thresholds.

KEYWORDS : paratuberculosis, sheep, serology, ELISA, qPCR, discordance