




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's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/> 25333

To cite this version:

Montouroy, Clotilde . *Evaluation des performances diagnostiques de la sérologie Elisa appliquée à des petits mélanges de sérums pour le diagnostic de la paratuberculose à l'échelle collective chez les ovins*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2017, 81 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

EVALUATION DES PERFORMANCES DIAGNOSTIQUES DE LA SEROLOGIE ELISA APPLIQUEE A DES PETITS MELANGES DE SERUMS POUR LE DIAGNOSTIC DE LA PARATUBERCULOSE A L'ECHELLE COLLECTIVE CHEZ LES OVINS

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

MONTOUROY Clotilde
Née, le 23 mars 1993 à ARES (33)

Directeur de thèse : M. Fabien CORBIERE

JURY

PRESIDENT :
M. Laurent MOLINIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. Fabien CORBIERE
M. Gilles FOUCRAS

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

Répartition des Enseignants-Chercheurs par Département.

Mise à jour : 03/11/2017

DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN

| ELEVAGE ET PRODUITS/SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉRINAIRE | SCIENCES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES | SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIE, DE SPORT ET DE LOISIRS |
|--|--|---|
| <p>Responsable : M. SANS</p> <p><u>ALIMENTATION ANIMALE :</u> M. ENJALBERT Francis, PR Mme PRIYMENKO Nathalie, MC Mme MEYNADIER Annabelle, MC</p> <p><u>EPIDEMIOLOGIE :</u> Mathilde PAUL, MC</p> <p><u>PARASITOLOGIE-ZOOLOGIE :</u> M. FRANC Michel, PR M. JACQUIET Philippe, PR M. LIENARD Emmanuel, MC Mme BOUHSIRA Emilie, MC</p> <p><u>HYGIÈNE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS :</u> M. BRUGERE Hubert, PR M. BAILLY Jean-Denis, PR Mme BIBBAL Delphine, MC Mme COSTES Laura, AERC Mme DAVID Laure, MCC</p> <p><u>PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION :</u> M. BERTHELOT Xavier, PR M. BERGONIER Dominique, MC Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, PR Mme HAGEN-PICARD Nicole, PR M. NOUVEL Laurent-Xavier, MC Mme MILA Hanna, MC</p> <p><u>PATHOLOGIE DES RUMINANTS :</u> M. SCHELCHER François, PR M. FOUCRAS Gilles, PR M. CORBIÈRE Fabien, MC M. MAILLARD Renaud, PR M. MEYER Gilles, PR</p> <p><u>PRODUCTION ET PATHOLOGIE AVIAIRE ET PORCINE :</u> Mme WARET-SZKUTA Agnès, MC M. JOUGLAR Jean-Yves, MC M. GUERIN Jean-Luc, PR M. LE LOC'H Guillaume, MC</p> <p><u>PRODUCTIONS ANIMALES AMÉLIORATION GÉNÉTIQUE ÉCONOMIE :</u> M. DUCOS Alain, PR M. SANS Pierre, PR M. RABOISSON Didier, MC</p> | <p>Responsable : Mme GAYRARD</p> <p><u>ANATOMIE :</u> M. MOGICATO Giovanni, MC M. LIGNEREUX Yves, PR Mme DEVIERS Alexandra, MC</p> <p><u>ANATOMIE PATHOLOGIQUE - HISTOLOGIE :</u> M. DELVERDIER Maxence, PR Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, PR Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, PR Mme LACROUX Caroline, PR M. GAIDE Nicolas, AERC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, MC</p> <p><u>MICROBIOLOGIE – IMMUNOLOGIE - MALADIES INFECTIEUSES :</u> M. MILON Alain, PR M. BERTAGNOLI Stéphane, PR M. VOLMER Romain, MC Mme BOULLIER Séverine, MC Mme DANIELS Héléne, MC</p> <p><u>BIOSTATISTIQUES :</u> M. CONCORDET Didier, PR M. LYAZRHI Faouzi, MC</p> <p><u>PHARMACIE-TOXICOLOGIE :</u> M. PETIT Claude, PR Mme CLAUW Martine, PR M. GUERRE Philippe, PR M. JAEG Philippe, MC</p> <p><u>PHYSIOLOGIE –PHARMACOLOGIE THERAPEUTIQUE :</u> M. BOUSQUET-MELOU Alain, PR Mme GAYRARD-TROY Véronique, PR Mme FERRAN Aude, MC M. LEFEBVRE Hervé, PR</p> <p><u>BIOCHIMIE :</u> Mme BENNIS-BRET Lydie, MC</p> <p><u>ANGLAIS :</u> M. SEVERAC Benoît, PLPA Mme MICHAUD Françoise, PCEA</p> | <p>Responsable : Mme CADIERGUES</p> <p><u>ANESTHESIOLOGIE</u> M. VERWAERDE Patrick, MC</p> <p><u>CHIRURGIE :</u> M. AUTEFAGE André, PR M. ASIMUS Erik, MC M. MATHON Didier, MC Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, MC Mme PALIERNE Sophie, MC</p> <p><u>MEDECINE INTERNE :</u> Mme DIQUELOU Armelle, MC M. DOSSIN Olivier, MC Mme LAVOUE Rachel, MC Mme GAILLARD-THOMAS Elodie, MCC</p> <p><u>OPHTALMOLOGIE :</u> M. DOUET Jean-Yves, MC</p> <p><u>DERMATOLOGIE :</u> Mme CADIERGUES Marie-Christine, PR</p> <p><u>IMAGERIE MEDICALE</u> M. CONCHOU Fabrice, MC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE. :</u> Mme TRUMEL Catherine, PR</p> <p><u>PATHOLOGIE DES EQUIDES :</u> M. CUEVAS RAMOS Gabriel, MC Mme LALLEMAND Elodie, AERC</p> |

REMERCIEMENTS

*** A notre Jury de thèse ***

A Monsieur le Professeur Laurent MOLINIER

Professeur de l'Université Paul Sabatier de Toulouse,

Département d'Epidémiologie, Economie de la Santé et Santé Publique,

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

Hommages respectueux.

A Monsieur le Docteur Fabien CORBIERE,

Maitre 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 Professeur Gilles FOUCRAS,

Professeur 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 Josselin HUGNET, pour l'aide précieuse apportée dans la réalisation de nos expériences.

Sincères remerciements.

SOMMAIRE

| | |
|---|----|
| REMERCIEMENTS..... | 5 |
| SOMMAIRE..... | 7 |
| TABLES DES ILLUSTRATIONS..... | 10 |
| LISTE DES ABREVIATIONS | 11 |
| INTRODUCTION..... | 13 |
| PARTIE I : GENERALITES SUR LA PARATUBERCULOSE OVINE..... | 15 |
| A) Caractéristiques de la paratuberculose | 15 |
| 1- Situation actuelle..... | 15 |
| a. Prévalence de la paratuberculose..... | 15 |
| b. Répartition géographique de la paratuberculose | 15 |
| c. Impact économique de la paratuberculose | 16 |
| 2- Description de la maladie..... | 16 |
| a. Caractéristiques de l'agent causal <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> | 16 |
| 1. Classification | 16 |
| 2. Souches et spécificité d'hôte..... | 17 |
| 3. Caractéristiques | 18 |
| 4. Persistance dans l'environnement..... | 18 |
| 4.1. Conditions de survie | 18 |
| 4.2. Résistance aux agents chimiques..... | 18 |
| b. Epidémiologie | 19 |
| 1. Sources de contamination..... | 19 |
| 2. Modes de contamination | 19 |
| 2.1. Contamination de l'animal..... | 19 |
| 2.2. Contamination du troupeau..... | 19 |
| 3. Réceptivité des animaux et dose infectieuse | 20 |
| c. Aspects cliniques et lésionnels | 21 |
| 1. Phases de la maladie | 21 |
| 2. Lésions macroscopiques | 21 |
| 3. Lésions microscopiques et histopathologiques..... | 22 |
| d. Evolution des réponses immunitaires au cours de l'infection | 22 |
| 1. Réponse immunitaire à médiation cellulaire | 22 |
| 2. Modification du profil de réponse | 23 |
| B) Examens de laboratoire pour le diagnostic de la paratuberculose | 23 |
| 1- Valeurs informatives des tests utilisés | 23 |
| a. Test de référence | 23 |
| b. Sensibilité et spécificité..... | 24 |
| c. Valeurs prédictives..... | 24 |
| d. Prévalence intra-troupeau | 24 |
| e. Tableau bilan..... | 25 |
| f. Prévalence des troupeaux infectés..... | 25 |
| 2- Modalités d'utilisation des tests..... | 25 |
| a. Facteurs de variations de la sensibilité et spécificité des tests..... | 25 |
| b. Notions de seuil de positivité et de détectabilité | 26 |

| | |
|---|--------|
| 3- Principaux examens de laboratoire pour le diagnostic individuel de la paratuberculose..... | 26 |
| a. Méthodes de choix en fonction du stade de l'infection..... | 26 |
| b. Méthodes directes de détection de Map | 28 |
| 1. Culture bactériologique | 28 |
| 1.1. Coproculture | 29 |
| 1.2. Culture bactériologique sur échantillon de lait individuel..... | 29 |
| 2. PCR sur fèces..... | 29 |
| 3. Bactérioscopie..... | 30 |
| c. Méthodes indirectes de détection de Map..... | 30 |
| 1. Détection de la réaction immunitaire à médiation humorale : sérologie ELISA | 31 |
| 1.1. Principe de la sérologie ELISA..... | 31 |
| 1.2. Etapes de la sérologie ELISA | 31 |
| 1.3. Sensibilité et spécificité de la sérologie ELISA | 32 |
| 1.4. Diversité des trousse commerciales..... | 32 |
| 1.5. Discordance entre les trousse..... | 33 |
| 1.6. ELISA sur lait individuel | 33 |
| 2. Détection de la réaction immunitaire à médiation cellulaire | 35 |
| 2.1. Intradermo-réaction | 35 |
| 2.2. Test à l'interféron gamma | 35 |
| d. Tableau bilan : comparaison de la coproculture, la PCR et l'Elisa | 36 |
| 4 - Utilisation des tests sur mélanges ou prélèvements environnementaux | 36 |
| a. Tests sur mélange de matières fécales | 37 |
| 1. Coproculture sur mélange de fèces..... | 37 |
| 2. PCR sur mélange de fèces..... | 38 |
| b. Tests sur mélange de lait..... | 39 |
| 1. ELISA sur lait de mélange | 39 |
| 1.1. ELISA sur lait de petits mélanges | 39 |
| 1.2. ELISA sur lait de tank | 40 |
| 2. PCR sur le lait de grand mélange ou lait de tank..... | 41 |
| c. Tests sur prélèvements environnementaux | 42 |
| 1. Culture sur prélèvements environnementaux..... | 42 |
| 2. PCR sur prélèvements environnementaux | 44 |
| d. ELISA sur mélange sérum | 45 |
| PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE..... | 46 |
| A) Contexte et objectif de l'étude..... | 46 |
| B) Matériel et méthodes | 47 |
| 1- Population d'étude..... | 47 |
| 2- Evaluation du statut sérologique par ELISA..... | 48 |
| 3- Evaluation du signal de positivité après dilution | 50 |
| a. Descriptions des manipulations | 50 |
| 1. Expérience 1 : Dilutions sériées d'échantillons positifs | 50 |
| 2. Expérience 2 : Dilutions opérationnelles, évaluation de la sensibilité | 50 |
| 3. Expérience 3 : Dilutions opérationnelles, évaluation de la spécificité | 51 |
| b. Calcul de la sensibilité et de la spécificité des analyses ELISA de mélanges | 51 |
| C) Résultats | 51 |
| 1- Dilutions sériées (1/3, 1/9, 1/81 : IDEXX) | 51 |
| a. Influence de la dilution en milieu négatif sur les valeurs de S/P | 51 |
| b. Représentations graphiques par groupe | 53 |
| 1. Groupe 1..... | 53 |
| 2. Groupe 2..... | 54 |
| 3. Groupe 3..... | 54 |

| | |
|---|--------|
| 4. Groupe 5..... | 55 |
| c. Description et interprétation des graphiques..... | 55 |
| 2- Description des catégories selon la valeur S/P initiale | 56 |
| a. Mise en place de catégories | 56 |
| b. Valeurs S/P des brebis dans la population initiale..... | 57 |
| 3- Dilutions opérationnelles (1/5 et 1/10)..... | 57 |
| a. IDEXX | 58 |
| 1. Sensibilité..... | 58 |
| 2. Spécificité..... | 59 |
| 3. Seuil optimal | 59 |
| b. IDVET..... | 60 |
| 1. Sensibilité..... | 60 |
| 2. Spécificité..... | 61 |
| 3. Seuil optimal | 61 |
| PARTIE III : DISCUSSION..... | 62 |
| A) Matériel et méthodes..... | 62 |
| B) Résultats | 62 |
| 1- Variation des performances diagnostiques selon les catégories..... | 62 |
| a. Sensibilité | 63 |
| b. Spécificité..... | 63 |
| 2- Performances diagnostiques relatives à un test imparfait | 64 |
| 3- Combinaison de tests | 65 |
| C) Intérêt économique | 65 |
| CONCLUSION..... | 67 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 70 |
| ANNEXES | 76 |

TABLES DES ILLUSTRATIONS

Figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Pourcentage de cheptels ovins connus infectés en France de 1996 à 2006 (Résultats d'une enquête GDS sur la paratuberculose, Le Point vétérinaire, Hervé Petit, 2006)..... | 16 |
| Figure 2 : Relations phylogénétiques entre les différentes mycobactéries sur la base des séquences du gène ribosomal 16S (d'après rapport AFSSA sur la paratuberculose des ruminants, 2009) | 17 |
| Figure 3 : Type de souches en fonction de l'espèce (d'après Sevilla et al., 2007) | 17 |
| Figure 4 : Modalités de transmission de Map au sein d'un cheptel (d'après rapport AFSSA sur la paratuberculose des ruminants, 2009) | 20 |
| Figure 5 : Représentation théorique des événements suivant la contamination par Map et tests employables pour détecter la paratuberculose (d'après Grébert, 2013)..... | 28 |
| Figure 6 : Etapes de la sérologie ELISA (en vert l'antigène au fond des puits) | 49 |
| Figure 7 : Etape de révélation stoppée par la solution d'arrêt | 49 |
| Figure 8 : Pourcentage de mélanges dont les valeurs S/P sont supérieurs à 55% en fonction de la dilution (1, 1/3, 1/9 et 1/81) pour le Groupe 1 (figure 8.a) et le Groupe 2 (figure 8.b)..... | 53 |
| Figure 9 : Représentation des valeurs S/P des échantillons du G1 en fonction des dilutions (1, 1/3, 1/9 et 1/81)..... | 53 |
| Figure 10 : Représentation des valeurs S/P des échantillons du G2 en fonction des dilutions (1, 1/3, 1/9 et 1/81) | 54 |
| Figure 11 : Représentation des valeurs S/P des échantillons du G3 en fonction des dilutions (1, 1/3, 1/9 et 1/81) | 54 |
| Figure 12: Représentation des valeurs S/P des échantillons du G5 en fonction des dilutions (1, 1/3, 1/9 et 1/81) | 55 |

Tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Les différentes phases de la paratuberculose (d'après Lafort, 2015) | 21 |
| Tableau 2 : Principales caractéristiques de la paratuberculose chez les ruminants domestiques (d'après le rapport AFSSA sur la paratuberculose des ruminants, 2009) | 22 |
| Tableau 3 : Sensibilité, spécificité et valeurs prédictives d'un test..... | 25 |
| Tableau 4 : Comparaison des différents tests de dépistage (modifié d'après le rapport AFSSA sur la paratuberculose des ruminants, 2009) | 36 |
| Tableau 5 : Seuils d'interprétation des 2 trousse ELISA utilisées | 50 |
| Tableau 6 : Nouveaux seuils d'interprétation des 2 trousse ELISA utilisées | 50 |
| Tableau 7 : Moyennes des valeurs S/P obtenues après dilutions et pourcentages d'échantillons positifs après dilutions selon le fabricant (trousse IDEXX)..... | 52 |
| Tableau 8 : Les différentes catégories de sérums purs selon leur valeur S/P..... | 56 |
| Tableau 9: Répartition des effectifs et pourcentages selon les valeurs S/P d'après les 2 trousse ELISA avec n l'effectif et % le pourcentage de la population totale (catégories selon le tableau 8)..... | 57 |
| Tableau 10 : Sensibilités relatives après dilutions (5 et 10), calculées à différents seuils pour la trousse IDEXX | 58 |
| Tableau 11 : Spécificités relatives après dilutions (5 et 10), calculées à différents seuils pour la trousse IDEXX | 59 |
| Tableau 12 : Sensibilités relatives après dilutions (5 et 10), calculées à différents seuils pour la trousse IDVET | 60 |
| Tableau 13 : Spécificités relatives après dilutions (5 et 10), calculées à différents seuils pour la trousse IDVET | 61 |

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique
AGID : Immunodiffusion en gélose
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
BVD : Bovine viral diarrhoea
CC : Coproculture
CCM : Coproculture en mélange
CN : Contrôle négatif
CP : Contrôle positif
Ct : Treshold Cycle ou Cycle seuil
Dtx : Douteux
DO : Densité Optique
ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
G : Groupe
GDS : Groupe de Défense Sanitaire
IC : Intervalle de confiance
IDR : Intradermoréaction
Ig : Immunoglobulines
IFN- γ : Interféron gamma
INRA : Institut National de la Recherche Agronomique
Map : Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis
MOY : Moyenne
ECT : Ecartype
NI : Non interprétables
OIE : Office International des Epizooties
PCR : Polymerase Chain Reaction
PA : Prévalence apparente
PE : Prélèvements environnementaux
PV : Prévalence vraie
qPCR : Quantitative real time Polymerase Chain Reaction
RIMC : Réaction immunitaire à médiation cellulaire
RIMH : Réaction immunitaire à médiation humorale
Se : Sensibilité
Se_{mel} : Sensibilité relative du mélange
Se_T : Sensibilité troupeau
Sp : Spécificité
Sp_{mel} : Spécificité relative du mélange
Sp_T : Spécificité troupeau
S/P : Sample/Positive ou rapport de la DO de l'échantillon sur la densité optique du contrôle positif
Th1 ou 2 : Réaction immunitaire de type 1 ou 2
UFC : Unité Formant Colonie
VIH : Virus d'immunodéficiency humaine
VPP : Valeur prédictive Positive
VPN : Valeur Prédictive Négative

INTRODUCTION

La paratuberculose ou « maladie de Johne » est une maladie enzootique contagieuse, due à *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* (Map), présente dans de nombreux pays et affectant en particulier les ruminants d'élevage. C'est une maladie encore mal connue des éleveurs alors qu'elle conduit à des pertes économiques non négligeables en France. Cette mycobactérie est à l'origine d'une entérite granulomateuse chronique se traduisant cliniquement chez les ovins par une perte de poids progressive sans perte d'appétit, accompagnée d'une baisse de production. Les symptômes étant particulièrement frustes et n'apparaissant que tardivement (1,5 à 2 ans minimum après l'infection), le diagnostic de l'infection est difficile et ne peut être confirmé que par examens de laboratoire. Aujourd'hui, le test diagnostique le plus couramment employé en première intention est le test sérologique ELISA de par sa praticité d'utilisation, la rapidité d'obtention des résultats et son faible coût.

En Midi Pyrénées, le schéma de sélection et de production pyramidal à double étage en race Causse du Lot est particulièrement propice à la diffusion de la maladie entre élevages. Dans certains élevages du Lot, des éleveurs vaccinent leurs animaux et observent des répercussions favorables en termes d'expression clinique de la maladie. Cependant, se pose la question d'un éventuel arrêt de la vaccination dans les élevages où la prévalence et les niveaux d'excrétion sont faibles, envisageable qu'en maintenant des mesures de surveillance adéquates notamment l'évaluation de nouvelles infections naturelles. Le maintien d'une surveillance épidémiologique dans ces troupeaux permettrait une reprise de la vaccination dans les plus brefs délais s'il s'avérait que l'incidence de nouvelles infections naturelles était importante. Pour les élevages non vaccinés, la mise en place d'une surveillance épidémiologique visant à définir un statut sanitaire vis-à-vis de la paratuberculose est aussi importante afin de permettre de sécuriser les échanges d'animaux, mais aussi de détecter précocement l'émergence de la maladie et de mettre en place les mesures de maîtrise adaptées.

Les stratégies de dépistage basées sur les mélanges d'échantillons sont déjà bien établies en médecine humaine pour contrôler les banques de sang notamment vis-à-vis du VIH. Elles sont appliquées sans perte de sensibilité ni de spécificité et permettent une réduction importante des coûts de dépistage (Brinkhof et al., 2007). Dans le domaine vétérinaire, l'utilisation de mélanges de fèces pour la détection de la paratuberculose est mise en place par certaines initiatives locales. De même certaines structures utilisent les sérologies ELISA sur lait de tank pour la surveillance de la BVD chez les bovins laitiers (Beaudeau et al., 2005) et de la Border Disease chez les ovins laitiers (Corbiere et al, 2012). A notre connaissance, l'emploi de la sérologie sur des mélanges de sérums pour la surveillance de la paratuberculose chez les ovins n'a pas fait l'objet de travaux et pourrait s'avérer intéressante particulièrement en élevage allaitant.

L'objectif de cette thèse était d'évaluer les performances diagnostiques relatives de la sérologie ELISA appliquée à des petits mélanges de sérums et de définir les conditions permettant d'obtenir une sensibilité maximale sans dégradation de la spécificité. Ces travaux

ont été conduits à partir de 2 trousseaux ELISA du commerce et d'échantillons de sérums provenant de 14 élevages du Lot infectés par la paratuberculose.

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre d'une étude de plus grande ampleur visant à évaluer l'utilisation de la sérologie et de la PCR sur des prélèvements de mélange dans le suivi de troupeaux vaccinés afin de pouvoir émettre des recommandations concernant le maintien ou l'arrêt éventuel de la vaccination à partir des profils sérologiques et des niveaux d'excrétion observés.

La première partie de ce rapport est consacrée à une revue bibliographique rapide de la maladie, des moyens diagnostiques disponibles à l'heure actuelle ainsi que de leurs performances diagnostiques. La seconde partie présente le matériel et les méthodes utilisés dans notre étude ainsi que les principaux résultats. La dernière partie discute des intérêts et limites de notre étude.

PARTIE I : GENERALITES SUR LA PARATUBERCULOSE OVINE

A) Caractéristiques de la paratuberculose

1- Situation actuelle

a. Prévalence de la paratuberculose

En France, aucune étude de la prévalence n'a été conduite à l'échelle nationale chez les ovins bien que l'infection par Map soit considérée comme largement répandue. Il existe des régions historiquement affectées (Bretagne, Normandie, Massif central), mais la paratuberculose semble être présente à des niveaux variables sur l'ensemble du territoire (figure 1).

La seule étude de grande ampleur ayant été menée sur la prévalence de la paratuberculose a été faite chez les caprins en 2010. Cette enquête sérologique a montré que l'infection par Map est largement présente. En effet, cette enquête conduite dans 105 troupeaux répartis dans les principales régions d'élevage caprin révèle une estimation de la prévalence réelle des troupeaux infectés à 63% (IC à 95 % [41-84]) contre une prévalence individuelle estimée à 7% (IC à 95 % [6,1-7,0]). La prévalence intra-troupeau (calculée dans les troupeaux avec au moins un animal séropositif) était très variable : en moyenne, elle a atteint 11,1 %. (Mercier et al., 2011)

En Europe, bien que plusieurs études aient été menées, faute d'un protocole standard, des estimations de prévalences vraies comparables ont rarement été calculées. Nielsen et Toft (2009), à partir d'une synthèse des données disponibles sur la prévalence de la paratuberculose dans les espèces de petits ruminants, ont comparé la prévalence individuelle et intra-troupeaux en Europe.

Seulement quatre études portant sur la prévalence de l'infection par Map dans les élevages ovins et deux études dans les élevages mixtes ovins-caprins ont été répertoriées. Bien qu'aucune étude n'ait fourni d'estimations précises et non biaisées de la prévalence de l'infection chez les petits ruminants, les auteurs ont estimé à partir d'études suisses et espagnoles, que plus de 20% des troupeaux de petits ruminants en Europe seraient infectés.

b. Répartition géographique de la paratuberculose

D'après l'OIE en 2015, la paratuberculose est une maladie présente dans les différents continents et dont l'importance est probablement sous-estimée.

La paratuberculose ovine a été essentiellement décrite en Australie, Nouvelle-Zélande, Amérique du Nord et plusieurs pays d'Europe dans lesquels l'élevage ovin est développé.

En Europe, elle est surtout connue dans la partie septentrionale du continent : Grande-Bretagne, Pays-Bas, Belgique, pays scandinaves et France.

La prévalence de l'infection est mal connue en France et probablement sous-estimée. De nombreux Groupes de Défense Sanitaire (GDS) ont déclaré n'avoir aucune information sur la paratuberculose chez les ovins.

Selon une enquête réalisée auprès des GDS de France (Petit, 2006), la paratuberculose ovine serait plus répandue au sud d'une ligne Bordeaux-Lyon. Son impact économique est marqué dans le Sud-Ouest, à fort effectif ovin. Le pourcentage de cheptels ovins connus infectés entre 1994 et 2004 pouvait dépasser 10% (figure 1).

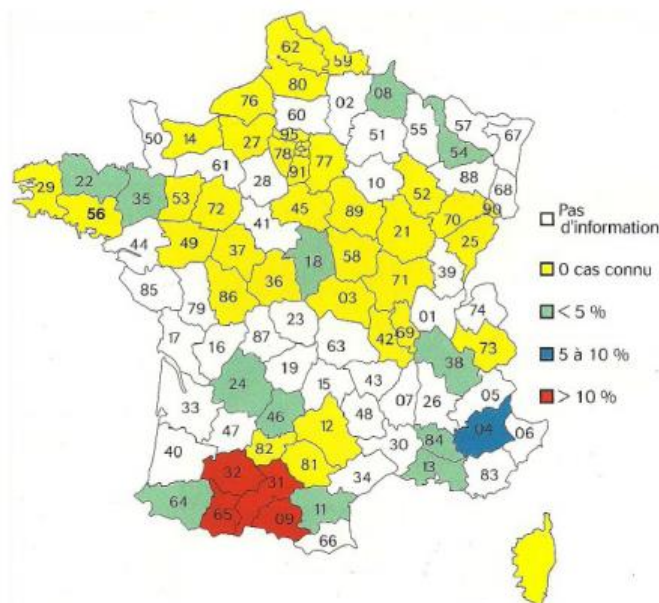


Figure 1 : Pourcentage de cheptels ovins connus infectés en France de 1996 à 2006 (Résultats d'une enquête GDS sur la paratuberculose, Le Point vétérinaire, Hervé Petit, 2006)

c. Impact économique de la paratuberculose

La paratuberculose ovine est une maladie dont l'impact économique est significatif. Les pertes sont essentiellement liées aux conséquences cliniques de l'infection comme des baisses de performances et de la mortalité. L'amaigrissement progressif peut être à l'origine de la réforme précoce d'animaux ayant déjà perdu de leur valeur économique. La maladie entraîne également une baisse de production laitière, augmente la sensibilité à d'autres maladies et provoque souvent une infertilité.

Les frais de dépistage et ceux d'éventuels traitements mis en place sont également à prendre en compte.

Il reste cependant difficile d'estimer les pertes économiques dues à la paratuberculose dans les élevages ovins car cet aspect est mal renseigné dans la littérature.

2- Description de la maladie

a. Caractéristiques de l'agent causal *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

1. Classification

L'agent causal de la paratuberculose est une mycobactérie, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), aussi appelé « bacille de Johne ». Il appartient à l'ordre des Actinomycétales et à la famille des Mycobactériaceae. Le genre *Mycobacterium* comprend

actuellement 72 espèces et est divisé en deux groupes selon la vitesse de croissance, lente ou rapide (figure 2). Les mycobactéries à croissance lente sont elles-mêmes divisées en sous-groupes dont le complexe *Mycobacterium avium*. Ce sous-groupe réunit les mycobactéries atypiques dont Map.

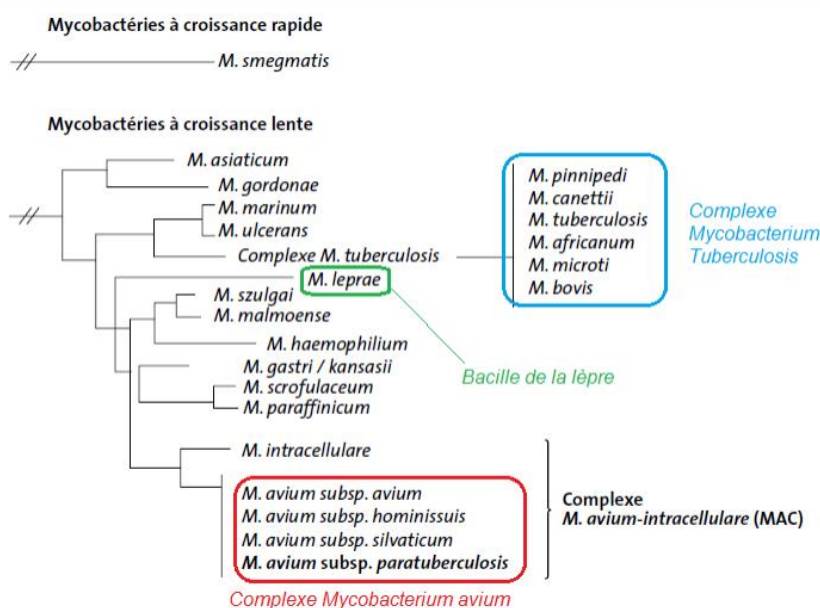


Figure 2 : Relations phylogénétiques entre les différentes mycobactéries sur la base des séquences du gène ribosomal 16S (document modifié du rapport AFSSA sur la paratuberculose des ruminants, Mars 2009)

2. Souches et spécificité d'hôte

Au sein de la sous-espèce paratuberculosis, Collins et al.(1990) ont identifié deux types de souches : les souches bovines dites souches C (pour « Cattle », aussi dit de type II, de croissance lente) et les souches ovines dites souches S (pour « Sheep », aussi dit de type I/III, de croissance extrêmement lente). Elles diffèrent à la fois du point de vue génotypique et phénotypique. Les souches bovines peuvent affecter toutes les espèces hôtes alors que les souches ovines sont principalement isolées chez les ovins et les caprins (figure 3). Chaque espèce sensible peut être infectée par chaque type de souche.

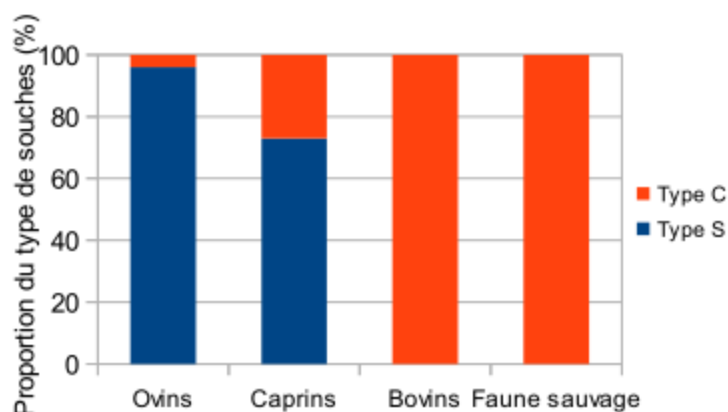


Figure 3 : Type de souches en fonction de l'espèce (d'après Sevilla et al., 2007)

3. Caractéristiques

Map est un bacille de petite taille (0,5 x 1,5 µm) en forme de bâtonnet trapu, immobile, aérobic (ou microaérophile), non capsulé et non sporulé. Bien que les bactéries du genre *Mycobacterium* soient considérées comme des bactéries à Gram positif, elles sont difficilement identifiables par cette caractéristique. C'est leur propriété de bacilles acido-alcool-résistants qui permet de les identifier plus facilement après une coloration de Ziehl-Neelsen.

Map est un parasite obligatoire de l'hôte strictement intracellulaire.

Par ailleurs, la culture du bacille de Johne est difficile et longue (plusieurs semaines). Sa croissance nécessite des milieux de culture spécifiques enrichis en mycobactine (que Map est incapable de synthétiser). Ainsi, les milieux classiquement utilisés pour la culture des bactéries ne sont pas adaptés à la culture de toutes les souches de Map. Une absence de croissance peut être due à un milieu inadéquat pour le type de souche en cause.

4. Persistance dans l'environnement

4.1. Conditions de survie

Les données s'accordent à dire que Map est une bactérie très résistante dans le milieu extérieur, notamment dans un milieu humide et froid.

Ainsi, d'après Thévenet (2003), Map persiste de 6 à 8 mois dans le lisier, jusqu'à 9 mois dans les bouses, et jusqu'à 18 mois à la surface des pâtures, après contamination par les excréments des individus infectés.

Whittington et al. (2004), eux, ont pu cultiver Map à partir d'un échantillon de matières fécales de mouton naturellement contaminé pendant plus d'un an. Lovell et al. (1944), montrèrent quant à eux, que Map persistait dans les fèces entre 152 à 246 jours en fonction des conditions choisies (température, hygrométrie et éclairage). Dans une autre étude, Beumer et al. (2010) ont détecté Map par PCR dans des échantillons d'eau potable.

Il est à noter que Map peut continuer à être détectée dans l'environnement d'une exploitation, bien que le cheptel ait été assaini de paratuberculose (Moravkova et al. 2012).

4.2. Résistance aux agents chimiques

Map est résistante aux désinfectants couramment utilisés mais est en revanche sensible à certains désinfectants tels que le formol à 5%, l'eau de Javel à 10%, le crésyl à 10% et le sulfate de cuivre à 5% bien qu'une fois ingérée par des amibes, Map puisse résister à la désinfection au chlore (Whan et al., 2006).

Map est naturellement résistante à de nombreux antibiotiques couramment utilisés. D'après une étude publiée en 2009 par Krishnan et al., ce sont les antibiotiques de la famille des macrolides (clarithromycine et l'azithromycine) qui présentent la plus grande efficacité in vitro. La plupart des antibiotiques contre la tuberculose (éthambutol et isoniazide) et contre la lèpre (dapsone et lofazimine) ne sont pas efficaces contre Map, bien que la rifampicine

fausse exception. Ces anti-infectieux sont réservés à la médecine humaine et ne peuvent être mis en œuvre chez les animaux.

b. Épidémiologie

1. Sources de contamination

Les principales sources de contamination sont les fèces des animaux infectés et excréteurs et donc indirectement tout ce qui est souillé par ces fèces. Ainsi les trayons, l'eau, le sol (contamination directe ou après épandage de fumier contaminé), le matériel ou les aliments sont des vecteurs de contamination.

L'excrétion de Map précède l'apparition des symptômes. Les ovins infectés excrètent quelques bactéries par gramme de fèces au début de la phase subclinique, jusqu'à 10^4 à 10^{10} UFC/g en phase clinique.

2. Modes de contamination

2.1. Contamination de l'animal

La transmission de la paratuberculose se fait principalement par voie oro-fécale, via l'environnement souillé par les matières fécales contaminées (figure 4). Plus spécifiquement, les jeunes agneaux peuvent aussi se contaminer par l'ingestion du colostrum ou du lait d'une brebis infectée ou simplement par contact lors de la tétée avec des mamelles contaminées par des matières fécales.

La transmission peut également se faire par voie respiratoire (via les aérosols contaminés), sexuelle (via le sperme contaminé) ou encore in utero (à travers la barrière placentaire) (figure 4).

2.2. Contamination du troupeau

La paratuberculose est typiquement une maladie d'achat. Ainsi, l'introduction d'un animal au statut paratuberculose inconnu représente le facteur de risque le plus important. L'animal introduit et infecté peut ne présenter aucun signe de la maladie tout en étant déjà excréteur (figure 4). Qu'il développe ou non une forme clinique une fois dans l'élevage, il deviendra une source de contamination pour le troupeau via l'excrétion (plus ou moins importante) de Map dans ses fèces.

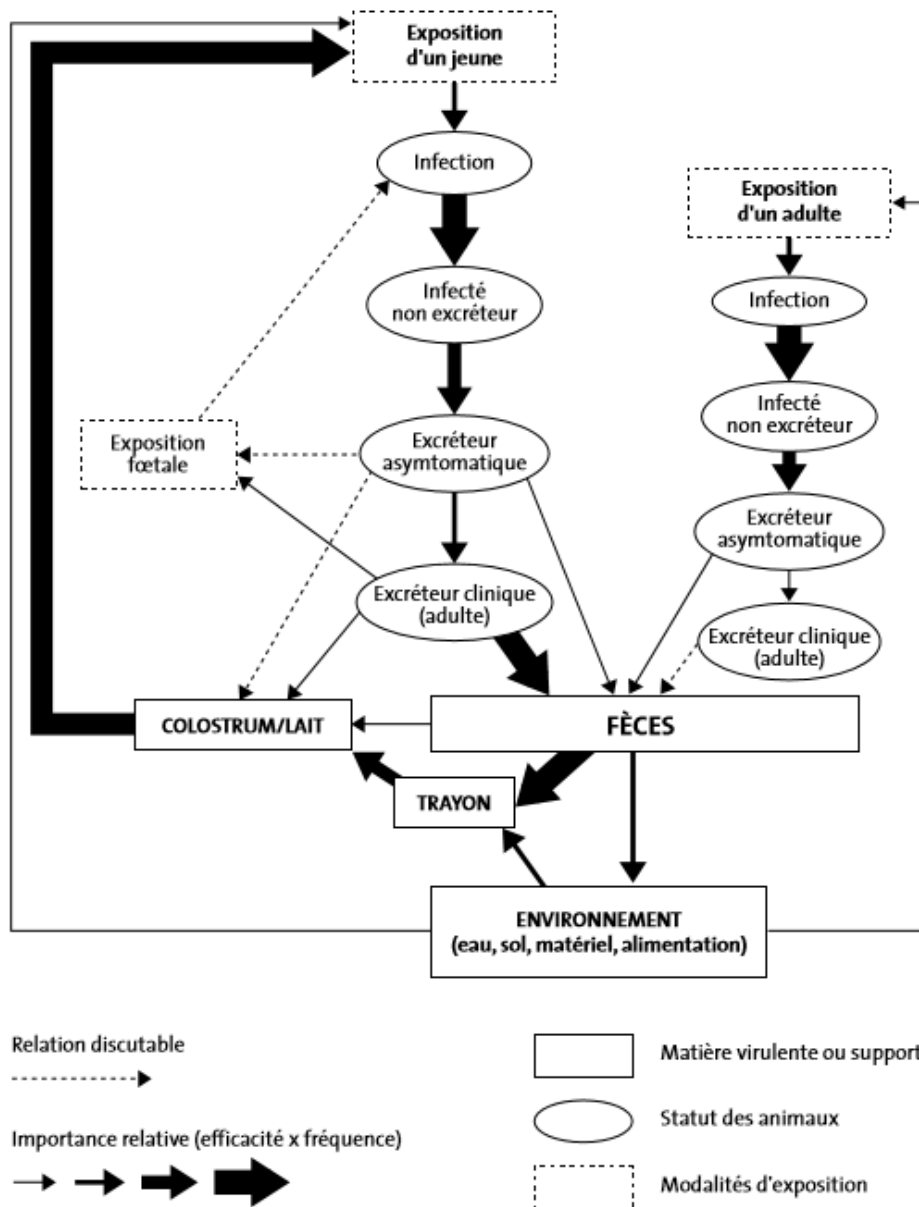


Figure 4 : Modalités de transmission de Map au sein d'un cheptel (d'après rapport afssa sur la paratuberculose des ruminants, 2009)

3. Réceptivité des animaux et dose infectieuse

Les jeunes animaux de moins de un an sont considérés comme les plus réceptifs à l'infection par Map. Ils sont plus sensibles à l'infection avant l'âge d'un mois, et la contamination a lieu principalement durant les six premiers mois de vie (Chiodini et al., 1984). Cependant, l'infection des animaux adultes semble possible (Pradhan et al., 2011), notamment en présence d'animaux super-excréteurs dans le troupeau.

Une étude expérimentale (Delgado et al., 2013) a été menée afin d'établir l'effet de l'âge et des doses infectieuses de Map sur la sensibilité à la paratuberculose chez les ovins. Dans cette étude, seuls les animaux infectés avec des doses importantes (92,3% des brebis et 100% des agneaux) avaient des lésions histologiques de paratuberculose. Les résultats de cette étude suggèrent que des brebis adultes (âgés de plus de 2 ans) peuvent être infectées par Map.

c. Aspects cliniques et lésionnels

1. Phases de la maladie

Les ovins sont contaminés durant leurs premiers mois de vie. Pendant la longue période d'incubation (plusieurs mois), l'animal ne présente aucun signe de la maladie et n'excrète pas de bacilles dans ses fèces. Il est qualifié d'infecté asymptomatique non excréteur.

On observe d'abord des signes non spécifiques tels qu'une diminution de la production et une plus grande sensibilité aux maladies d'élevage (mammites, boiteries, métrites). A ce stade de la maladie, l'excrétion de Map dans les fèces peut commencer de façon intermittente, ce qui rend la détection de ces animaux infectés asymptomatiques difficile.

Toute source de stress telle que la mise-bas, les déséquilibres alimentaires ou les carences favorise l'expression clinique. Cette phase clinique est marquée par un amaigrissement chronique (perte de masse grasseuse et musculaire) malgré un appétit souvent conservé, associé à une diarrhée incoercible sans hyperthermie, et une diminution de la production laitière. Contrairement aux bovins, la diarrhée n'est pas un signe clinique systématique chez les ovins. Un ramollissement des fèces peut être observé, le plus souvent tardif et intermittent. A ce stade, les animaux excrètent généralement une quantité importante de bactéries dans leurs fèces et sont donc facilement détectables au sein des troupeaux. Ils sont qualifiés d'infectés symptomatiques excréteurs.

En phase terminale, l'animal est moribond. Il est cachectique (anémie, œdème due à l'hypoprotéinémie) et ne produit plus de lait. Son appétit peut être malgré tout conservé.

Tableau 1 : Les différentes phases de la paratuberculose (d'après Lafort, 2015)

| Naissance | 1,5- 2 ans | 2-10 ans | |
|--|--|---|--|
| <i>Phase d'incubation</i> | <i>Phase subclinique</i> | <i>Phase clinique</i> | <i>Phase terminale</i> |
| Pas d'excrétion fécale Pas de signes visibles | Excrétion + Pas de signes cliniques ↓ performances | Excrétion ++ Signes cliniques Amaigrissement ↓↓ performances | Excrétion +++ Ramollissement des fèces Faiblesse généralisée |

2. Lésions macroscopiques

Macroscopiquement, la paratuberculose se caractérise par une entérite chronique hypertrophiante donnant un aspect encéphaloïde à la muqueuse intestinale.

Cet épaissement de la paroi intestinale mène à une malabsorption des aliments à l'origine d'œdème hypoprotéinémique et d'un dépérissement progressif. Les lésions se localisent principalement dans l'iléon et peuvent s'étendre au jéjunum et au caecum. Elles sont plus discrètes chez les petits ruminants que chez les bovins.

Une décoloration jaune ou orange diffuse des segments de l'intestin peut être observée dans les cas de paratuberculose ovine en raison de la pigmentation associée aux souches ovines de Map (Clarke et Little, 1996). Par ailleurs, les nœuds lymphatiques mésentériques sont hypertrophiés et parfois nécrosés, caséux ou même calcifiés.

3. Lésions microscopiques et histopathologiques

Deux types de lésions histologiques ont été mises en évidence : type multibacillaire et type paucibacillaire. Elles diffèrent par le type d'infiltrats cellulaires, le degré de colonisation mycobactérienne et la réponse immunitaire associée (Clarke et Little, 1996).

La majorité des cas de paratuberculose présente des lésions de type multibacillaire. Cette lésion est caractérisée par un infiltrat diffus de macrophages épithélioïdes (granulomes) au sein de la muqueuse intestinale et de la sous-muqueuse ainsi que dans les nœuds lymphatiques mésentériques. Les lésions paucibacillaires présentent un infiltrat lymphocytaire dans la paroi intestinale et des macrophages associés à des cellules géantes dans des petits granulomes. Map est peu voire non détectable dans les lésions paucibacillaires.

La lésion multibacillaire est souvent associée à une forte réponse immunitaire humorale et à une faible réponse immunitaire cellulaire à l'inverse de la lésion paucibacillaire qui induit une forte immunité à médiation cellulaire et de faibles concentrations d'anticorps.

Tableau 2 : Principales caractéristiques de la paratuberculose chez les ruminants domestiques (d'après le rapport AFSSA sur la paratuberculose des ruminants, 2009)

| | Bovins | Ovins | Caprins |
|---|--|--|---|
| Âge moyen d'apparition des signes cliniques | 4/5 ans | 1,5 à 2 ans | 1,5 à 2 ans |
| Diarrhée | +++ | + / ++ Ramollissement | - / + |
| Lésions générales | Amyotrophie cachexie | Idem + anémie | Idem + anémie |
| Épaississement intestinal (aspect encéphaloïde) | +++ | ++ | Exceptionnel |
| Extension des lésions intestinales | Intestin grêle et gros intestin (IG + GI) → Rectum (10 % des cas cliniques) | IG + GI | IG seulement Raréfaction en zone VIC (valvule iléo-cæcale) |
| Lésions des ganglions mésentériques | Augmentation de taille | Augmentation de taille | Nécrose et calcification fréquentes |
| Lésions microscopiques | Cellules épithélioïdes et cellules géantes infiltration lymphocytaire | Cellules épithélioïdes et cellules géantes | Cellules épithélioïdes |

d. Evolution des réponses immunitaires au cours de l'infection

1. Réponse immunitaire à médiation cellulaire

Après ingestion, Map traverse la muqueuse intestinale après endocytose par les cellules M en regard des plaques de Peyer (tissu lymphoïde de l'iléum chez les jeunes ruminants). Les macrophages intestinaux phagocytent les bacilles après translocation et provoquent l'activation des lymphocytes T. Il y a alors coopération entre les lymphocytes T auxiliaires de type 1 (lymphocytes Th1) et les macrophages. La sécrétion de cytokines par les populations de lymphocytes Th1 active les macrophages et induit la lyse des cellules infectées.

Il se crée alors un équilibre entre Map et les défenses immunitaires de l'individu atteint. A ce stade, la réponse immunitaire à médiation cellulaire peut limiter, voire éliminer l'infection : elle est dite protectrice contre Map. Les animaux sont asymptomatiques et non excréteurs même si l'infection précoce peut conduire à une excrétion transitoire.

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

2. Modification du profil de réponse

Si la réaction immunitaire cellulaire n'est pas suffisamment efficace, elle décroît progressivement au cours du temps et l'infection s'étend, l'équilibre est rompu. Map se multiplie au sein de la muqueuse intestinale, entraînant son altération et l'apparition des signes cliniques. En parallèle, une réaction immunitaire à médiation humorale (RIMH) se met progressivement en place, stimulée par la circulation sanguine des bacilles. Le profil de réponse des lymphocytes T auxiliaires de type 2 (lymphocytes Th2) est alors dominé par d'autres interleukines qui favorisent la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'anticorps et inhibent entre autre la fonction macrophagique.

Contrairement à la réponse cellulaire, la réponse humorale n'a pas de caractère protecteur car les anticorps IgG n'empêchent probablement pas la prolifération de Map. Durant cette phase, l'animal est excréteur, il peut exprimer des symptômes et possède des anticorps qui sont détectables de façon permanente. Au cours de l'infection, l'excrétion fécale devient de plus en plus importante.

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

B) Examens de laboratoire pour le diagnostic de la paratuberculose

1- Valeurs informatives des tests utilisés

a. Test de référence

L'interprétation des résultats d'un test doit tenir compte des valeurs intrinsèques qui définissent la qualité du test : la sensibilité (Se) et la spécificité (Sp). Ces valeurs sont calculées pour chaque test à partir d'un test de référence (ou gold standard), dont on estime qu'il détecte l'ensemble des animaux infectés (infectés vrais), et l'ensemble de tous les animaux indemnes testés (indemnes vrais). Le test de référence va également permettre de calculer la valeur prédictive négative (VPN) et positive (VPP) d'un test, ainsi que les prévalences (tableau 3). Ainsi les valeurs intrinsèques du test évalué et donc l'interprétation des résultats dépendent du test de référence utilisé.

Avec une spécificité voisine de 100 % (Collins, 2006) et longtemps considéré comme le test le plus sensible, la culture bactériologique sur fèces est souvent considérée comme le gold standard pour la paratuberculose (Whitlock et al. 2000).

Ainsi dans le cas de la paratuberculose, la sensibilité et la spécificité d'un test sont déterminées par rapport à un test imparfait (souvent la culture fécale ou l'histopathologie). Il n'y a pas de test dont les caractéristiques soient assez bonnes pour permettre de le considérer comme un véritable gold standard.

b. Sensibilité et spécificité

La sensibilité (Se) d'un test est sa capacité à donner une réponse positive chez un individu réellement infecté. C'est la probabilité pour un individu d'être positif au test étudié quand il fait partie de la population infectée. Une forte sensibilité induit donc peu de résultats faux négatifs (i.e individu infecté non détecté).

La spécificité (Sp) d'un test est sa capacité à donner une réponse négative chez un individu réellement indemne. C'est la probabilité pour un individu d'être négatif au test étudié quand il fait partie de la population non infectée. Une forte spécificité induit donc peu de résultats faux positifs (i.e individu sain dépisté positif).

c. Valeurs prédictives

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

La valeur prédictive positive (VPP) est la probabilité qu'une réponse positive au test corresponde bien à un individu réellement infecté (vrai positif). Elle est donc liée à la prévalence vraie de l'infection au sein de la population dont est issu l'individu testé et à la spécificité du test. Si cette dernière est faible alors la VPP est faible.

La valeur prédictive négative (VPN) est la probabilité qu'une réponse négative au test corresponde bien à un animal réellement indemne (vrai négatif). Elle est donc liée à la prévalence vraie de l'infection au sein de la population dont est issu l'individu testé et à la sensibilité du test. Si cette dernière est faible alors la VPN est faible.

d. Prévalence intra-troupeau

La prévalence correspond au nombre total de cas ou de foyers d'une maladie dans une population donnée, à un moment donné (prévalence instantanée) ou au cours d'une période donnée. La prévalence apparente est l'ensemble des animaux reconnus positifs par un test donné. La prévalence apparente est donc fonction de la sensibilité et de la spécificité du test. La prévalence vraie (PV) peut être calculée à partir de la prévalence apparente (PA) et des valeurs intrinsèques des tests diagnostiques (sensibilité, spécificité) selon la relation :

$$PV = (PA + Sp - 1) / (Se + Sp - 1).$$

Dans le cas de la paratuberculose, la prévalence vraie de l'infection par Map est généralement très supérieure à la prévalence apparente, principalement en raison d'une sensibilité très médiocre vis-à-vis des stades précoces de l'infection.

e. Tableau bilan

Tableau 3 : Sensibilité, spécificité et valeurs prédictives d'un test avec VP = vrais positifs, FP = faux positifs, FN = faux négatifs et VN = vrais négatifs

| | | GOLD STANDARD | | | |
|--------|----------|---------------------------|---------------------------|----------------------|----------------------------|
| | | Infectés vrais | Indemnes vrais | | |
| TEST X | Positifs | VP | FP | Prévalence apparente | $VPP = \frac{VP}{VP + FP}$ |
| | Négatifs | FN | VN | | $VPN = \frac{VN}{VN + FN}$ |
| | | Prévalence réelle | | | |
| | | $Se = \frac{VP}{VP + FN}$ | $Sp = \frac{VN}{VN + FP}$ | | |

f. Prévalence des troupeaux infectés

Un troupeau est généralement considéré comme infecté lorsqu'au moins un individu y est détecté positif. La sensibilité troupeau correspond à la probabilité de détecter au moins un animal positif dans un troupeau lors de l'application d'un test de dépistage aux animaux d'un troupeau supposé infecté. Ainsi, plus la prévalence individuelle est forte, plus la probabilité de détecter au moins un animal positif est forte. La sensibilité à l'échelle du troupeau (Se_T) peut être calculée à partir de la sensibilité individuelle : $Se_T = 1 - (1 - Se)^n$, avec n, le nombre d'animaux infectés dans l'échantillon testé (donc fonction de la prévalence vraie). Ainsi, pour un même test, la sensibilité troupeau est supérieure à la sensibilité individuelle.

Cependant, l'application d'un test dont la spécificité est non parfaite à plusieurs animaux, conduit très rapidement à l'apparition de faux positifs, même pour une spécificité très forte (>97%). Ainsi la spécificité à l'échelle du troupeau (Sp_T) est toujours inférieure ou égale à la spécificité individuelle : $Sp_T = 1 - Sp^N$ où N est le nombre d'animaux testés.

2- Modalités d'utilisation des tests

a. Facteurs de variations de la sensibilité et spécificité des tests

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

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

b. Notions de seuil de positivité et de détectabilité

La sensibilité et la spécificité d'un test sont déterminées en fonction d'une valeur seuil différenciant les résultats considérés positifs (supérieurs à cette valeur seuil), et négatifs ou douteux (inférieurs).

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

Il est important de distinguer le seuil de positivité du seuil de détectabilité qui, dans la plupart des cas sont différents. Ce dernier correspond à la concentration d'agent pathogène ou de marqueurs de l'infection (comme les anticorps ou interférons γ) la plus faible détectable par le test. Le seuil de détectabilité est très variable selon les tests mais est invariable pour un test donné fixé, il dépend de la capacité du test contrairement au seuil de positivité qui est fixé par l'opérateur et qui peut être modifié.

3- Principaux examens de laboratoire pour le diagnostic individuel de la paratuberculose

La nature chronique de l'infection avec une longue phase latente (subclinique) avant l'apparition des symptômes implique que l'animal traverse une ou plusieurs phases de l'infection dont : réactions immunologiques, changements pathologiques et symptômes cliniques. La complexité de la physiopathologie de la paratuberculose en fait une maladie difficile à identifier tout en donnant plusieurs opportunités de succès pour différents tests diagnostics en explorant des événements asynchrones. Ainsi, l'intermittence de la présence de Map dans les fèces et les fluctuations des taux d'anticorps couplées aux limites intrinsèques des tests multiplient les situations, tant à l'échelle individuelle que collective, souvent assimilées à tort à des incohérences entre les méthodes d'analyses.

Les performances des outils disponibles au laboratoire ne sont ni meilleures ni moins bonnes que celles des tests employés pour d'autres maladies infectieuses du bétail. Lorsque les tests sont employés pour le diagnostic d'animaux cliniquement atteints, leurs caractéristiques, en particulier leur sensibilité, sont globalement bonnes à très bonnes.

a. Méthodes de choix en fonction du stade de l'infection

De nos jours, les principales techniques de diagnostic de laboratoire de la paratuberculose sont la culture fécale, la détection du génome bactérien par PCR (Polymerase Chain Reaction) et la sérologie en ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Nous aborderons ici ces trois techniques, les autres étant soit obsolètes (fixation du complément), soit de sensibilité et/ou de spécificité insuffisantes (coloration de Ziehl-Neelsen, intradermo-réaction ou test interféron-gamma).

L'évolution de l'infection par Map au cours du temps est complexe et est très individu dépendant. Elle est notamment fonction de la réponse immunitaire développée par l'animal et de l'environnement.

Ainsi, dans le cas de la paratuberculose (figure 5) :

- Les tests directs détectent la présence de l'agent pathogène dans le prélèvement (fèces, lait, colostrum) et dans l'environnement. L'intermittence de l'excrétion et la répartition hétérogène de Map dans les matrices sont à l'origine de résultats faussement négatifs, et diminuent donc la sensibilité de ces tests. A l'inverse, l'excrétion passive (passage digestif de Map ingérée à partir de matières contaminées, sans multiplication chez l'individu) est à l'origine de résultats faussement positifs et diminue donc leur spécificité.

- Les tests indirects mettent en évidence la réaction immunitaire, à médiation cellulaire (RIMC) ou humorale (RIMH), de l'organisme suite à l'infection par un agent pathogène.

- * Les tests indirects basés sur la RIMC permettent de détecter l'infection précocement. On observe des réactions croisées entre les différentes mycobactéries, à l'origine de résultats faussement positifs donc d'une spécificité diminuée de ces tests. Dans les formes multibacillaires, la RIMC s'effondre au bout de quelques mois et rend probablement ces tests peu sensibles vis-à-vis des stades subcliniques avancés et/ou cliniques.

- * Les tests indirects basés sur la RIMH détectent la paratuberculose plus tardivement (faible sensibilité vis-à-vis des stades subcliniques). Ces tests peuvent détecter des anticorps vaccinaux (Lafort et al., 2015), ce qui est à l'origine de résultats faussement positifs et diminue la spécificité de ces tests. Par ailleurs leur spécificité est rendue imparfaite par l'existence de réactions croisées avec des Mycobactéries environnementales (Nielsen et al., 2002).

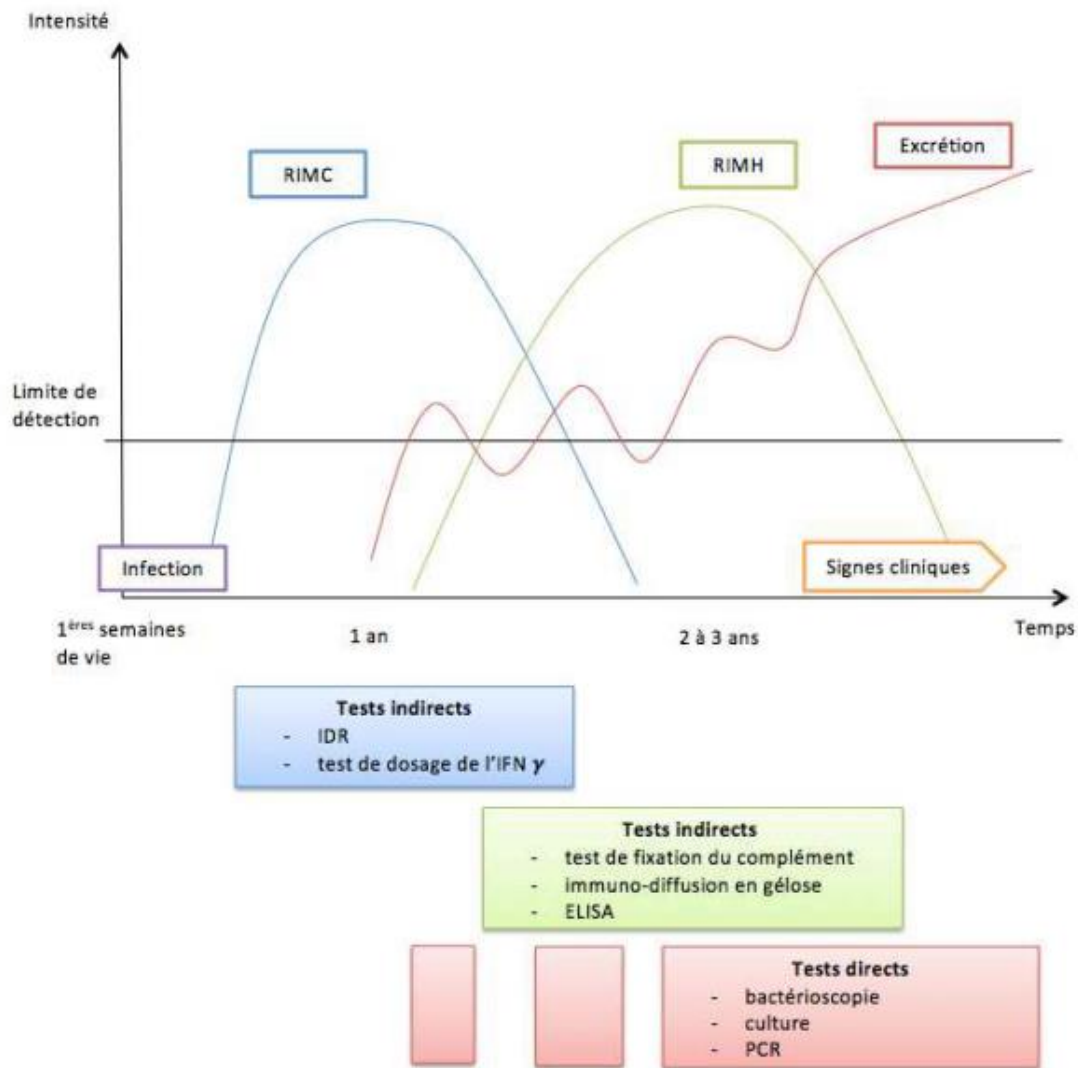


Figure 5 : Représentation théorique des événements suivant la contamination par *Map* et tests employables pour détecter la paratuberculose. Les dates d'apparition et l'intensité sont indicatives et varient en fonction de l'espèce, de l'individu, de l'âge auquel il a été infecté et de la pression d'infection (d'après Grébert, 2013).

b. Méthodes directes de détection de *Map*

Les tests directs décrits ci-dessous permettent de détecter la bactérie ou son ADN à partir d'échantillons de fèces. La sensibilité épidémiologique de ces tests est influencée par le niveau d'excrétion fécale, le caractère intermittent de cette dernière ainsi que la variabilité de la répartition des bactéries dans les fèces.

1. Culture bactériologique

La culture bactériologique est actuellement standardisée (NF U47-103), utilisée comme test de référence de la recherche de l'infection par *Map*. Il s'agit de mettre en évidence la croissance de *Map* après ensemencement d'un milieu solide ou liquide. La culture peut se faire à partir de fèces, de lait ou de tissus (paroi iléale, ou nœuds lymphatiques mésentériques).

Elle permet de détecter les individus infectés excréteurs au sein d'un troupeau, qu'ils soient symptomatiques ou asymptomatiques.

1.1. Coproculture

La coproculture individuelle fournit une analyse semi-quantitative de l'excrétion fécale permettant de définir un niveau d'excrétion fécale (Whitlock, 2006) :

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

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

Dans cette même étude, les auteurs soulignent l'importance de la composition de la population cible avant de sélectionner un test diagnostique spécifique pour un objectif fixé. Ils concluent que la coproculture est utile pour confirmer un test ELISA positif (Se de 60-70%) mais pas dans un but de screening (20-25%).

L'étude de Kostoulas et al. (2006) a estimé la sensibilité et spécificité d'une méthode de coproculture chez les ovins à respectivement 16% (IC à 95% [2, 48%]) et 97% [95, 99%].

Ainsi, chez les ovins, la culture fécale est très (mais pas totalement) spécifique mais très peu sensible pour la détection de l'ensemble des stades de l'infection.

1.2. Culture bactériologique sur échantillon de lait individuel

Pillai et Jayaro (2002) estiment que le seuil de détection se situe entre 10 et 100 UFC/mL. Ils estiment aussi que dans le lait la culture détecte 10 fois moins de troupeaux infectés que la qPCR (respectivement 6% et 68%). Cela s'explique par le fait que la culture permet de détecter uniquement les bactéries vivantes capables de se multiplier. Or la présence de Map dans le lait est majoritairement due à une contamination par les matières fécales donc des bactéries inertes. Par ailleurs le lait est une matrice difficile à travailler dans le cadre de la culture (nombreux inhibiteurs, matière grasse...).

2. PCR sur fèces

L'amplification génique (PCR) consiste à détecter une séquence d'ADN spécifique de Map.

Par son principe même, la PCR ne permet pas de savoir si les bactéries mises en évidence sont vivantes ou non.

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.

Une fois le matériel génétique extrait, il est mis en présence des enzymes et substrats nécessaires à l'amplification de la séquence recherchée. Un thermocycleur, qui fait varier de manière automatisée la température du mélange, permet d'amplifier la séquence d'intérêt (IS 900, F57, ISMAP02, hspX par exemple pour Map).

La PCR en temps réel (ou qPCR) utilise le principe de base de la PCR classique (amplification cyclique d'un fragment d'ADN, basée sur une réaction enzymologique) avec pour différence une amplification mesurée tout au long de la réaction et non à la fin. Le résultat d'une qPCR est exprimé en cycle threshold (Ct), qui correspond au nombre de cycles thermiques nécessaires pour détecter la présence de la séquence cible dans l'échantillon. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc la quantification de l'ADN alors que la PCR classique ne donne que la mesure finale.

La PCR est actuellement utilisée en confirmation de la culture (qui ne détecte que les bactéries vivantes, la rendant donc moins sensible) ou en première intention pour le diagnostic individuel. En 2011, Kawaji et al. ont démontré que la qPCR avait une sensibilité significativement plus élevée pour la détection de Map dans les matières fécales de moutons inoculés par rapport à la culture fécale.

Chez les bovins, les différents protocoles de PCR décrits dans la littérature ont une sensibilité comprise entre 23% et 30% pour une spécificité d'environ 100%. Chez les ovins, les études sont manquantes. Les performances d'une qPCR (Adiavet™ paratb real time, Adiagène) appliquée sur les fèces pour le diagnostic de la paratuberculose chez des ovins infectés subcliniques âgés de 2 à 3 ans ont cependant été très récemment évaluées dans des élevages français sur un grand nombre d'animaux (1200) (Mathevon et al 2017). La sensibilité a été estimée à 47.5% [29.3 – 69.9] et la spécificité à 99.0% [97.9 – 99.9].

Le principal avantage de la PCR est sa rapidité de mise en œuvre: 1 à 3 jours. Le coût de la PCR est élevé, environ 35 euros.

3. Bactérioscopie

Plus anecdotique, la bactérioscopie est l'observation au microscope d'étalement de matières fécales sur des lames après une coloration de Ziehl-Neelsen. Les Mycobactéries étant des bacilles acido-alcoolo résistants, elles apparaissent roses sur fond bleu, et la lame est considérée positive si on observe des bacilles regroupés en amas de plus de trois.

Cette technique fournit uniquement un résultat qualitatif (présence ou absence) et ne permet de détecter que les individus infectés excréteurs symptomatiques et n'est donc pas utilisée à l'échelle du troupeau dans le cadre d'un dépistage.

Le principal avantage de la bactérioscopie est son faible coût d'environ 5 euros.

c. Méthodes indirectes de détection de Map

Les méthodes de dépistage indirectes 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 (figure 5).

1. Détection de la réaction immunitaire à médiation humorale : sérologie ELISA

Plusieurs tests sont disponibles (ELISA indirect, fixation du complément, immunodiffusion en gélose) mais la méthode ELISA est aujourd'hui la méthode la plus sensible et la seule utilisée en examens de routine en France. Ainsi, les méthodes de fixation du complément et d'immunodiffusion en gélose ne seront pas présentées.

1.1. Principe de la sérologie ELISA

Le test ELISA indirect (test immuno-enzymatique) met en évidence la présence d'anticorps anti-Map dans le sérum des ovins testés. Le principe du test ELISA repose sur la formation et la détection de complexes immuns, couplée à une réaction colorée permettant la révélation de la détection.

La RIMH n'est le plus souvent détectable qu'en même temps que ou postérieurement à l'excrétion fécale et au début des signes cliniques. Ainsi, la sérologie ELISA permet de détecter les individus infectés très souvent excréteurs et symptomatiques. C'est un test de dépistage plutôt tardif. Milner et al. (1990) montrent que lors d'une infection expérimentale de veaux par Map, un minimum de 10 mois est nécessaire avant que les animaux séroconvertissent et soient ainsi positifs à l'ELISA.

1.2. Etapes de la sérologie ELISA

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, un complexe antigène-anticorps-conjugué-enzyme sera alors fixé au fond du puits. 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. L'intensité de la coloration est objectivée à l'aide d'un spectrophotomètre qui mesure la densité optique (DO).

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, il n'y a donc pas de coloration.

Les résultats sont ensuite exprimés relativement aux densités optiques des témoins positifs et négatifs inclus dans la microplaque. Ils sont exprimés sous la forme d'un rapport (S/P) du signal de l'échantillon testé (sample « S ») sur le signal du contrôle positif (positive « P »). Les résultats sont ensuite interprétés en résultats positifs ou négatifs selon une valeur seuil choisie au préalable et déterminée par le fabricant. C'est donc une méthode semi-quantitative sur une plage de lecture.

1.3. Sensibilité et spécificité de la sérologie ELISA

Dans leur étude, Kostoulas et al. (2006) ont estimé la sensibilité et spécificité d'une trousse ELISA IDEXX chez les ovins à 37% (IC à 95% [10, 80%]) et 97% [93, 99%], respectivement).

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 quel que soit le stade de la maladie. Ces données sont appuyées par une étude de Milner et al. (1990) qui ont eux aussi calculé la sensibilité et spécificité de l'ELISA (*M. phlei* absorbé), en utilisant comme référence des coprocultures répétées ou l'histopathologie post-mortem sur 327 bovins pour déterminer la présence ou absence de l'infection. Dans les conditions de terrain la sensibilité et spécificité étaient respectivement de 57% et de 98,9%. Ils constatèrent cependant que la sensibilité dépendait du stade de la maladie de l'animal testé. Par exemple, quand le test était appliqué à un troupeau infecté, la sensibilité de l'Elisa était seulement de 57%, alors qu'elle augmentait à 83% chez les animaux sélectionnés pour présentation de symptômes .

Chez les bovins, Tavoranpanich et al. (2008) ont estimé par simulation, la sensibilité troupeau d'une trousse ELISA IDEXX selon la prévalence intra-troupeau. Des échantillons de 30 vaches étaient prélevés dans des troupeaux à prévalences variables. Par exemple, pour un troupeau de prévalence égale à 5% une sensibilité de 0,82 était calculée contre 0,90 dans un troupeau de prévalence égale à 35%.

Par ailleurs, Whitlock et al. (2000) mettent en évidence sur des vaches laitières qu'ELISA a une meilleure sensibilité chez les animaux ayant une plus forte charge bactérienne, i.e les forts excréteurs (Se de 75%) par rapport aux faibles excréteurs (Se de 15%). Ils concluent ainsi que tester de manière répétée les troupeaux infectés permet d'identifier une proportion plus importante de faibles excréteurs qui ont plus de chance d'être testés négatifs à l'ELISA. Cependant, la sensibilité de l'ELISA diminue avec la répétition des tests des troupeaux au cours du temps étant donné que les forts excréteurs seront éliminés en premier des troupeaux.

Ainsi la sensibilité et la spécificité des tests ELISA varient en fonction de la trousse utilisée, du statut clinique et de l'excrétion fécale des animaux testés ainsi que de la prévalence intra-troupeau.

Très récemment Mathevon et al (2017) ont évalué, dans des élevages français et sur un grand nombre d'animaux (1200), la sensibilité et la spécificité de deux trousse ELISA (IDEXX Paratuberculosis Screening Ab Test et ID Screen Paratuberculosis Indirect-IDVet) pour le diagnostic de la paratuberculose chez des ovins infectés subcliniques âgés de 2 à 3 ans. Les résultats sont aussi en faveur d'une faible sensibilité (entre 17 et 18%) et d'une spécificité non parfaite (entre 94 et 95%).

1.4. Diversité des trousse commerciales

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.

1.5. Discordance entre les trouses

Dans son étude menée sur un large échantillon de brebis du Lot, Hugnet (2017) met en évidence des résultats discordants assez fréquents entre trouses ELISA chez les ovins, que l'on considère 2 trouses ELISA provenant de 2 fabricants différents (IDEXX et IDVet) ou 2 lots de fabrication d'une même trousse (IDVet). Il obtient des pourcentages de discordances variant de 2,55 % à 4,69 % sur l'ensemble des échantillons analysés (donc la très grande majorité a donné des résultats négatifs aux 3 trouses). Cependant en ne considérant que les échantillons positifs à au moins une des 3 trouses, le taux de discordance était beaucoup plus important (43.7 %, 51.2 % et 59 % entre les 3 trouses), résultant dans des coefficients kappa de Cohen de concordance mauvais (<0,2) à médiocres (de 0,2 à 0,4). Par ailleurs, les valeurs S/P des tests ayant donné des résultats discordants sont significativement plus proches des seuils de décision fixés par les fabricants que de celles des concordants.

Hugnet évoque une différence de sensibilité entre les différents tests ELISA pour expliquer en partie les résultats discordants mais n'exclut pas un défaut de spécificité. D'après lui, l'absence de gold standard dans le diagnostic de la paratuberculose ne permet pas de privilégier l'une ou l'autre de ces hypothèses.

1.6. ELISA sur lait individuel

Les protocoles ELISA sur sérum ont été adaptés pour une détection des anticorps dans le lait.

Lavers et al (2015) ont évalué les performances diagnostiques de 3 trouses ELISA A, B et C sur des échantillons de lait individuels (A : Prionics AG, Schlieren-Zürich, Suisse ; B : Mycobacterium paratuberculosis antibody test kit, Idexx Laboratories Inc., Westbrook, ME ; C : Paratuberculosis Indirect IDvet Innovative Diagnostics, Montpellier, France). En comparaison à la culture fécale en mélange, les sensibilités troupeaux des tests ELISA sur lait étaient de 59% (A), 56% (B) et 63% (C). Les spécificités troupeaux, elles, étaient de 80% (A), 96% (B) et 92% (C) respectivement. Plus précisément, la sensibilité troupeau de l'ELISA B augmentait avec la prévalence de Map : celle-ci étant de 11% pour une prévalence de 1%, et de 62% pour une prévalence 5%.

Dans cette même étude, Lavers et al (2015) ont fait des prélèvements à 6 mois d'intervalles et obtiennent pour l'ELISA sur lait une sensibilité de 22.0% et 32.6% pour des prélèvements uniques ou répétés respectivement. Les spécificités correspondantes étaient de 99.6% et 99.2%. Pour un intervalle de 12 mois, la sensibilité était meilleure (25.6% et 45.3%) et la spécificité semblable (99.6% et 98.9%). Ils conclurent ainsi que la répétition des prélèvements augmente les chances de détection de vaches infectées et limite le risque de classification erronée par rapport à un prélèvement unique. Huda et al (2005) précisent eux aussi dans leur étude que l'ELISA sur lait de vaches de plus de 3 ans présentait des

performances diagnostiques significativement meilleures lors de prélèvements répétés que lors d'un prélèvement unique.

Kostoulas et al (2013) se sont intéressés à la capacité de l'ELISA sur lait à discriminer des vaches saines/infectées (sans signes cliniques)/infectieuses (avec signes cliniques). Le test s'est avéré très peu performant pour discriminer les animaux sains des animaux en phase d'incubation (infectés) mais performant pour discriminer les animaux sains des animaux présentant des symptômes.

Van Weering et al. (2007) ont estimé une sensibilité relative (échantillons individuels de lait comparée au sérum) de 87% pour un seuil S/P de 20%, et 80% pour un seuil S/P de 30%. La sensibilité de cet ELISA pour la détection de forts excréteurs était supérieur à 90% que ce soit sur lait ou sur sérum. Ils obtiennent une spécificité de 99.8% à un seuil S/P de 20%, clairement plus bas que le seuil défini par le fabricant (30% S/P). Les auteurs soulignent que les résultats d'ELISA individuels sur le lait et le sérum sont fortement corrélés.

Angelidou et al (2016) montrent que l'ELISA (IDEXX Paratuberculosis Screening Ab) sur sérum et sur lait ont des sensibilités et spécificités comparables sur 854 brebis laitières grecques tout au long de la lactation, en utilisant le seuil recommandé par le fabricant. Aux seuils S/P optimaux (déterminés par analyses ROC, de 45% et 20% pour l'ELISA sur sérum et lait respectivement), ils obtiennent une sensibilité comprise entre 46% et 49% pour l'ELISA sur sérum et entre 45% et 49% pour l'ELISA sur lait selon le stade de lactation des brebis. Les spécificités correspondantes, aux mêmes seuils, étaient de 93-95% et 92-94% pour l'ELISA sur sérum et lait respectivement. Winterhoff et al (2002), eux aussi, obtiennent une corrélation significative entre les deux types d'ELISA. Au seuil optimal calculé par analyse ROC, la sensibilité et spécificité de l'ELISA sur lait étaient respectivement de 60.9% et 94.6%. Ces résultats sont appuyés par ceux de Ngwa et al. (2016) qui ont prélevé 697 brebis élevées dans des exploitations laitières infectées par la paratuberculose pour comparer les performances diagnostiques d'ELISA sur lait et sur sérum. Une différence de prévalence non significative (7,75% et 5,31%, $P = 0.065$) a été constatée entre les prélèvements de sérum et de lait respectivement. Ils ont ainsi mis en évidence une corrélation entre les résultats des tests ELISA réalisés sur lait et sur sérum, quel que soit le stade de lactation. Les prévalences apparentes obtenues sur sérum n'étaient pas statistiquement plus élevées que celles obtenues à partir du lait, ce qui est en accord avec les études de Hendrick et al. (2005) et Salgado et al. (2007) menées chez les bovins et les caprins respectivement.

Par ailleurs, dans ces deux études les résultats des échantillons de lait avaient une plus forte corrélation avec les résultats de culture fécale, qu'en avaient les résultats des échantillons de sérums. Beaver et al (2017) ont aussi constaté une forte association entre la densité optique de l'ELISA sur lait, la qPCR sur fèces et la culture fécale individuelles dans 2 troupeaux bovins laitiers à faible prévalence.

En revanche une différence significative a été mise en évidence entre la positivité aux anticorps anti-MAP du lait prélevé en début ou fin de lactation et du lait prélevé au pic de lactation (respectivement 7,8% et 3,7%, $P = 0,021$). Une autre étude (Lombard et al., 2006) confirme qu'en début de lactation (2 premières semaines) et fin de lactation (après la semaine 45) les vaches avaient plus de chance d'être positives en sérologie ELISA sur lait

qu'en milieu de lactation. Ainsi, considérant l'importance d'un diagnostic précoce, l'ELISA sur lait pourrait être une alternative valide en début et fin de lactation.

Les tests ELISA sur lait et sur sérum sont équivalents en termes de temps de travail au laboratoire, mais représentent un gain de temps important pour ce qui est de la récolte des échantillons. Ainsi, en l'associant à la traite chez les vaches/chèvres/brebis laitières, l'ELISA sur lait pourrait être une méthode moins laborieuse et moins coûteuse par rapport à l'ELISA sur sérum. Les auteurs précisent que l'ELISA sur lait pourrait aussi être une solution pour du dépistage à l'échelle du troupeau en le réalisant sur échantillons de lait de tank.

Pour conclure, les performances diagnostiques de la sérologie ELISA sur des échantillons de laits individuels créent des opportunités pour un dépistage plus réalisable. Cette technique est d'ores et déjà mise en place à large échelle au Danemark dans l'ensemble des troupeaux bovins laitiers.

2. Détection de la réaction immunitaire à médiation cellulaire

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

Ces tests permettent de détecter précocement les animaux infectés (Huda et al., 2004), 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.

Cependant ces tests ne sont pas utilisés en routine pour le dépistage et le diagnostic de la paratuberculose en France.

2.1. Intradermo-réaction

Le principe de l'intradermo-réaction (IDR) est de provoquer une réaction d'hypersensibilité retardée chez les individus infectés par Map. Pour cela, un extrait de *M. avium* ou de *M. bovis* est injecté dans le derme de l'animal et une réaction inflammatoire est recherchée 72h plus tard. L'épaississement du pli de peau de 3 mm ou plus sera signe d'un test positif.

2.2. Test à l'interféron gamma

Le test interféron gamma (IFN γ) consiste à quantifier la réponse cellulaire en mesurant la quantité d'interféron γ produite par les lymphocytes en présence d'un extrait de Map. C'est un test in vitro qui se réalise sur un prélèvement de sang total.

Ce test est basé sur le fait que les lymphocytes d'un animal infecté par Map reconnaîtront l'antigène spécifique, seront stimulés et produiront de l'IFN γ , alors que ceux d'un animal sain ne seront pas stimulés et ne produiront pas d'interféron. Ce test ne permet cependant pas de distinguer les animaux infectés par Map et ceux qui y sont exposés sans être infectés (Mortier et al., 2015).

d. Tableau bilan : comparaison de la coproculture, la PCR et l'Elisa

Tableau 4 : Comparaison des différents tests de dépistage (modifié d'après le rapport AFSSA sur la paratuberculose des ruminants, 2009)

| | Culture fécale | PCR | ELISA indirect |
|---|--|--|--|
| Dépistage des animaux infectés non excréteurs (stade précoce) | Non | Non | +/- |
| Dépistage des animaux infectés excréteurs asymptomatiques | ++/+++ (sensibilité 10 ² 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 |

4 - Utilisation des tests sur mélanges ou prélèvements environnementaux

Afin de diminuer les coûts de dépistage et face au besoin d'établir le statut sanitaire des troupeaux (qualification des troupeaux), des méthodes de diagnostic à partir de mélanges de prélèvements individuels (lait, sérum, fèces) ou de prélèvements environnementaux ont été développées.

Les enjeux sont d'obtenir une sensibilité troupeau et une spécificité troupeau les plus élevées possibles, à un coût de mise en œuvre raisonnable.

Dans le cas de tests sur mélanges, les risques d'erreur vont être majorés par la faible prévalence intra-troupeau (< 5%), et par le défaut de sensibilité des tests disponibles pour la détection des formes sub-cliniques. La taille de l'échantillon au sein du troupeau et sa représentativité feront aussi partie de la stratégie diagnostique. Plus cet échantillon est grand, plus la valeur de la prévalence apparente sera représentative de la prévalence réelle de l'infection au sein de la population étudiée mais plus le coût sera élevé.

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

considèrera comme un grand mélange un mélange auquel la majorité des animaux du troupeau participe (par exemple, le lait de tank est un mélange du lait des animaux en lactation) et petit mélange un mélange auquel un nombre restreint d'animaux du troupeau participe (par exemple, des petits mélanges de fèces constitués de cinq à cinquante échantillons individuels).

a. Tests sur mélange de matières fécales

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

1. Coproculture sur mélange de fèces

L'utilisation de mélanges en coproculture a peu d'effet sur la spécificité troupeau car la spécificité du test est proche de 100%, et la sensibilité troupeau est supérieure à 70%. Cependant, la sensibilité varie en fonction de la taille du mélange, la prévalence intra-troupeau, la taille du troupeau et du niveau d'excrétion des animaux constituant le mélange.

Une étude (Eamens et al., 2007) a permis d'évaluer la valeur informative de la culture de mélanges de fèces individuelles pour le diagnostic de la paratuberculose caprine à l'échelle de l'élevage. La culture radiométrique en milieu liquide, avec 10 semaines d'incubation, a détecté 13 des 16 mélanges contenant un échantillon positif parmi 25. Les échantillons des mélanges positifs provenaient tous de chèvres excréant plus de 2×10^4 Map par gramme de fèces. Les auteurs conclurent que la culture de mélanges composés de 25 échantillons individuels pourrait constituer un outil de diagnostic pour contrôler la paratuberculose caprine.

En Australie, la coproculture en mélange (CCM) est une méthode déjà largement répandue pour les programmes de contrôle de la paratuberculose ovine, étant clairement moins chère que la coproculture individuelle et plus sensible que la sérologie. Ainsi, une étude de Whittington et al. (2010) a mis en évidence que la sensibilité troupeau de la CCM chez les ovins dépend du type de lésions histopathologiques et du niveau de prévalence. Elle est considérablement plus élevée chez les ovins présentant des lésions multibacillaires (Se > 90%) que paucibacillaires (Se variable selon la taille du mélange). Par ailleurs, la sensibilité troupeau augmentait avec la taille du mélange quelle que soit la prévalence.

Les auteurs ont ainsi identifié 3 facteurs améliorant la sensibilité troupeau : la prévalence, le ratio multibacillaire/paucibacillaire et le nombre de mélanges réalisés par troupeau. Les résultats suggèrent que tester 7 mélanges de 50 est adapté à la plupart des scénarios. Pour des prévalences très faibles, la sensibilité troupeau pouvait être améliorée en augmentant le nombre de mélanges testés. De façon générale, une sensibilité troupeau plus élevée peut être obtenue en augmentant la taille des mélanges.

Ces données sont en accord avec une étude dans laquelle Sergeant et al. (2002) ont estimé la sensibilité troupeau (Se_T) de la CCM et la sérologie individuelle en utilisant l'immunodiffusion en gélose (AGID) pour la détection de la paratuberculose ovine. Les 2 tests ont été comparés dans un travail sur 296 troupeaux de la New South Wales. La sensibilité troupeau globale de la CCM était de 92% (IC à 95% [82.4 - 97.4%]) comparé à 61% [50.5 - 70.9%] pour la sérologie (en admettant que les 2 tests étaient 100% spécifique). Dans les troupeaux à faible prévalence (prévalence estimée < 2%), les sensibilités troupeau de la CCM et de la sérologie étaient de 82% [57 - 96%] et 33% [19 - 49%], respectivement, par rapport à 96% [85-99.5%] et 85% [72 - 93%], respectivement, dans des troupeaux à haute prévalence (prévalence estimée > 2%). La spécificité troupeau minimum estimée de la CCM utilisée pour le dépistage était de 99.1% [96.9 -99.9%].

Ces résultats confirment que la coproculture sur mélange est un test pour troupeau très sensible et spécifique pour la détection de la paratuberculose ovine et clairement plus sensible que la sérologie individuelle (AGID), la différence étant d'autant plus prononcée dans les troupeaux ayant apparemment une prévalence basse. Pour la CCM, le prélèvement de 350 ovins par troupeau pour la surveillance devrait donner une sensibilité troupeau de 95% dans les troupeaux ayant une prévalence supérieure à 2% et une sensibilité troupeau plus faible mais toujours acceptable dans les troupeaux à faible prévalence.

Dans une autre étude menée en Australie, Whittington et al. (2000) ont évalué l'effet de dilution sur la sensibilité de la coproculture de Map chez les ovins. Dans un premier temps, ils ont considéré les échantillons de 20 moutons présentant une forme multibacillaire de la paratuberculose et 20 moutons présentant une forme paucibacillaire, chacune étant confirmée histologiquement. Tous les cas multibacillaires et 50% des paucibacillaires ont été détectés par culture d'un mélange de fèces à un taux de mélange de un infecté pour 49 moutons non infectés (soit une dilution des fèces contaminés au 50^{ème}). Dans un second temps, la coproculture en mélange était comparée à deux tests de sérologie en soumettant 335 fermes dans lesquelles les deux tests avaient été réalisés sur les mêmes moutons. La coproculture était significativement plus sensible ($P < 0.001$). Par ailleurs, une simulation informatique d'échantillonnage aléatoire indiquait que tester 6 mélanges de 50 moutons donnerait 95% de chances de détecter une prévalence d'infection supérieure à 2%.

2. PCR sur mélange de fèces

L'analyse par PCR de petits mélanges de fèces individuelles permet de détecter rapidement les animaux ayant un niveau d'excrétion élevé ($\geq 2 \times 10^5$ Map vivant/gramme de matière fécale), mais au-delà de 10 échantillons par mélange, la fiabilité diminue (Eamens et al, 2007).

Delbrouck (2008) a analysé les sensibilité et spécificité troupeau de l'analyse par PCR (IS900) de petits mélanges de fèces. Les échantillons étaient groupés par 5, selon le rang de lactation. L'analyse par PCR de petits mélanges de fèces de 5 vaches en première lactation permet de discriminer les troupeaux possédant des vaches excrétrices et des vaches séropositives des autres, avec une sensibilité de 0,62 et une spécificité de 0,96.

b. Tests sur mélange de lait

1. ELISA sur lait de mélange

1.1. ELISA sur lait de petits mélanges

Delbrouck (2008) a analysé les sensibilité et spécificité troupeau de l'analyse de petits mélanges de laits par ELISA chez les bovins. Les échantillons individuels étaient groupés par 5, selon le rang de lactation.

L'analyse par test ELISA de petits mélanges de laits de 5 vaches en deuxième lactation permet de discriminer les troupeaux possédant des vaches excrétrices et des vaches séropositives des autres, avec une sensibilité de 0,74 et une spécificité de 0,95.

Une autre étude menée par Græsbøll et al. (2016) évalue différents protocoles de mélange (hiérarchique et non hiérarchique). Leur efficacité et les potentielles économies faites ont été déterminées comme une fonction de la prévalence et du nombre d'échantillons mélangés. La sensibilité d'ELISA sur des échantillons mélangés de lait de bovins pour *Salmonella Dublin*, *Mycobacterium avium spp.paratuberculosis* et BVD a été testée.

Le mélange hiérarchique est fait en plusieurs étapes mais chaque échantillon n'est mélangé qu'une fois par étape. Par exemple, le mélange standard a lieu en 2 étapes : les échantillons sont d'abord mélangés puis les échantillons des mélanges positifs sont testés individuellement. Dans la méthode à 3 étapes, les échantillons sont mélangés initialement et les échantillons de mélanges positifs sont alors divisés en un plus petit nombre de mélanges. Ce n'est qu'à la suite de cette 2^{ème} série de mélanges que les échantillons des mélanges positifs (à la 2^{ème} étape) sont testés individuellement. Cette méthode en 3 étapes est celle souvent utilisée pour le dépistage du VIH aux USA.

Le mélange peut aussi être fait de façon non hiérarchique de différentes dimensions. Cela signifie que tous les mélanges sont testés simultanément : idéalement, il serait inutile de retester pour localiser les échantillons positifs. En théorie ce principe peut être étendu dans des dimensions infiniment grandes. Cependant il y a un risque que le nombre d'échantillons testés positifs dépasse la capacité du test non hiérarchique ce qui nécessiterait alors de retester les échantillons individuellement.

Ainsi, la sensibilité d'un ELISA (ID Screen Paratuberculosis Indirect, Idvet, Grabels, France) commercialement disponible sur des échantillons de lait de bovins mélangés pour la détection d'anticorps anti-MAP a été évaluée de la manière suivante. Les tests Elisa ont été réalisés selon les instructions du fabricant. Les échantillons de lait préalablement testés positifs étaient mélangés avec 4, 9, 24, 49, 99, 149 ou 199 échantillons négatifs soit dilués du 5^{ème} au 200^{ème}.

Les résultats montrent une diminution importante du pourcentage de positivité quand des échantillons positifs sont mélangés avec un nombre croissant d'échantillons négatifs. Les mélanges de plus de 25 échantillons contenant un échantillon positif présentaient une valeur S/P au niveau de celle des échantillons négatifs. Ainsi, la sensibilité diminuait rapidement lors d'une augmentation de la taille des mélanges. Une taille maximum de 5 par mélange donnerait un résultat positif au test. Les mélanges de plus de 5 pourraient mener à des mesures faussement négatives pour le lait.

Cependant les auteurs précisent que quel que soit le plan de mélange, il y a une taille de mélange optimale pour une prévalence donnée : dans leur cas, la prévalence attendue des échantillons individuels doit être inférieure à 30%, sinon l'utilisation du mélange n'a pas d'intérêt car il faut retester trop d'échantillons.

Par ailleurs, des tests doivent être réalisés initialement sur le kit en question utilisé et idéalement en combinaison avec un seuil alternatif défini pour maximiser le rapport Se/Sp afin de déterminer la taille du mélange à faire.

En termes d'économies globales, les 2 plans testés étaient potentiellement optimaux selon la prévalence, la taille de mélange possible et le coût pour tester de nouveau.

1.2. ELISA sur lait de tank

La sensibilité et la spécificité d'un test ELISA (Pourquier) ont été évaluées dans une étude (Van Weering et al., 2007) menée sur 383 échantillons de lait de tank. La méthode de référence était la sérologie individuelle et les troupeaux étaient classés en fonction de leur séroprévalence apparente. En utilisant le seuil recommandé par le fabricant du kit ELISA (valeur S/P de 30%), la performance de l'Elisa sur lait de tank était plutôt faible, correspondant à une sensibilité de 24% et une spécificité de 99%. Cependant à un seuil revu à 12.5% pour le lait de tank, et une séroprévalence intra-troupeau de 3%, la sensibilité et la spécificité étaient de 85% et 96%, respectivement. Ainsi, pour une séroprévalence intra-troupeau d'au moins 3% et pour un seuil de décision de l'ELISA fixé à 12,5%, ils obtenaient une VPP égale à 67 % et une VPN à 94%.

Cependant, Pesqueira et al (2017) ont analysé 203 échantillons de lait de tank avec deux kits ELISA (Idexx Paratuberculosis Screening Ab Test et Mycobacterium paratuberculosis test kit Parachek 2, Prionics AG) après avoir déterminé la séroprévalence apparente au sein des élevages par ELISA. La sensibilité du test sur lait de tank dans des troupeaux fortement infectés (séroprévalence $\geq 10\%$) était respectivement de 85,7 et 71,4%. La spécificité pour détecter des troupeaux sans animaux séropositifs variait de 70,5 à 53%. Ainsi, selon les auteurs, bien que les résultats du test fussent relativement bien corrélés à la prévalence intra-troupeau, la faible spécificité obtenue limite l'utilité pratique.

Nielsen et al (2000), ont eux aussi évalué la sensibilité d'un test ELISA (M. paratuberculosis souche 18, Allied Monitors, Fayette, Missouri, USA) adapté pour tester des échantillons de lait de tank provenant de 45 troupeaux bovins danois, en comparaison à des cultures fécales positives. La spécificité de ce test était évaluée sur 96 échantillons de lait de tank provenant d'élevages norvégiens, la Norvège étant considérée comme exempte de paratuberculose au moment de l'étude. Au seuil de l'ELISA statistiquement optimal, sa sensibilité était de 0,97 et sa spécificité de 0,83. Les auteurs concluent que les performances techniques de ce test ELISA ne sont pas suffisantes pour en faire un outil de surveillance car de faibles variations de densité optique peuvent faire changer le classement de l'échantillon.

Dans une autre étude (Lavers et al., 2014) dont un des objectifs était de déterminer l'impact de la prévalence intra-troupeau sur la performance des tests ELISA sur lait, les auteurs

conclurent que la sensibilité troupeau diminuait significativement lors d'une diminution de la prévalence. Inversement, alors que la spécificité troupeau était élevée, les troupeaux ayant moins de 2% de prévalence à l'Elisa sur lait, avaient des chances d'être faussement positifs. Ainsi, en cohérence avec les consensus d'experts disant que l'Elisa sur lait était plus approprié pour des programmes de contrôle dans des troupeaux à haute prévalence, les résultats présents n'ont pas appuyé l'utilisation de l'ELISA sur lait pour la détection de troupeaux infectés dans des populations présentant des prévalences intra-troupeau faibles. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Nielsen et al. (2014) qui démontre que les résultats ELISA de prélèvements répétés de lait de tank collectés à 1,5 mois d'intervalle sont hautement corrélés et significativement associés à la prévalence intra-troupeau de bovin.

Par ailleurs, Beaver et al (2016) précisent que l'ELISA sur le lait du tank n'est pas un bon indicateur de la contamination du lait de tank par Map et méritait d'être utilisé en combinaison avec la PCR pour identifier les exploitations à haut risque. En effet dans leur étude, malgré la concordance des titres élevés d'ELISA sur lait de tank avec les résultats positifs en PCR, une proportion importante d'exploitations ayant de tels résultats ELISA avait des résultats PCR sur lait de tank négatifs. Map peut se retrouver dans le tank par contamination environnementale ou par excrétion directement dans le lait. Ainsi des taux élevés en anticorps anti-Map (ELISA) peuvent être directement associés ou non à une excrétion de Map dans le lait. Dans le cas d'absence d'excrétion dans le lait, de tels résultats ELISA restent liés indirectement à la contamination environnementale du tank. De fait, des taux élevés d'anticorps anti-Map dans le lait témoignent d'une exposition des animaux à Map et donc d'une charge bactérienne dans l'environnement qui peut contaminer le tank. Les auteurs suggèrent donc que les exploitants sont capables de maintenir un niveau d'hygiène satisfaisant malgré la présence de Map dans les troupeaux et ainsi limiter la contamination du tank.

Cazer et al (2013), eux, ont prélevé des échantillons de lait de tank dans 292 exploitations aux USA et mettent en évidence que les valeurs de l'ELISA sur lait de tank varient selon la saison de prélèvement avec un pic en été et de faibles titres en hiver. La mise en place ou non d'un plan de contrôle des vaches positives à Map est aussi un facteur de variation du taux d'anticorps mesuré dans le lait. Les auteurs précisent que des valeurs élevées d'ELISA Map dans le lait de tank peuvent être liées à une forte prévalence de Map dans le troupeau avec beaucoup de vaches contribuant à ces titres d'anticorps ou due à quelques vaches qui produisent de grandes quantités d'anticorps.

2. PCR sur le lait de grand mélange ou lait de tank

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

Herthnek et al. (2008), eux, considèrent que la détection de MAP par PCR dans le lait serait plus utile pour contrôler la présence de Map dans le lait, dans le but d'éviter l'exposition des consommateurs que pour évaluer la prévalence troupeau.

c. Tests sur prélèvements environnementaux

Compte tenu de la grande résistance de Map dans le milieu extérieur, de nombreux auteurs ont tenté de préciser les localisations à prélever préférentiellement pour identifier la présence du bacille. L'aire d'attente de la salle de traite, les couloirs de l'aire d'exercice, l'aire de stockage des effluents solides et les eaux usées ont été identifiés comme telles (Eisenberg et al. 2010, Lombarde et al. 2006). Dernièrement, Map a été mis en évidence dans les poussières accumulées et les filtres à air (extracteurs) (Eisenberg et al., 2012), suggérant que ces échantillons pourraient être utilisés pour le diagnostic de troupeau.

1. Culture sur prélèvements environnementaux

La grande résistance de Map dans l'environnement rend possible l'utilisation de prélèvements de matière fécale dans l'élevage pour la détection directe du pathogène.

Pour la culture en milieu solide, il y a une relation entre le nombre de colonies par milieu de culture et la prévalence intra-troupeau obtenue par culture de petits mélanges de fèces (Raizman et al., 2004).

La culture de prélèvements d'environnement n'est pas très sensible pour détecter les troupeaux à prévalence faible. Ainsi, Pillars et al. (2009) ont montré que lorsque la prévalence intra-troupeau était supérieure à 2%, Map était identifié par la culture de prélèvements réalisés sur l'aire d'exercice et/ou le fumier dans seulement 75% des cas. Quand la prévalence intra-troupeau était inférieure à 2%, aucune culture n'a été positive. Ainsi, la proportion de résultats positifs sur échantillons d'environnement est significativement corrélée au nombre d'individus séropositifs dans l'élevage suggérant que les prélèvements environnementaux puissent indiquer une estimation qualitative de la prévalence intra-troupeau, ce qui est en accord avec l'étude de Berghaus et al. (2006).

Sur la base de simulations, Tavoranpanich et al. (2008) ont estimé des sensibilités troupeaux pour différentes méthodes (ELISA, coproculture individuelle, en mélange et sur prélèvements environnementaux). Parmi les méthodes de tests évaluées avec 100% de spécificité troupeau, la culture sur prélèvements environnementaux était la méthode la plus rentable quelle que soit la prévalence intra-troupeau (5%, 16% ou 35%). La culture de 4 échantillons environnementaux par troupeau conduit à une sensibilité troupeau de 99% et 100% dans des troupeaux ayant une prévalence intra-troupeau de 16% et 35% respectivement, mais n'était pas suffisante pour atteindre 95% de sensibilité troupeau dans les troupeaux à faible prévalence (5%, $Se_T = 38%$) malgré la culture de 10 prélèvements environnementaux. Ils soulignent que la sensibilité troupeau est fortement associée à la prévalence intra-troupeau, au nombre de bactéries Map excrétées dans les fèces par les vaches infectées et au nombre d'échantillons testés. Ainsi, dans leur étude, les auteurs ont admis que chaque prélèvement environnemental était la contribution de manière

équivalente, des vaches infectées et non infectées partageant le même environnement. Cependant il est possible que les vaches présentant des signes cliniques de la paratuberculose (dont la diarrhée) ou excréant massivement des bactéries Map dans une phase préclinique couramment appelés « super-excréteurs » (Whitlock et al., 2005), contaminent leur environnement de façon plus fréquente ou plus étendue, à l'origine de meilleures sensibilités troupeaux sur prélèvements environnementaux.

D'après l'étude de Raizman et al (2004), conduite dans des exploitations laitières dans le Minnesota, la culture à partir d'échantillons prélevés dans l'environnement (aire d'exercice, aire de stockage des effluents solides, box de vêlage) permet d'obtenir des résultats similaires à ceux obtenus sur des mélanges de 5 de 100 échantillons de fèces pour établir le statut sain ou infecté d'un troupeau. La culture à partir de 2 échantillons environnementaux permet de détecter 78% des troupeaux infectés (contre 80% à partir des mélanges de 5). Cette approche semble cependant avoir une sensibilité faible dans les troupeaux à faible prévalence (<10 UFC/tube), mais reste suffisamment sensible pour la détection d'élevages contenant des individus forts excréteurs.

Dans leur étude, Berghaus et al. (2006) comparent, au sein de 23 élevages laitiers en Californie, la capacité de discrimination infecté/indemne des cultures sur échantillons (PE) prélevés dans trois sites de l'environnement (couloir de sortie de la salle de traite, autour des abreuvoirs, derrière les cornadis). Dans chacun des élevages, des sérologies individuelles étaient réalisées sur 60 vaches auxquelles étaient préalablement faites des coprocultures individuelles et en mélange (CC). Un élevage était considéré comme infecté selon la méthode ELISA lorsque plus de 3% des résultats individuels était séropositifs. Ils montrent que la proportion d'élevages détectés infectés (PE, 74% ; CC, 70% ; ELISA, 65%) n'est pas significativement différente pour ces trois méthodes. Par contre le prix total est respectivement de 5 et 13 fois plus élevé pour les ELISA et les cultures fécales.

Concernant la culture sur prélèvements environnementaux, Wolf et al (2015) se sont intéressés à l'influence de la zone de prélèvement dans l'exploitation, de la taille du troupeau et de la saison à laquelle étaient faits les prélèvements. Ils mettent en évidence dans leur étude que les prélèvements doivent être faits dans des zones où les fèces de nombreuses vaches s'accumulent et se mélangent. Ils ajoutent que la collecte devrait être réalisée au printemps ou été quand ces zones sont plus accessibles et que les échantillons ont plus de chances d'être positifs à Map. Berghaus et al. (2006) observent que les échantillons prélevés autour des abreuvoirs donnent significativement plus de résultats positifs (15/23; 65%) que ceux prélevés derrière les cornadis ou à la sortie de la salle de traite (respectivement 8/22, 36% et 9/23, 39%). Kruze et al. (2013) identifient quant à eux le couloir d'attente et la zone de stockage du fumier comme les 2 sites les plus fréquemment positifs à la culture environnementale (respectivement 35% et 33% des prélèvements positifs). Dans une autre étude Wolf et al (2014) ont estimé la sensibilité de la culture sur prélèvements environnementaux à 68%. Selon leurs résultats, les troupeaux de plus de 200 vaches avaient 3,54 fois plus de chances d'être positifs aux prélèvements environnementaux et avaient plus d'échantillons positifs que les troupeaux de moins de 50 vaches.

Lombard et al (2006) s'intéressent à la performance diagnostique de la culture sur prélèvements environnementaux pour déterminer le statut infectieux d'un troupeau en comparaison de coprocultures individuelles, sérologies individuelles et ELISA sur lait individuelle (troupeau considéré infecté si au moins un animal est testé positif dans le troupeau). 70.4% des troupeaux classés positifs par l'un des trois tests avaient au moins un prélèvement environnemental positif à la culture.

Ainsi, la culture sur prélèvements environnementaux fait aujourd'hui parti du programme VBJDPC (Voluntary Bovine Johne's Disease Control Program), mis en place aux Etats-Unis pour identifier les troupeaux à faible risque d'infection par Map. Les stratégies approuvées pour le screening initial de chaque troupeau nécessaire à la détermination préalable de leur statut incluent maintenant 3 alternatives (Tavornpanich et al., 2008) : (1) sérologies ELISA sur 30 vaches sélectionnées aléatoirement (> 3ans) (2) culture bactériologique de 6 échantillons environnementaux de 3 sites désignés ou (3) culture bactériologique de 10 mélanges de fèces (de 5 vaches > 3 ans).

Les prélèvements issus de matières fécales de l'environnement semblent donc de bons prédicteurs du statut du troupeau à moindre coût, et ne nécessitent aucune intervention sur les animaux. Cette approche permet de discriminer les élevages infectés contenant des animaux excréteurs des élevages indemnes ou infectés mais où l'excrétion ou la proportion d'animaux excréteurs est faible. Cependant la sensibilité de ces tests dépend clairement de la prévalence intra-troupeau. Les auteurs rappellent aussi que, en raison de la forte résistance de Map dans l'environnement, on peut avoir des résultats environnementaux positifs en culture malgré une forte diminution de la séroprévalence dans l'élevage.

2. PCR sur prélèvements environnementaux

Selon Delbrouck (2008), l'analyse par PCR (IS900) d'un prélèvement d'environnement constitué de fèces prélevées dans le parc d'attente de la salle de traite permet de discriminer les troupeaux possédant des vaches excrétrices et des vaches séropositives des autres, avec une sensibilité de 0,77 et une spécificité de 0,95.

D'après Eisenberg et al. (2010), les résultats de l'analyse des prélèvements environnementaux par PCR est représentative des résultats de la détection par la culture.

Arango-Sabogal et al. (2016) considèrent eux aussi les performances diagnostiques de la PCR comparables à la culture fécale mais ils se sont intéressés à l'utilisation de la PCR comme analyse complémentaire sur les échantillons de prélèvements environnementaux non interprétables (NI) par culture en milieu liquide. 154 échantillons environnementaux (62 NI, 62 négatifs, et 30 positifs) ont été analysés par PCR avant et après incubation sans prendre en compte les résultats à la coproculture. La PCR était significativement plus performante après culture qu'avant culture ($P = 0.004$). Cependant seulement 1.6% des échantillons non interprétables par culture étaient classés positifs à la PCR, améliorant ainsi peu les performances de la culture.

Roger et al. (2010) quant à eux recommandent de choisir la méthode utilisant la culture du type Para-Jem plutôt que la PCR pour détecter les troupeaux excréteurs.

d. ELISA sur mélange sérum

A notre connaissance aucune étude n'a été publiée sur l'utilisation de la technique ELISA appliquée à des mélanges de sérums pour le diagnostic de la paratuberculose. Brinkhof et al. (2006) se sont intéressés au diagnostic par sérologie en mélange chez les petits ruminants à partir du lentivirus de petits ruminants (Maedi-visna virus). Ils observent une sensibilité considérablement décroissante lors de la dilution des échantillons i.e quand la taille théorique du mélange augmente. En effet, en considérant qu'à la dilution 1 (standard) une sensibilité de 100% est obtenue, dès la dilution 4, la sensibilité diminue à 88%, puis à 70% pour la dilution 8. Ainsi en testant un sérum positif dilué 8 fois, simulant un mélange de 8, cela conduit à une perte de sensibilité de 30% chez les ovins. Face à la perte de sensibilité significative après dilution via les mélanges, en suivant les conditions du fabricant, ils décident de faire une pré-dilution plus faible que celle indiquée par le fabricant de la trousse ELISA.

Ainsi, dans un premier temps, une sélection d'échantillons fut soumise à des pré-dilutions de 1, 12,5, 25, 50 et 100. Leurs premiers résultats montrent que la discrimination entre les échantillons positifs et négatifs était même meilleure à la pré-dilution 12,5 qu'à la pré-dilution standard 100. Ils en concluent que mélanger jusqu'à 8 échantillons est possible. Une analyse ROC a été utilisée pour déterminer la valeur seuil optimale pour tester des échantillons de sérum en mélange. L'application de sérums non-dilués dans le test a conduit à des valeurs de densité optique extrêmement hautes pour des sérums négatifs à l'origine d'une perte de spécificité. Les valeurs de DO des échantillons négatifs non dilués et positifs dilués se recoupaient. En revanche, aux pré-dilutions plus faibles les échantillons dont la DO était proche du seuil en dilution standard étaient interprétés plus facilement. Ainsi la pré-dilution plus faible s'est avérée être la solution pour mélanger des échantillons en utilisant ELITEST-MVV, permettant des mélanges d'au moins 8 sérums.

Par ailleurs, en testant individuellement 124 sérums de brebis, 75 négatifs et 49 positifs initialement, à la dilution 10 par pré-dilution modifiée, les auteurs montrent que les valeurs DO des 2 groupes ne se superposent pas malgré la dilution. Ainsi, une augmentation de la quantité de sérums mélangés permet toujours une interprétation correcte des résultats. On conclut donc à ce stade que tester des mélanges de 10 échantillons est techniquement possible. Cependant, la dilution au 10^{ème} d'échantillons positifs dans du sérum négatif montre une diminution de la différenciation faite entre les populations positives et négatives. Un nouveau seuil a été estimé par analyse ROC des DO obtenues en testant des mélanges préparés en diluant au 10^{ème} des échantillons positifs dans du sérum négatif.

Parallèlement une évaluation des économies réalisées a été faite en prenant en compte plusieurs paramètres : coût du test de screening, de la main d'œuvre pour composer les mélanges, pour estimer la séroprévalence de la maladie dans la population testée, pour le traçage des échantillons et pour tester les échantillons individuels des mélanges positifs. Les économies «nettes» dépendront de la prévalence de l'infection de la population d'étude.

PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE

A) Contexte et objectif de l'étude

L'impact économique de la paratuberculose est majeur dans les filières ovines lait et viande. Dans la région Midi Pyrénées, le schéma de sélection et de production en race Causse du Lot est particulièrement affecté car il est basé sur une structure pyramidale à double étage reposant sur un petit nombre d'élevages sélectionneurs fournissant aux élevages utilisateurs et multiplicateurs des agnelles de race pure Causse du Lot. Ainsi le risque d'introduction de la paratuberculose via ces agnelles est élevé, la paratuberculose étant considérée comme une « maladie d'achat ». La maladie a donc assez largement diffusé dans les troupeaux au travers des introductions.

Une étude de l'UMT 1225 INRA-ENVT 1225 IHAP (Lafort et al., 2015) a été réalisée sur la population de brebis de Causse du Lot. Son objectif était d'étudier l'effet de la vaccination dans des troupeaux infectés par Map sur la réponse sérologique et l'excrétion dans les fèces de Map. Les résultats de qPCR ont montré la présence d'animaux excréteurs dans la quasi-totalité des élevages étudiés, malgré la vaccination. Néanmoins, la prévalence d'excrétion était faible (<5%) pour la majorité des élevages de l'étude. D'après les auteurs, en supposant que la séroprévalence initiale de ces troupeaux correspondait à une prévalence d'excrétion initialement élevée, la vaccination a permis une réduction de la prévalence d'excrétion. Les niveaux d'excrétion observés chez les brebis positives à la qPCR étaient faibles dans la majorité des cas (<2000 bactéries/gramme). Ainsi, la vaccination réduirait le risque et le niveau de contamination de l'environnement. Dans cette même étude, la mise en relation des résultats sérologiques avec ceux de la qPCR a montré que la sérologie ne pouvait pas être utilisée pour le suivi infectieux vis-à-vis de Map dans les troupeaux vaccinés. En effet, les animaux excréteurs (positifs à la qPCR) ont tous répondu de manière fortement positive au test ELISA, tout comme la majorité des brebis vaccinées non excrétrices. Les observations faites dans cette étude sont en accord avec celles des éleveurs pour lesquels la vaccination a engendré une réduction de la mortalité et du nombre de réformes dans leur troupeau.

Actuellement, la persistance d'animaux excréteurs dans les troupeaux vaccinés impose un maintien de la vaccination sur le long terme afin d'éviter la résurgence de la maladie à l'arrêt de la vaccination. Cependant, se pose la question d'un éventuel arrêt de la vaccination dans les élevages où la prévalence et les niveaux d'excrétion sont faibles. Cette démarche ne pourrait être envisagée qu'en maintenant des mesures de surveillance adéquates notamment l'évaluation de nouvelles infections naturelles. Le maintien d'une surveillance épidémiologique dans ces troupeaux permettrait une reprise de la vaccination dans les plus brefs délais s'il s'avérait que l'incidence de nouvelles infections naturelles était importante. Dans ce contexte et compte-tenu de la séroconversion massive et durable des animaux vaccinés, la réalisation d'analyses sérologiques sur les générations non vaccinées demeure la seule alternative dans ces troupeaux en dehors de l'utilisation de la qPCR sur fèces.

Par ailleurs, l'établissement du statut sanitaire vis-à-vis de la paratuberculose de tous les troupeaux sélectionneurs Causse du Lot non vaccinés est actuellement réalisé sur la base de 50 sérologies individuelles tous les ans. Le manque de sensibilité de la sérologie individuelle pour la détection des animaux infectés (Mathevon et al. 2017) plaide pour la réalisation d'analyse sur un plus grand nombre d'animaux dans chaque troupeau afin d'améliorer la sensibilité à l'échelle collective.

Cependant la mise en place d'un dépistage sérologique à grande échelle, voire exhaustif, se heurte à des contraintes financières, compte tenu de la taille des troupeaux. Une approche par l'analyse de mélange de sérums permettrait de réduire fortement les coûts.

Ainsi l'objectif de notre étude était d'évaluer la sensibilité et la spécificité de la sérologie réalisée sur des petits mélanges par rapport à la sérologie individuelle.

B) Matériel et méthodes

1- Population d'étude

Les élevages de l'étude sont des élevages sélectionneurs du département du Lot (département 46) de la région Midi-Pyrénées dans laquelle la race Causse du Lot est majoritaire (50%). C'est une race rustique élevée pour la viande, sur les plateaux calcaires du Lot mais aussi dans le Tarn, le Tarn-et-Garonne et dans l'ouest de l'Aveyron. C'est une race sélectionnée depuis la moitié du XX^{ème} siècle. A l'étage des élevages multiplicateurs et des utilisateurs, elle est croisée avec d'autres races (Ile de France, Berrichon du Cher, Charolais, Rouge de l'Ouest, Suffolk) pour améliorer la valeur bouchère des agneaux.

Les échantillons testés dans notre étude proviennent de 14 élevages ovins de grande taille (400 à 1000 brebis) dans lesquels 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 de sérum ont été réalisés sur des brebis sélectionnées aléatoirement dans la classe d'âge de 2 à 3 ans afin de s'assurer que les animaux aient été exposés à la même pression d'infection (animaux nés la même année dans les élevages). Selon la taille des élevages, entre 60 et 150 brebis ont été prélevées par élevage.

Les échantillons ont été testés individuellement à l'aide des trousseaux IDEXX (Paratuberculosis Screening Ab Test) et IDVET (ID Screen Paratuberculosis Indirect) avec un protocole d'incubation long.

Pour chaque animal, une prise de sang sur tube sec de 5 mL a été réalisée à la veine jugulaire.

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.

Au total, l'échantillon d'étude était constitué de 1216 brebis pour lesquelles l'ensemble des résultats de sérologie étaient disponibles.

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 l'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 la suite du manuscrit, nous parlerons seulement de 2 trousse ELISA. Les résultats de la trousse IdVet sont présentés sans différencier les deux lots utilisés.

Ces kits mettent en évidence les anticorps dirigés contre Map. Ils peuvent être utilisés sur des échantillons de sérums ou plasma de caprins, ovins et bovins ou sur du lait de bovin. Dans notre étude, son utilisation a été limitée à du sérum d'ovin. Le protocole est illustré en annexe. Les kits ELISA comprennent une plaque de 96 puits sensibilisée avec de l'extrait purifié de Map. Au fond de chaque puits se trouvent des antigènes de Map sur lesquels vont pouvoir se fixer des anticorps dirigés contre Map, présents dans les échantillons de sérums.

La technique ELISA comporte 4 étapes principales, similaires pour les deux kits utilisés (figure 6) :

- Pré-incubation : afin d'éviter des réactions croisées, les échantillons à tester et les contrôles sont pré-incubés dans un tampon neutralisant contenant *Mycobacterium phlei*, avant d'être transférés sur les plaques sensibilisées.
- 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 : cette étape consiste à incuber un substrat spécifique à l'enzyme peroxydase qui, si la réaction est positive (présence de l'anticorps recherché), va être transformé et induire une coloration bleue. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente et donc à la concentration d'anticorps recherchés. Cette étape de révélation est stoppée par une solution d'arrêt qui induit une coloration jaune (figure 7).

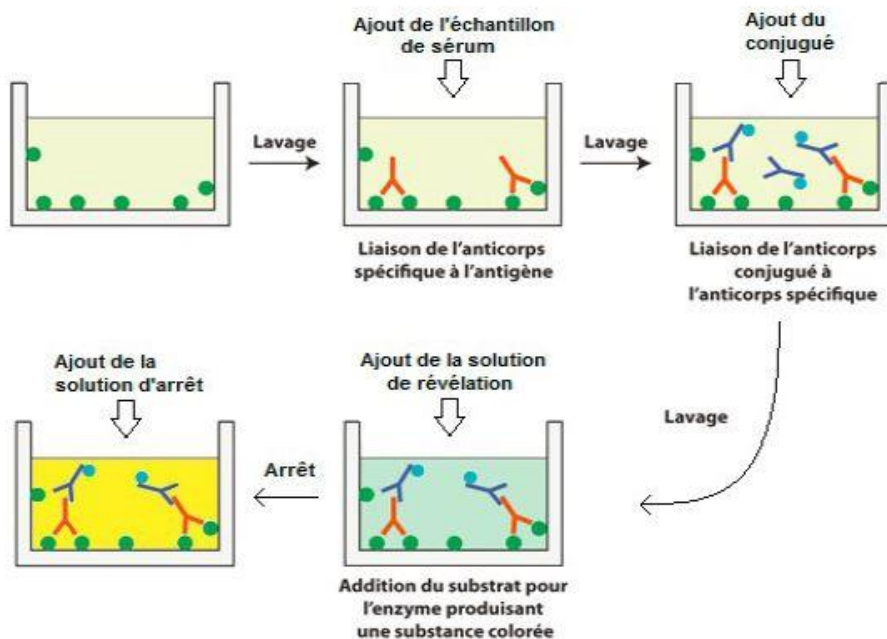


Figure 6 : Etapes de la sérologie ELISA (en vert l'antigène au fond des puits)

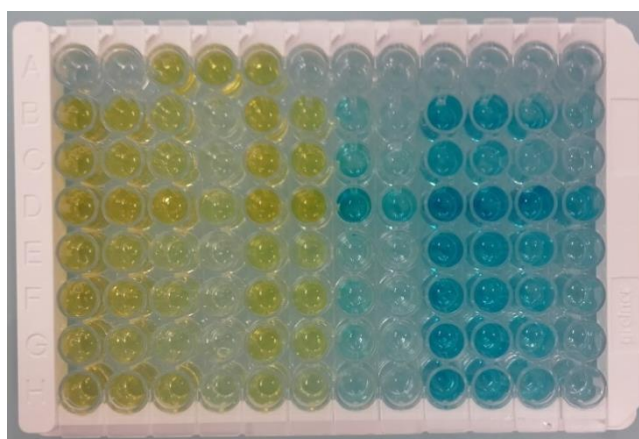


Figure 7 : Etape de révélation stoppée par la solution d'arrêt

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 :

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

L'interprétation des résultats est résumée dans le tableau ci-dessous, selon les seuils de décision définis par le fabricant.

Tableau 5 : Seuils d'interprétation des 2 trousse ELISA utilisées

| Statut | IDEXX | IDVet |
|----------------|---------------------|---------------------|
| NEGATIF | S/P % ≤ 45 % | S/P % ≤ 60 % |
| DOUTEUX | 45 % < S/P % < 55 % | 60 % < S/P % < 70 % |
| POSITIF | S/P % ≥ 55 % | S/P % ≥ 70 % |

Par la suite nous avons ajouté de nouveaux seuils qui sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 6 : Nouveaux seuils d'interprétation des 2 trousse ELISA utilisées

| Statut | Abréviation | IDEXX | IDVet |
|-----------------------|-------------|---------------------|----------------------|
| NEGATIF FAIBLE | Nf | S/P % ≤ 20 % | S/P % ≤ 40 % |
| NEGATIF FORT | NF | 20 % < S/P % < 45 % | 40 % < S/P % < 60 % |
| DOUTEUX | Dtx | 45 % < S/P % < 55 % | 60 % < S/P % < 70% |
| POSITIF FAIBLE | Pf | 55 % < S/P % < 90 % | 70 % < S/P % < 140 % |
| POSITIF FORT | PF | S/P % ≥ 90 % | S/P % ≥ 140 % |

3- Evaluation du signal de positivité après dilution

a. Descriptions des manipulations

1. Expérience 1 : Dilutions sériées d'échantillons positifs

L'objectif de cette première expérience était de décrire le comportement de sérums positifs, douteux et négatifs en ELISA individuelle lors de dilutions sériées dans le même sérum négatif.

La valeur S/P du sérum négatif utilisé pour ces dilutions était de 5%. Des dilutions sériées au 1/3, 1/9 et 1/81 ont été effectuées. Chaque échantillon ainsi dilué a été testé avec les deux trousse ELISA.

2. Expérience 2 : Dilutions opérationnelles, évaluation de la sensibilité

L'objectif de cette expérience était d'évaluer la sensibilité de détection des deux trousse ELISA lors de dilutions opérationnelles au 1/5 et au 1/10 (correspondant donc à des mélanges de 5 ou 10 sérums) d'échantillons individuellement positifs avec des valeurs S/P variables. Des sérums positifs ont ainsi été soit dilués dans le même sérum négatif (de valeur S/P < 5%), soit mélangés avec différents sérums individuels de brebis de statut sérologique douteux ou négatif. La composition de ces derniers mélanges était donc variable.

Trois types de mélanges ont ainsi été testés : des mélanges contenant au moins un positif fort et des mélanges contenant 1 ou 2 positifs faibles. La valeur S/P de chaque mélange ainsi constitué était ensuite mesurée avec chacune des deux trousse ELISA.

3. Expérience 3 : Dilutions opérationnelles, évaluation de la spécificité

L'objectif de cette dernière expérience était d'évaluer la spécificité des deux trousse ELISA lors de dilutions opérationnelles au 1/5 et au 1/10 (correspondant donc à des mélanges de 5 ou 10 sérums) d'échantillons individuellement négatifs avec des valeurs S/P variables. Des sérums négatifs étaient mélangés entre eux ou mélangés avec le même sérum de brebis faiblement négatif (valeur S/P < 5%). La composition de ces derniers mélanges était donc variable.

Cinq types de mélanges ont été testés : des mélanges de sérums faibles négatifs et des mélanges contenant 1, 2, 3 ou 4 échantillons négatifs forts. Chaque mélange ainsi constitué était ensuite testé avec chacune des deux trousse ELISA.

b. Calcul de la sensibilité et de la spécificité des analyses ELISA de mélanges

D'une part, l'analyse des résultats obtenus sur ces mélanges contenant au moins un échantillon positif a permis d'évaluer la sensibilité relative du mélange par rapport aux analyses individuelles (Se_{mel}). D'autre part, l'analyse des résultats obtenus sur les mélanges constitués uniquement de sérums négatifs a permis d'évaluer la spécificité des analyses en mélange (Sp_{mel}). Ces deux évaluations de Se_{mel} et Sp_{mel} avaient pour objectif de définir de nouveaux seuils de positivité, applicables à des analyses en mélange.

Les dilutions sériées ont été réalisées en simplicata. Les dilutions opérationnelles pour la plupart ont été réalisées en duplicata, et l'identification de discordances entre duplicatas a conduit à refaire l'analyse ou à l'exclusion des données de l'analyse.

C) Résultats

1- Dilutions sériées (1/3, 1/9, 1/81 : IDEXX)

Le but de cette étape était d'évaluer l'influence de la dilution en milieu négatif sur les valeurs de S/P.

Les tests ELISA ont été réalisés à partir de sérum d'échantillons positifs (G1, G2, G3) ou négatifs (G5) en pur, avec dilutions au 1/3, au 1/9 et au 1/81.

a. Influence de la dilution en milieu négatif sur les valeurs de S/P

Le tableau 7 présente les moyennes des valeurs S/P obtenues après dilutions au 1/3, 1/9 ou 1/81 d'échantillons de valeurs S/P initiales variables. Quatre groupes ont été considérés

selon la valeur S/P de l'échantillon pur. Le tableau 7 indique aussi le pourcentage d'échantillons restant positifs après dilutions selon le seuil de positivité du fabricant (55%). Pour chaque groupe la dilution théorique est indiquée. La valeur S/P théorique est calculée à partir de la moyenne des valeurs S/P des échantillons analysés purs selon la formule $S/P_{dil} = S/P_{pur} / dil$ avec dil = 3, 9 ou 81.

Tableau 7 : Moyennes des valeurs S/P obtenues après dilutions et pourcentages d'échantillons positifs après dilutions selon le fabricant (trousse IDEXX) avec (1) la dilution théorique de chaque groupe, (2) la moyenne des valeurs S/P obtenues après dilution, (3) le pourcentage des échantillons positifs après dilution selon le fabricant et « n » l'effectif de chaque groupe.

| Groupe | S/P en pur | n | (1), (2), (3) | dilution 1 | dilution 3 | dilution 9 | dilution 81 |
|--------------|------------|----|------------------------|------------|------------|------------|-------------|
| | | | dil th ⁽¹⁾ | 104,2 | 34,7 | 11,6 | 1,3 |
| G1 | > 90 | 16 | moy S/P ⁽²⁾ | 104,2 | 82,2 | 58,1 | 22,2 |
| | | | % > 55 ⁽³⁾ | 100% | 93,75% | 56,25% | 0% |
| | | | dil th | 81,0 | 27,0 | 9,0 | 1,0 |
| G2 | 70-90 | 16 | moy S/P | 81,0 | 53,9 | 30,7 | 11,2 |
| | | | % > 55 | 100% | 43,75% | 0% | 0% |
| | | | dil th | 60,7 | 20,2 | 6,7 | 0,7 |
| G3 | 55-70 | 12 | moy S/P | 60,7 | 36,8 | 18,7 | 7,5 |
| | | | % > 55 | 100% | 0% | 0% | 0% |
| | | | dil th | 36,2 | 12,1 | 4,0 | 0,4 |
| G5 | < 45 | 15 | moy S/P | 36,2 | 17,7 | 9,1 | 6,0 |
| | | | % > 55 | 0% | 0% | 0% | 0% |
| total | | 59 | | | | | |

Après dilution au 1/3, la moyenne des S/P du groupe 1 (82,2 +- 15,2) est significativement supérieure à celle du groupe 2 (53,9 +- 5,8) (test de Wilcoxon, $p_{G1/G2} = 1,24 \times 10^{-6}$). Toutes deux sont significativement supérieures au groupe des négatifs G5 (17,7 +- 3,3) ($p_{G1/G5} = 6,65 \times 10^{-9}$ et $p_{G2/G5} = 6,65 \times 10^{-9}$)

Le pourcentage d'échantillons du G1 (figure 8.a : 93,8% soit 15 échantillons) qui restent positifs après dilution au 1/3 est significativement supérieur à celui du G2 (figure 8.b : 43,8% soit 7 échantillons) (test Chi², $p = 0,00228$). Aucun échantillon du G3 et G5 n'était positif après dilution au 1/3.

A la dilution au 1/9, seuls 8 échantillons fortement positifs (50%) (G1) conservent une valeur S/P supérieure à 55 %. Aucun échantillon n'est positif après dilution au 1/81, quel que soit le groupe considéré.

Ainsi le comportement des sérums après dilution est variable. Il dépend de la valeur S/P initiale obtenue avec le sérum pur. Plus celle-ci est élevée (> 90), plus le pourcentage d'échantillons positifs après dilution est important.

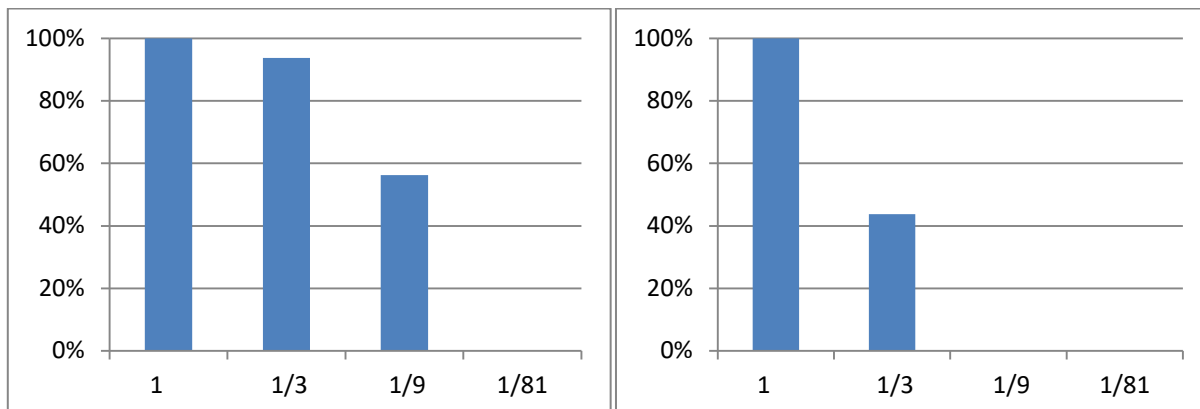


Figure 8.a

Figure 8.b

Figure 8 : Pourcentage de mélanges dont les valeurs S/P sont supérieurs à 55% en fonction de la dilution (1, 1/3, 1/9 et 1/81) pour le Groupe 1 (figure 8.a) et le Groupe 2 (figure 8.b)

b. Représentations graphiques par groupe

Pour plus de clarté, dans les figures suivantes les résultats sont présentés en regroupant les échantillons en 4 groupes en fonction des valeurs S/P initiales (cf. tableau 7). Elles représentent l'évolution des valeurs S/P au cours des dilutions sériées (1, 3, 9, 81).

Sur les figures 9, 10, 11 et 12, le seuil du fabricant (55%) est représenté en noir continu, et la dilution théorique (calculée en partant de la moyenne de chaque groupe) est en noir pointillé.

1. Groupe 1

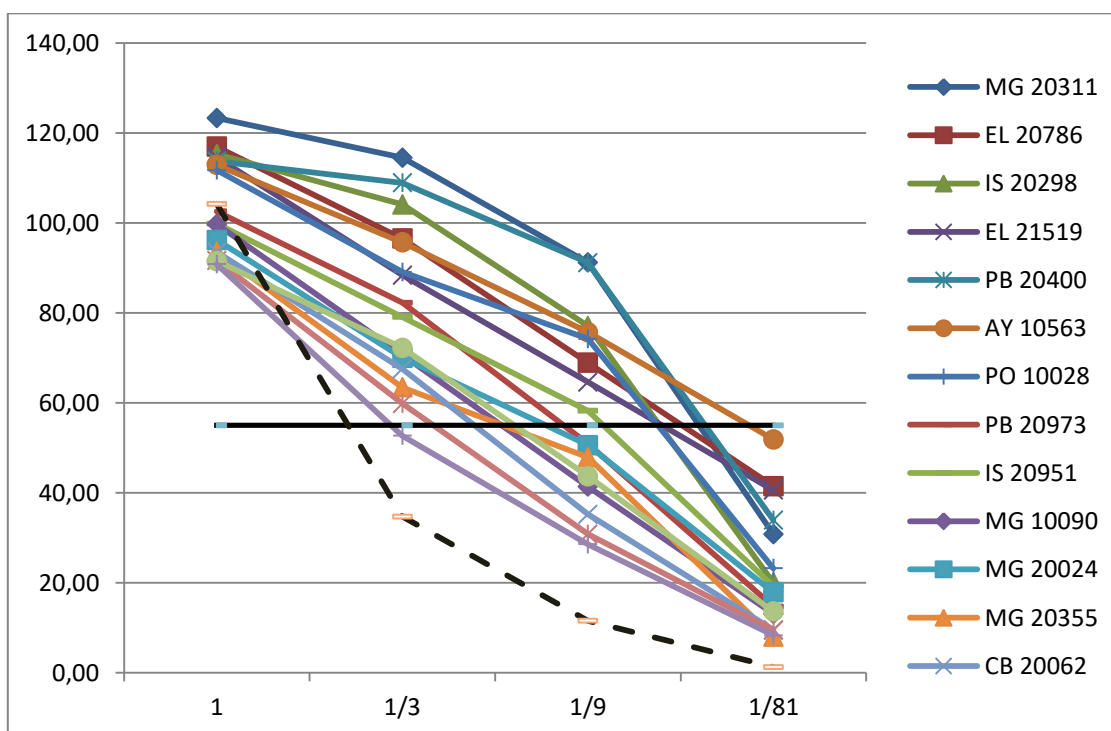


Figure 9 : Représentation des valeurs S/P des échantillons du G1 en fonction des dilutions (1, 1/3, 1/9 et 1/81)

2. Groupe 2

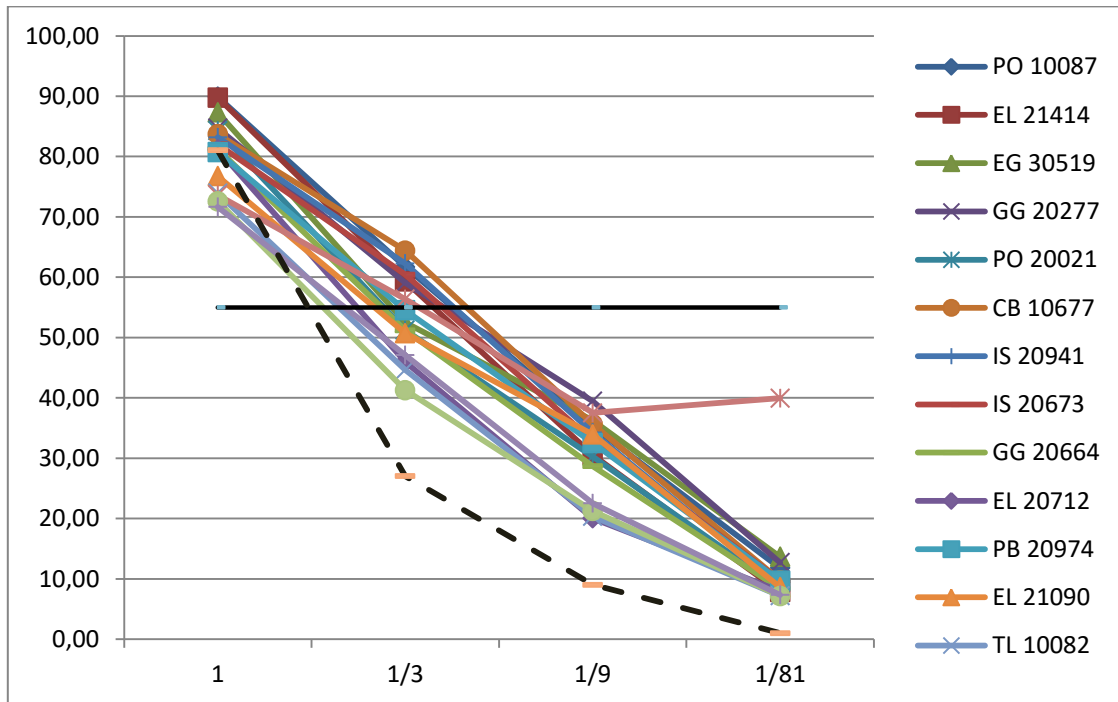


Figure 10 : Représentation des valeurs S/P des échantillons du G2 en fonction des dilutions (1, 1/3, 1/9 et 1/81)

3. Groupe 3

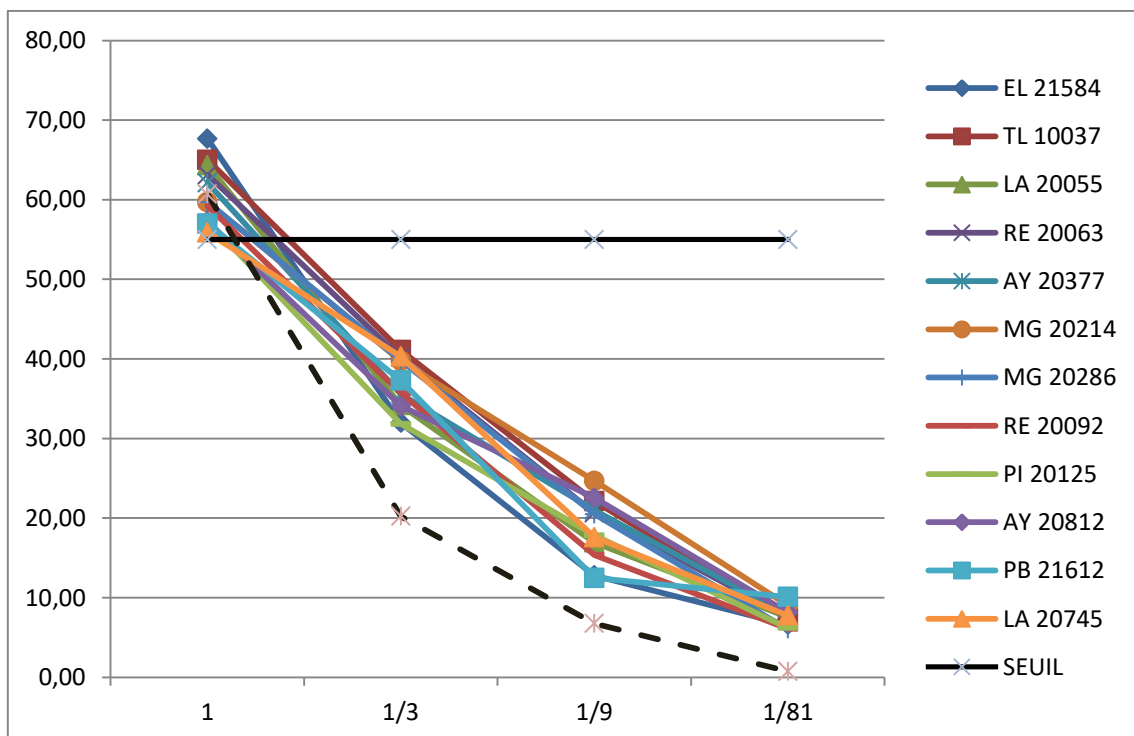


Figure 11 : Représentation des valeurs S/P des échantillons du G3 en fonction des dilutions (1, 1/3, 1/9 et 1/81)

4. Groupe 5

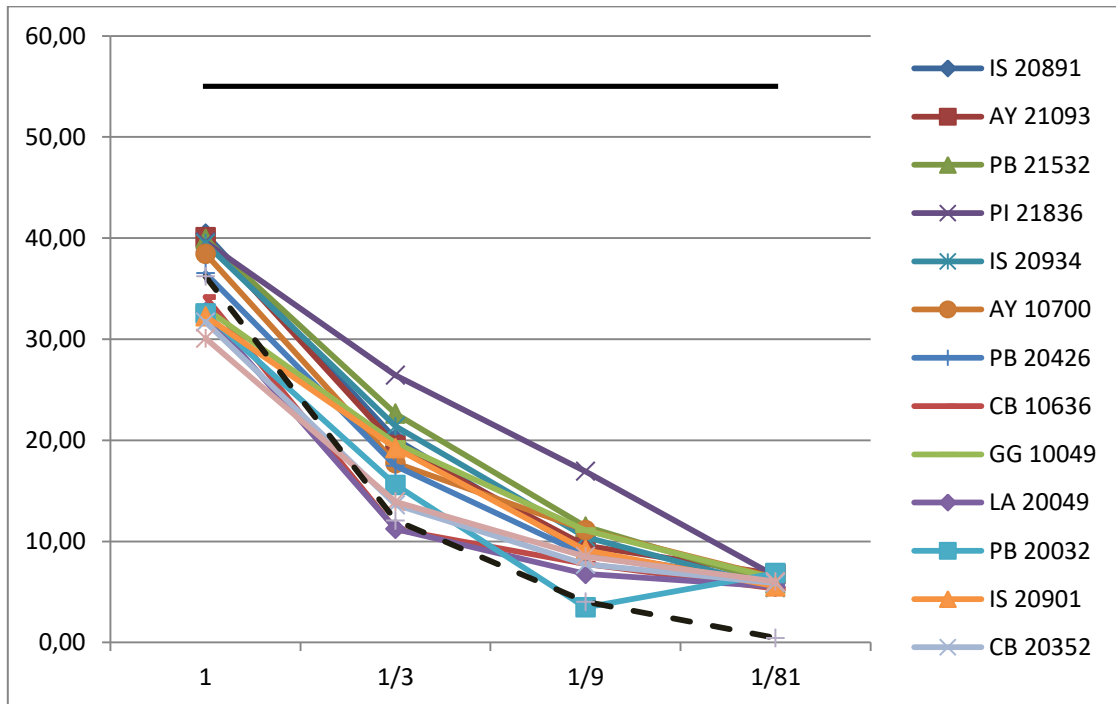


Figure 12: Représentation des valeurs S/P des échantillons du G5 en fonction des dilutions (1, 1/3, 1/9 et 1/81)

c. Description et interprétation des graphiques

Les figures 9, 10, 11 et 12 illustrent la décroissance des valeurs S/P de tous les échantillons au cours des dilutions sériées (1, 3, 9, 81).

Cependant, on constate une variabilité entre échantillons dans la décroissance, illustrée par les courbes non parallèles.

Par ailleurs, la dilution théorique (en noir pointillé) est calculée à partir de la moyenne des valeurs S/P initiales de l'ensemble des échantillons du groupe. Les échantillons analysés ne suivent pas les modèles de dilution théorique. La décroissance des valeurs S/P au cours des dilutions est plus faible que le modèle théorique. En effet, à l'exception de 2 échantillons dans le groupe 5, tous les échantillons ont un signal S/P supérieur à celui correspondant à la dilution théorique.

Ce sont les échantillons de G5, ayant des valeurs S/P initiales négatives qui se rapprochent le plus de celle-ci. La pente de décroissance apparaît plus faible pour certains échantillons ayant des valeurs S/P initiales élevées (G1). Ainsi plus la valeur S/P initiale de l'échantillon est élevée, moins l'effet de la dilution est important, i.e. plus l'échantillon reste positif au cours des dilutions.

Finalement, en considérant le seuil de positivité de 55% du fabricant, seuls 50% des échantillons initialement positifs ou douteux ($S/P > 45\%$) (22/44) restent positifs après dilution au 1/3. Après dilution au 1/9, seulement 8 échantillons positifs ou douteux (soit 18,2%) restent positifs. Après dilution au 1/81, aucun échantillon ne présente de signal de positivité au seuil de 55%. Par ailleurs, aucun échantillon initialement négatif ne devient positif après dilution.

Bilan : Les dilutions affectent donc les valeurs S/P des échantillons. La sensibilité des tests est diminuée si les seuils de positivité définis pour l'analyse des échantillons individuels sont appliqués aux échantillons dilués.

Par ailleurs, le pourcentage d'échantillons positifs « perdus » après dilution dépend de la valeur S/P initiale de l'échantillon.

La modélisation du comportement des valeurs S/P après dilution est difficile car (i) elle dépend de la valeur initiale des valeurs S/P et (ii) l'effet de la dilution est hétérogène au sein des groupes définis par les valeurs S/P initiales.

Les résultats obtenus dans cette première série de dilutions au 1/3, 1/9 et 1/81 montrent que le seuil de positivité (55%) défini par le fabricant conduit à une dégradation trop importante des performances diagnostiques (Se_{mel}) lors de la dilution. La spécificité relative (Sp_{mel}) reste cependant parfaite.

L'objectif des expériences suivantes était donc de rechercher de nouveaux seuils de décision permettant d'améliorer la sensibilité des analyses en mélange sans en dégrader la spécificité.

2- Description des catégories selon la valeur S/P initiale

Nous avons vu dans la partie précédente en dilutions sériées que le comportement des échantillons après dilution variait en fonction du niveau de positivité initiale. La suite des résultats sera donc présentée en fonction des valeurs S/P obtenus à partir des échantillons purs.

a. Mise en place de catégories

Le tableau 8 indique les différents seuils de S/P utilisés pour chaque trousse ELISA pour regrouper les échantillons en 5 catégories : négatif faible (Nf), négatif fort (NF), douteux (Dtx), positif faible (Pf) et positif fort (PF).

Tableau 8 : Les différentes catégories de sérums purs selon leur valeur S/P

| Abréviation | Catégorie | IDEXX | IDVet |
|-------------|-----------------------|---------|----------|
| PF | Positif fort | > 90 | > 140 |
| Pf | Positif faible | 55 - 90 | 70 - 140 |
| Dtx | Douteux | 45 - 55 | 60 - 70 |
| NF | Négatif fort | 20 - 45 | 40 - 70 |
| Nf | Négatif faible | < 20 | < 40 |

Le seuil définissant les échantillons « Positifs Forts (PF) » a été défini par double du seuil des douteux ($2 \times 45\% = 90\%$) pour la trousse IDEXX et le double du seuil de positivité pour la trousse IDVET ($2 \times 70\% = 140\%$).

b. Valeurs S/P des brebis dans la population initiale

Des prélèvements sanguins ont été obtenus sur 1216 brebis dans 14 élevages ovins du Lot infectés à des degrés divers par la paratuberculose (Mathevon et al., 2017). Les brebis étaient sélectionnées de manière aléatoire au sein des classes d'âge de 2 à 3 ans. Selon la taille des élevages, entre 60 et 150 brebis ont été prélevées par élevage. Les échantillons ont été testés individuellement à l'aide des trousseaux IDEXX et IDVET avec un protocole d'incubation long.

Le tableau 9 présente les effectifs (n) et les pourcentages correspondants de chaque catégorie pour les deux trousseaux utilisés

Tableau 9: Répartition des effectifs et pourcentages selon les valeurs S/P d'après les 2 trousseaux ELISA avec n l'effectif et % le pourcentage de la population totale (catégories selon le tableau 8)

| Catégorie | n IDEXX | % IDEXX | n IdVet | % IdVet |
|--------------|---------|---------|---------|---------|
| PF | 13 | 1,1% | 42 | 3,5% |
| Pf | 57 | 4,7% | 26 | 2,1% |
| Dtx | 23 | 1,9% | 10 | 0,8% |
| NF | 131 | 10,8% | 26 | 2,1% |
| Nf | 992 | 81,6% | 1112 | 91,4% |
| Total | 1216 | 100,0% | 1216 | 100,0% |

Bien que les séroprévalences apparentes estimées à partir des deux trousseaux soient similaires (5.8 % pour IDEXX et 5.6% pour IdVet) les répartitions des effectifs par catégories apparaissent différentes.

Ainsi 42 des 68 sérums positifs avec la trousse IdVet (61.8%) sont classés en « positifs forts » (valeurs S/P supérieures à 140 %) contre seulement 13 sur 70 (18.6%) pour la trousse IDEXX (valeurs S/P supérieures à 90 %) (test du Chi², $p < 10^{-6}$).

A l'inverse la proportion de sérums négatifs qualifiés de « négatifs forts » était significativement plus élevée ($p < 10^{-6}$) pour la trousse IDEXX (11.7%) que pour la trousse IdVet (2.3%).

Enfin les sérums à résultats « douteux » étaient significativement plus nombreux pour la trousse IDEXX (n=23), que pour la trousse IdVet ($p = 0.0245$).

3- Dilutions opérationnelles (1/5 et 1/10)

Pour ces dilutions, des sérums de valeurs S/P variables (PF, Pf, NF, Nf) ont été soit dilués dans le même sérum négatif soit mélangés entre eux.

Les tableaux 10, 11, 12 et 13 présentent les sensibilités et spécificités relatives obtenues après dilutions (5 et 10), et calculées à différents seuils pour les trousseaux IDEXX et IdVet avec n le nombre d'échantillons positifs au seuil considéré. Pour chaque groupe et à chaque dilution (5 ou 10), la moyenne des valeurs S/P des mélanges (MOY) a été calculée avec son écartype (ECT). Pour plus de lisibilité, ces 4 tableaux se trouvent également en annexes.

a. IDEXX

1. Sensibilité

Les résultats obtenus confirment les conclusions des dilutions sériées. La sensibilité relative obtenue en utilisant le seuil du fabricant (55%) est insatisfaisante pour la réalisation d'analyses en mélanges (tableau 10). En effet, au seuil du fabricant celle-ci n'est que de 71,4% (15/21) après dilution au 1/5 d'un échantillon positif fort c'est-à-dire que plus d'un quart des échantillons ne sont pas détectés. A la dilution au 1/10 ce sont plus de la moitié des échantillons positifs forts qui perdent leur signal de positivité ($Se_{mel} = 47,6\%$). Pour les mélanges contenant un seul échantillon positif faible, les effectifs détectés après dilutions 5 et 10 sont quasi nuls (respectivement 1/37 et 0/37).

Une amélioration de la sensibilité relative, toute catégorie confondue, peut être obtenue en abaissant le seuil de décision.

Ainsi au seuil de 15%, 100% des mélanges contenant un positif fort ou 2 positifs faibles sont détectés quelle que soit la dilution (5 ou 10). Cependant, les mélanges ne contenant qu'un seul échantillon positif faible semblent être limitants : en effet, au seuil S/P de 15%, seuls 32 des 37 mélanges sont considérés comme positifs à la dilution 5 ($Se_{mel} = 86,5\%$) et 24 sur 37 à la dilution 10 ($Se_{mel} = 64,9\%$).

Pour les mélanges contenant un échantillon fort positif ou 2 échantillons faibles positifs, les seuils de décision de 35% (mélanges de taille 5) et 25% (mélanges de taille 10) correspondent aux valeurs de S/P les plus élevées associées à une sensibilité de détection proche de 100% (au maximum 1 à 2 échantillons non détectés sur 21). Ces seuils ne sont cependant associés à des sensibilités limitées pour la détection des mélanges contenant 1 seul échantillon faiblement positif (51,4% pour les mélange de taille 5 et 37,8% pour les mélanges de taille 10).

Tableau 10 : Sensibilités relatives après dilutions (5 et 10), calculées à différents seuils pour la trousse IDEXX avec n le nombre d'échantillons positifs au seuil considéré, * 1 Positif Fort mélangé avec des échantillons Dtx, NF ou Nf, ** 1 Positif faible mélangé avec des échantillons Nf exclusivement et *** 2 Positifs faibles mélangés avec des échantillons Nf exclusivement.

SENSIBILITE IDEXX

| 1 Positif fort * (> 90) [n = 21] | | | | | | | | | | | | | | |
|---|-------|-------|----|--------|----|--------|----|--------|----|--------|----|-------|----------------|-------|
| Seuil | | | 15 | | 20 | | 25 | | 30 | | 35 | | 55 (fabricant) | |
| | MOY | ECT | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Dil. 5 | 66,96 | 15,67 | 21 | 100,0% | 21 | 100,0% | 21 | 100,0% | 20 | 95,2% | 20 | 95,2% | 15 | 71,4% |
| Dil. 10 | 47,02 | 16,20 | 21 | 100,0% | 19 | 90,5% | 19 | 90,5% | 17 | 81,0% | 16 | 76,2% | 10 | 47,6% |
| 1 Positif faible ** (55 - 90) [n = 37] | | | | | | | | | | | | | | |
| Seuil | | | 15 | | 20 | | 25 | | 30 | | 35 | | 55 (fabricant) | |
| | MOY | ECT | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Dil. 5 | 32,76 | 11,90 | 32 | 86,5% | 28 | 75,7% | 23 | 62,2% | 21 | 56,8% | 19 | 51,4% | 1 | 2,7% |
| Dil. 10 | 21,00 | 9,65 | 24 | 64,9% | 17 | 45,9% | 14 | 37,8% | 7 | 18,9% | 7 | 18,9% | 0 | 0,0% |
| 2 Positifs faibles *** (55 - 90) [n = 21] | | | | | | | | | | | | | | |
| Seuil | | | 15 | | 20 | | 25 | | 30 | | 35 | | 55 (fabricant) | |
| | MOY | ECT | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Dil. 5 | 58,81 | 7,51 | 21 | 100,0% | 21 | 100,0% | 21 | 100,0% | 21 | 100,0% | 20 | 95,2% | 16 | 76,2% |
| Dil. 10 | 42,26 | 7,65 | 21 | 100,0% | 20 | 95,2% | 20 | 95,2% | 19 | 90,5% | 17 | 81,0% | 2 | 9,5% |

2. Spécificité

La spécificité reste parfaite pour des mélanges d'échantillons négatifs faibles jusqu'au seuil le plus bas considéré (S/P de 15%) et quelle que soit la dilution.

Pour les mélanges de taille 5, une dégradation de la spécificité relative est observée lors de la dilution d'un échantillon négatif fort au 1/5 en deçà du seuil S/P de 20% (2/41, $Sp_{mel} = 95,1\%$). L'abaissement du seuil de décision à une S/P de 20% compromet l'interprétation des mélanges dans lesquels se trouvent 2 négatifs forts. Un quart apparaissent positifs à ce seuil après dilution au 1/5 ($Sp_{mel} = 75\%$). A partir du seuil de 25%, la spécificité est parfaite.

Pour les mélanges de taille 10, le seuil de décision de 15% est associé à une spécificité relative parfaite quelle que soit la composition du mélange.

Tableau 11 : Spécificités relatives après dilutions (5 et 10), calculées à différents seuils pour la trousse IDEXX avec n le nombre d'échantillons positifs au seuil considéré, * que des échantillons Négatifs faibles, ** 1 Négatif Fort mélangé avec des échantillons Nf exclusivement et *** 2 Négatifs Forts mélangés avec des échantillons Nf exclusivement.

| SPECIFICITE IDEXX | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-------|------|--|--------|----|--------|----|--------|----|--------|----|--------|----------------|--------|
| | | | Négatifs faibles* (< 20) [n = 30 à dil.5 et n = 21 à dil.10] | | | | | | | | | | | |
| Seuil | MOY | ECT | 15 | | 20 | | 25 | | 30 | | 35 | | 55 (fabricant) | |
| | | | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Dil. 5 | 6,19 | 2,76 | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% |
| Dil. 10 | 4,70 | 1,56 | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% |
| 1 Négatif fort** (20 -45) [n = 41 à dil.5 et n = 38 à dil.10] | | | | | | | | | | | | | | |
| Seuil | MOY | ECT | 15 | | 20 | | 25 | | 30 | | 35 | | 55 (fabricant) | |
| | | | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Dil. 5 | 8,55 | 4,48 | 5 | 87,8% | 2 | 95,1% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% |
| Dil. 10 | 6,40 | 3,02 | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% |
| 2 Négatifs forts*** (20 -45) [n = 21 à dil.5 et n = 28 à dil.10] | | | | | | | | | | | | | | |
| Seuil | MOY | ECT | 15 | | 20 | | 25 | | 30 | | 35 | | 55 (fabricant) | |
| | | | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Dil. 5 | 14,11 | 6,31 | 11 | 47,6% | 6 | 71,4% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% |
| Dil. 10 | 6,33 | 3,42 | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% |

3. Seuil optimal

Compte tenu des résultats obtenus pour l'estimation de la sensibilité et de la spécificité, des seuils différents peuvent être proposés pour les mélanges de taille 5 et ceux de taille 10.

Ainsi il apparaît que pour les mélanges de taille 5, le seuil de décision de 25% est associé à une spécificité parfaite et une sensibilité parfaite pour les mélanges contenant 1 échantillon positif fort ou 2 échantillons positifs faibles. Pour les mélanges contenant 1 seul échantillon positif faible, ce seuil correspond à une sensibilité de 62.2%.

Pour les mélanges de taille 10, le seuil de décision de 15% permet à la fois d'avoir une spécificité supérieure à 95% quelle que soit la composition du mélange et une sensibilité parfaite pour les mélanges contenant 1 échantillon positif fort ou 2 échantillons positifs faibles. Pour les mélanges contenant 1 seul échantillon positif faible, ce seuil correspond à une sensibilité de 64.9 %

Ces deux seuils de décision sont donc associés à des performances semblables pour les mélanges de taille 5 et de taille 10.

b. IDVET

1. Sensibilité

Comme pour la trousse IDEXX, on observe une amélioration de la sensibilité relative, toute catégorie confondue, en abaissant le seuil de décision et les mélanges ne contenant qu'un seul échantillon positif faible limitent cette amélioration. En effet, au seuil le plus bas considéré (S/P de 20%), 12.2% des mélanges contenant un échantillon positif faible sont testés négatifs après dilution au 1/5 ($Se_{mel} = 87.8\%$) et 46.9% après dilution au 1/10 ($Se_{mel} = 53.1\%$).

La présence d'un échantillon positif fort permet des dilutions au 1/5 sans dégradation de la sensibilité si le seuil est abaissé à 30%, avec un seul échantillon non détecté pour les seuils de 35 et 40% ($Se_{mel} = 97.4\%$).

Pour les mélanges de taille 10, la sensibilité n'est jamais de 100%, quel que soit le seuil de décision. Au seuil de 20%, elle est au mieux de 92.7% (38 mélanges détectés sur 41 contenant 1 échantillon positif fort).

Notons par ailleurs que les résultats des mélanges contenant 2 échantillons positifs faibles sont basés sur un faible effectif (n=8).

Tableau 12 : Sensibilités relatives après dilutions (5 et 10), calculées à différents seuils pour la trousse IDVET avec n le nombre d'échantillons positifs au seuil considéré, * 1 Positif Fort mélangé qu'avec des échantillons Pf (maximum 1), Dtx, NF ou Nf, ** 1 Positif faible mélangé avec des échantillons Dtx (maximum 1), Nf (maximum 1) ou Nf et *** 2 Positifs faibles mélangés avec des échantillons Nf exclusivement.

| SENSIBILITE IDVET | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--------|-------|----|--------|----|--------|----|--------|----|--------|----|--------|----------------|-------|
| 1 Positif fort * (> 140) [n = 38 à la dil.5 et n = 41 à la dil.10] | | | | | | | | | | | | | | |
| Seuil | MOY | ECT | 20 | | 25 | | 30 | | 35 | | 40 | | 70 (fabricant) | |
| | | | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Dil. 5 | 110,55 | 42,51 | 38 | 100,0% | 38 | 100,0% | 38 | 100,0% | 37 | 97,4% | 37 | 97,4% | 27 | 71,1% |
| Dil. 10 | 72,97 | 38,60 | 38 | 92,7% | 37 | 90,2% | 34 | 82,9% | 34 | 82,9% | 30 | 73,2% | 18 | 43,9% |
| 1 Positif faible ** (70 - 140) [n = 41 à la dil.5 et n = 49 à la dil.10] | | | | | | | | | | | | | | |
| Seuil | MOY | ECT | 20 | | 25 | | 30 | | 35 | | 40 | | 70 (fabricant) | |
| | | | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Dil. 5 | 46,24 | 17,29 | 36 | 87,8% | 32 | 78,0% | 30 | 73,2% | 26 | 63,4% | 22 | 53,7% | 5 | 12,2% |
| Dil. 10 | 26,36 | 13,78 | 26 | 53,1% | 23 | 46,9% | 17 | 34,7% | 13 | 26,5% | 10 | 20,4% | 3 | 6,1% |
| 2 Positifs faibles *** (70 - 140) [n = 8] | | | | | | | | | | | | | | |
| Seuil | MOY | ECT | 20 | | 25 | | 30 | | 35 | | 40 | | 70 (fabricant) | |
| | | | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Dil. 5 | 62,19 | 9,13 | 8 | 100,0% | 8 | 100,0% | 8 | 100,0% | 8 | 100,0% | 8 | 100,0% | 2 | 25,0% |
| Dil. 10 | 41,77 | 7,32 | 8 | 100,0% | 8 | 100,0% | 8 | 100,0% | 7 | 87,5% | 4 | 50,0% | 0 | 0,0% |

2. Spécificité

Pour la trousse IDVET, la spécificité reste parfaite pour des mélanges de taille 5 d'échantillons négatifs faibles jusqu'au seuil de 25% quelle que soit la dilution.

La présence d'un échantillon négatif fort dans le mélange ne diminue quasiment pas la spécificité relative au seuil de 25% (seulement 1 mélange de 10 positif au seuil de 25% avec une valeur S/P de 26.7%).

En revanche, la présence de 2 échantillons négatifs forts dans un mélange de 5 semble dégrader beaucoup la spécificité du mélange : 50% des mélanges sont testés positifs au seuil 35.

Les résultats de ce type de mélanges sont cependant basés sur des effectifs très faible (n=6) et apparaissent incohérents avec ceux obtenus avec la trousse IDEXX. Malheureusement ils n'ont pas pu être confirmés ou corrigés, car le nombre et la quantité de sérums disponibles pour refaire les analyses étaient insuffisants.

Tableau 13 : Spécificités relatives après dilutions (5 et 10), calculées à différents seuils pour la trousse IDVET avec n le nombre d'échantillons positifs au seuil considéré, * que des échantillons Négatifs faibles, ** 1 Négatif Fort mélangé avec des échantillons Nf exclusivement et *** 2 Négatifs Forts mélangés avec des échantillons Nf exclusivement.

| SPECIFICITE IDVET | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-------|------|----|--------|----|--------|----|--------|----|--------|----|--------|----------------|--------|
| Négatifs faibles* (< 40) [n = 33 à dil.5 et n = 44 à dil.10] | | | | | | | | | | | | | | |
| Seuil | | | 20 | | 25 | | 30 | | 35 | | 40 | | 70 (fabricant) | |
| | MOY | ECT | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Dil. 5 | 5,18 | 4,70 | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% |
| Dil. 10 | 5,30 | 4,46 | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% |
| 1 Négatif fort** (40 - 60) [n = 15 à dil.5 et n = 25 à dil.10] | | | | | | | | | | | | | | |
| Seuil | | | 20 | | 25 | | 30 | | 35 | | 40 | | 70 (fabricant) | |
| | MOY | ECT | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Dil. 5 | 8,14 | 4,26 | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% |
| Dil. 10 | 5,61 | 5,59 | 2 | 92,0% | 1 | 96,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% |
| 2 Négatifs forts*** (40 - 60) [n = 6] | | | | | | | | | | | | | | |
| Seuil | | | 20 | | 25 | | 30 | | 35 | | 40 | | 70 (fabricant) | |
| | MOY | ECT | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Dil. 5 | 32,92 | 4,65 | 6 | 0,0% | 5 | 16,7% | 5 | 16,7% | 3 | 50,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% |
| Dil. 10 | 23,70 | 2,99 | 5 | 16,7% | 2 | 66,7% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% |

3. Seuil optimal

Sans tenir compte des mélanges contenant 2 échantillons négatifs forts qui apparaissent étonnants, le seuil de décision de 25% apparaît optimal pour les mélanges de taille 5. Il est en effet associé à une spécificité et à une sensibilité parfaite pour les mélanges contenant 1 échantillon positif fort ou 2 échantillons positifs faibles. Pour les mélanges contenant 1 seul échantillon positif faible, ce seuil correspond à une sensibilité de 78.0%

Pour les mélanges de taille 10, le seuil de décision de 25% est associé à des performances moins satisfaisantes en terme de sensibilité et de spécificité. De même le seuil de décision de 20% améliorerait la sensibilité, mais est associé à une spécificité un peu dégradée. Pour cette taille de mélanges le choix du seuil apparaît plus difficile.

PARTIE III : DISCUSSION

A) Matériel et méthodes

La méthode sérologique ELISA est une technique de détection indirecte, ne recherchant que le témoin de la contamination que sont les anticorps. Des précautions sont donc à prendre en compte lors de l'interprétation des résultats. Le nombre important d'étapes rend la manipulation peu répétable quand elle n'est pas automatisée, ce qui induit des variabilités dans les résultats obtenus. Dans notre étude, les tests ELISA ont été réalisés par des manipulateurs inexpérimentés, au moins lors des premières manipulations. Ainsi des erreurs de manipulation ne peuvent être totalement exclues pour expliquer certains résultats discordants. Par ailleurs, trois opérateurs différents ont effectué les tests sérologiques. On peut donc considérer un biais lié au changement d'opérateurs. Enfin, une variabilité entre les différentes plaques utilisées pourrait être à l'origine de variabilité.

Cependant des analyses ont été réalisées pour étudier les variabilités intra-plaques, inter-plaques et entre les opérateurs. En analysant les mêmes échantillons sur deux plaques différentes, nous obtenons un coefficient de variation moyen de 11,28%. Le changement d'opérateurs est à l'origine d'un coefficient de variation moyen de 9.28%. Enfin, les variabilités intra-plaques induisent un coefficient de variation moyen de 9.26%. Ces coefficients de variations restent acceptables lors de réalisation de sérologies ELISA manuellement.

La réalisation de la plupart des mélanges opérationnels en duplicatas et l'exclusion des résultats très discordants entre duplicatas réduisent ainsi l'impact des potentielles erreurs de manipulation.

B) Résultats

Le bénéfice potentiel obtenu en mélangeant des échantillons dépend des variations de la sensibilité et de la spécificité du test utilisé lorsqu'on dilue les échantillons initialement positifs.

Dans le cas où l'on maintient le seuil de positivité du fabricant, le nombre minimum de tests sur mélange nécessaires pour détecter un échantillon initialement positif dépend d'abord du degré auquel cet échantillon peut être dilué tout en étant toujours détecté : autrement dit comment la sensibilité change selon la taille du mélange. Ensuite, cela dépend du nombre d'échantillons négatifs parmi lesquels l'échantillon positif se trouve ie la prévalence. Si l'on abaisse le seuil de positivité, cela dépendra en plus de de la variation de spécificité associée.

1- Variation des performances diagnostiques selon les catégories

L'échantillon de sérums utilisé pour notre étude était volontairement non représentatif de la population de 1216 brebis initialement prélevées. Une première analyse ELISA sur l'ensemble des individus a été réalisée afin de connaître leur statut sérologique. A partir de

cette base de données, un large panel de sérums a été sélectionné selon leurs valeurs S/P individuelles, afin de comprendre le comportement de l'ELISA lors de mélanges de plusieurs sérums.

Ainsi, dans les paragraphes qui suivent, nous avons mis en relation les performances diagnostiques pour les différentes catégories de mélanges et les prévalences de chacune de ces catégories dans la population générale.

a. Sensibilité

Il est important de rappeler que plus la prévalence individuelle est forte, plus la probabilité de détecter au moins un animal positif est forte i.e. plus la sensibilité à l'échelle du troupeau est élevée.

Pour la trousse IDEXX, bien que la sensibilité relative soit parfaite pour les mélanges dans lesquels un échantillon « positif fort » était présent, ce type d'échantillon n'est pas représentatif de la population des animaux séropositifs. En effet, les échantillons positifs forts ne représentent que 18,6% des sérums positifs observés dans la totalité des 14 élevages investigués. Ainsi, bien qu'ils soient facilement détectables en mélanges, leur faible fréquence est un facteur limitant et impose la réalisation de nombreux mélanges pour les détecter.

A l'inverse les échantillons « positifs faibles » sont les plus nombreux (81,4% des animaux séropositifs). Malheureusement, la sensibilité obtenue pour les mélanges dans lesquels n'est présent qu'un seul échantillon « positif faible » est clairement moins bonne (62,2% et 78% au seuil de décision de 25% pour la trousse IDEXX et IDVET). Ainsi, dans les troupeaux à faible séroprévalence, il sera beaucoup plus difficile de les détecter, bien qu'ils représentent la majorité des échantillons positifs.

b. Spécificité

Pour la trousse IDEXX, les analyses ont montré que les mélanges de 5 sérums négatifs contenant 2 échantillons « négatifs forts » avaient des valeurs SP élevées (52,4% de ces mélanges ont une SP > 15%), à l'origine d'une dégradation de la spécificité. Cependant, ces animaux négatifs forts sont relativement peu fréquents dans l'ensemble des élevages de l'étude (131 sur 1123 animaux négatifs, soit 11,7%). Avec cette prévalence, la probabilité théorique, calculée selon la loi binomiale, d'avoir 2 échantillons négatifs forts dans un mélange de 5 ou de 10, est respectivement de 9,4% et de 22,8%. La probabilité théorique d'avoir plus de 2 échantillons négatifs forts dans un mélange de 5 ou de 10, est respectivement de 1.33 % et de 10.2%.

Pour la trousse IDVet, du fait de la faible proportion d'échantillons « négatifs forts » (2.1%), la probabilité d'avoir un mélange contenant 2 échantillons de ce type est encore plus faible (respectivement 0.41% et 1.67% pour les mélanges de taille 5 et 10).

Par ailleurs, la proportion d'animaux négatifs forts est significativement supérieure dans les troupeaux à forte séroprévalence apparente (supérieure à 8%) par rapport aux élevages à faible séroprévalence apparente (inférieure à 8%) : 12,13% contre 7,19% pour le test IDEXX (test du χ^2 , $p = 0,0243$). Dans un élevage ovin de race Lacaune considéré comme indemne de paratuberculose et investigué dans le cadre du programme de recherche, la fréquence des animaux séronégatifs ayant des valeurs S/P supérieures à 20% pour le test IDEXX et 40% pour la trousse IDVET était respectivement de 4.4% (4/91) et 0%. Autrement dit, les individus négatifs forts se retrouvent préférentiellement dans des troupeaux dans lesquels la séroprévalence est élevée et sont rares dans les élevages indemnes.

Par conséquent, même si certains seuils de décision pouvaient être associés à des spécificités relatives non parfaites (pour la trousse IDEXX respectivement 95.2% et 96.4% au seuil de 25% et 15% pour les mélanges de taille 5 et 10 contenant 2 échantillons « négatifs forts »), l'impact de ce défaut apparaît réduit en élevage compte tenu de la faible fréquence de ce type de mélanges dans les élevages à faible prévalence ou considérés comme indemnes. Ce constat permet de confirmer que la spécificité de l'analyse de mélanges de sérums de brebis négatives est satisfaisante et que le cas de faux positifs en mélanges reste rare.

Pour la trousse IdVet, les résultats de spécificité obtenus pour les mélanges contenant 2 échantillons « négatifs forts » sont incohérents avec ceux obtenus avec la trousse IDEXX. Rappelons qu'ils ont été obtenus à partir d'un effectif très faible de mélanges ($n=6$) et qu'une erreur de manipulation ne peut être exclue. Malheureusement la manipulation n'a pas pu être reproduite, en raison de quantités de sérums disponibles insuffisantes.

2- Performances diagnostiques relatives à un test imparfait

Dans cette étude, les performances diagnostiques de la sérologie réalisée sur des petits mélanges ne sont que relatives, car elles supposent que le test de référence intra-étude est défini par le statut sérologique individuel des échantillons analysés. Autrement dit, nous avons évalué la sensibilité et la spécificité de la sérologie de mélanges pour la détection de sérums positifs ou négatifs. Or, la sérologie individuelle est loin d'être parfaite, que ce soit du point de vue de sa sensibilité comme de sa spécificité.

Brugel et al. (2014) ont évalué la spécificité de la trousse IDEXX à 96,5% et celle de la trousse IdVet à 99,2% chez les bovins. Chez les ovins, l'évaluation par des modèles à classes latentes et des approches Bayésiennes ont permis d'évaluer les performances des 2 trousse étudiées, à partir des données des élevages qui ont servi de support à notre étude (Mathevon et al, 2017). Les résultats indiquent une sensibilité individuelle très faible de la sérologie ELISA pour la détection des animaux infectés en phase sub-clinique (trousse IdVet : 17.9% ; trousse IDEXX : 17.4%). Par ailleurs la spécificité individuelle bien que correcte, était loin d'être parfaite (trousse IdVet : 94.8% ; trousse IDEXX : 94.0%). Par conséquent, pour les mélanges dont les performances relatives ne sont pas parfaites, les sensibilités et spécificités diagnostiques réelles, pour détecter des individus positifs et non plus des sérums positifs, est encore plus faible.

Il était au-delà des objectifs de ce travail de calculer la sensibilité et la spécificité à l'échelle des troupeaux de l'utilisation des sérologies ELISA appliquées à des petits mélanges de sérum pour l'établissement de leur statut sanitaire. Notons cependant que compte tenu des performances hétérogènes selon la composition des mélanges, cette évaluation est complexe et doit faire appel à des simulations prenant aussi en compte la prévalence intra-troupeau, la taille et le nombre de mélanges réalisés.

3- Combinaison de tests

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

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

Notons cependant que dans tous les cas, les performances de classification de ces approches sont globalement médiocres en raison de leurs faibles sensibilités et/ou spécificités.

Cependant, pour la paratuberculose ovine, dans les troupeaux allaitants à faible prévalence, la combinaison de la qPCR sur des prélèvements environnementaux et d'ELISA sur mélanges de sérums d'animaux de 2 à 3 ans non vaccinées pourrait être envisagée.

C) Intérêt économique

L'objectif de notre étude était d'évaluer la faisabilité de sérologies ELISA à partir d'échantillonnage en mélange afin de réduire les coûts liés au dépistage et ainsi d'améliorer la surveillance de la paratuberculose ovine.

En considérant qu'il n'y a pas de frais supplémentaires engendrés par la constitution du mélange et que le coût d'une sérologie ELISA individuelle pour un éleveur est d'environ 4€ à 6€, ainsi qu'en émettant l'hypothèse que les fabricants de kits ELISA n'augmenteraient pas le prix de leur produit pour compenser, la réduction de plaques utilisées lors d'analyses en mélange, la réduction du coût apparaît évidente.

Cependant, dans leur étude, Brinkhof et al. (2007) précisent que l'évaluation complète du bénéfice d'analyses en mélange nécessite de prendre en compte plusieurs paramètres : coût du test de dépistage, de la main d'œuvre pour composer les mélanges et pour estimer la séroprévalence de la maladie dans la population testée, du traçage des échantillons et du test de confirmation lorsque sont testés individuellement les échantillons des mélanges positifs. Cela permettrait, selon les auteurs, de trouver la taille du mélange correspondant à un optimum économique. Dans cette même étude, il a été conclu que le mélange d'échantillons n'était réalisable (au niveau économique) seulement pour suivre des troupeaux déclarés indemnes du lentivirus des petits ruminants. De façon analogue, pour la paratuberculose ovine, cet optimum économique dépend de la prévalence de la maladie dans la population.

CONCLUSION

L'objectif de notre étude était d'évaluer la sensibilité et la spécificité relatives de la sérologie réalisée sur des petits mélanges par rapport à la sérologie individuelle pour le dépistage des animaux infectés par *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.

Ainsi, des échantillons mélangés à différents degrés de dilutions, provenant de 14 élevages d'ovins allaitants du Lot infectés par la paratuberculose, ont été testés à l'aide des trousseaux IDEXX (Paratuberculosis Screening Ab Test) et IDVET (ID Screen Paratuberculosis Indirect) avec un protocole d'incubation long.

Dans une première série d'expériences de dilutions sériées, nous avons pu constater que le comportement des sérums après dilution est variable, dépendant de la valeur S/P initiale obtenue avec le sérum pur. Plus celle-ci est élevée, plus le pourcentage d'échantillons positifs après dilution est important i.e. moins l'effet de la dilution était important. De plus, la décroissance des valeurs S/P au cours des dilutions était plus faible que celle du modèle de dilution théorique. Par ailleurs, nous avons observé une variabilité entre échantillons dans la décroissance-même des valeurs S/P au cours des dilutions rendant la modélisation du comportement des valeurs S/P après dilution difficile.

Ces premiers résultats ont montré une dégradation trop importante de la sensibilité lorsque le seuil de positivité défini par le fabricant est appliqué aux analyses en mélanges. La spécificité relative, elle, reste parfaite (aucun échantillon initialement négatif n'est devenu positif après dilution).

L'objectif de la deuxième série d'expériences était donc de rechercher de nouveaux seuils de décision permettant d'améliorer la sensibilité des analyses en mélange sans en dégrader la spécificité. Les résultats obtenus ont d'abord confirmé les premiers constats : la sensibilité relative calculée en utilisant le seuil du fabricant est insatisfaisante pour la réalisation d'analyses en mélanges. Cependant, une amélioration de la sensibilité peut être obtenue en abaissant le seuil de décision.

Avec la trousse IDEXX, pour les mélanges de 5, le seuil de décision de 25% apparaît être le seuil optimal alors qu'il est de 15% pour les mélanges de 10 échantillons.

Pour la trousse IdVet, le seuil optimal est de 25% quel que soit le nombre d'échantillons par mélange bien que pour les mélanges de 10, ce seuil soit associé à des performances moins satisfaisantes rendant plus difficile le choix du seuil.

Cependant, quel que soit la trousse et le type de mélange, la dilution d'un unique échantillon positif de faible titre semble dégrader la sensibilité. Ce type d'échantillon limite les performances diagnostiques des analyses sérologiques en mélanges.

Ainsi, la mise en place d'un dépistage sérologique individuel à grande échelle n'étant pas réalisable compte tenu de la taille des troupeaux, une approche par l'analyse de mélange de sérums pourrait être une solution, afin d'améliorer la sensibilité à l'échelle collective et réduire fortement les coûts.

L'étude que nous avons menée montre cependant que l'analyse de petits mélanges de sérums pourrait être envisagée incluse dans les dispositifs de suivi des élevages vis-à-vis de la paratuberculose.

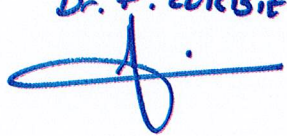
Compte tenu des performances hétérogènes selon la composition des mélanges, d'autres travaux restent cependant nécessaires afin d'évaluer la sensibilité et la spécificité à l'échelle des troupeaux de l'utilisation des sérologies ELISA appliquées à des petits mélanges de sérum pour l'établissement de leur statut sanitaire. Des travaux de simulations apparaissent nécessaires, prenant aussi en compte la prévalence intra-troupeau, la taille et le nombre de mélanges réalisés et la variabilité biologique entre élevages.

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 **Clotilde MONTOUROY** intitulée «**Evaluation des performances diagnostiques de la sérologie ELISA appliquée a des petits mélanges de sérums pour le diagnostic de la paratuberculose à l'échelle collective chez les ovins** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

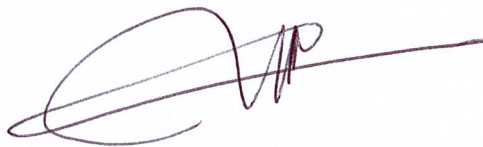
Fait à Toulouse, le 15 novembre 2017
Docteur **Fabien CORBIERE**
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Dr. F. CORBIERE


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



Vu :
Le Président du jury :
Professeur **Laurent MOLINIER**



Mlle Clothilde MONTOUROY
a été admis(e) sur concours en : 2012
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 08/09/2016
a validé son année d'approfondissement le : 24/05/2017
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

- Angelidou E, Kostoulas P, Leontides L. Estimation of sensitivity and specificity of a commercial serum/milk ELISA against the *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (MAP) antibody response for each lactation stage in Greek dairy sheep. *Prev Vet Med.* 2016 Feb 1;124:102-5.
- Angelidou E, Kostoulas P, Leontides L. Bayesian validation of a serum and milk ELISA for antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Greek dairy goats across lactation. *J Dairy Sci.* 2014 Feb;97(2):819-28.
- Arango-Sabogal JC, Labrecque O, Paré J, Fairbrother JH, Roy JP, Wellemans V, Fecteau G. 2016. Evaluation of a PCR assay on overgrown environmental samples cultured for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Vet Diagn Invest.* 28(6) : 638-645.
- Beaudeau, F., C. Fourichon, A. Robert, A. Joly, and H. Seegers. 2005. Bulk milk somatic cell counts and bovine viral diarrhoeavirus (BVDV) infection in 7252 dairy herds in Brittany (western France). *Prev. Vet. Med.* 72:163–167.
- Beaver A, Sweeney RW, Hovingh E, Wolfgang DR, Gröhn YT, Schukken YH. Longitudinal relationship between fecal culture, fecal quantitative PCR, and milk ELISA in *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*-infected cows from low-prevalence dairy herds. *J Dairy Sci.* 2017 Sep;100(9):7507-7521
- Beaver A, Cazer CL, Ruegg PL, Gröhn YT, Schukken YH. 2016. Implications of PCR and ELISA results on the routes of bulk-tank contamination with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *J Dairy Sci.* 99(2) : 1391-405.
- Berghaus R.D., T.B. Farver, R.J. Anderson[†], C.C. Jaravata, I.A. Gardner[‡]. 2006. Environmental Sampling for Detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* on Large California Dairies. *Journal of Dairy Science* 89 (3) : 963-970
- Beumer A., D. King, M. Donohue, J. Mistry, T. Covert, S. Pfaller, Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in drinking water and biofilms by quantitative PCR, *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (2010) 7367–7370
- Bhide, M., Chakurkar, E., Tkacikova, L., Barbuddhe, S., Novak, M., Mikula, I., 2006. IS900-PCR-based detection and characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from buffy coat of cattle and sheep. *Vet. Microbiol.* 112, 33–41
- Brinkhof J.M.A., D.J. Houwers, C. van Maanen. 2007. Development of a sample pooling strategy for the serodiagnosis of small ruminant lentiviral infections using the ELITEST-MVV ELISA, *Small Ruminant Research Volume 70, Issues 2–3, Pages 194-199*
- Brugel C., *Interpretation des réponses sérologiques non-négatives vis-à-vis de Mycobacterium avium subsp paratuberculosis dans des situations de faible prévalence de l'infection, Thèse pour le Doctorat Vétérinaire, Université Paul-Sabatier de Toulouse, 2014.*
- Cazer CL, Mitchell RM, Cicconi-Hogan KM, Gamroth M, Richert RM, Ruegg PL, Schukken YH. Associations between *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* antibodies in bulk tank milk, season of sampling and protocols for managing infected cows. *BMC Vet Res.* 2013 Nov 27;9:234.
- Chiodini RJ, Van Kruiningen, Merkal RS (1984). Ruminant *paratuberculosis* (Johne's disease) : the current status and future prospects. *The Cornell Veterinarian*, 74 (3) : 218–262
- Chognard T, 2011. *Evaluation du statut des troupeaux bovins vis-à-vis de l'infection à Mycobactérium avium subspecies paratuberculosis*, ONIRIS, Nantes, 149p.
- 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.

- Coelho A.C., M.L.Pinto, A.M.Coelho, J.Rodrigues, R.Juste. 2008. Estimation of the prevalence of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* by PCR in sheep blood. *Small Ruminant Research* Volume 76, Issue 3, Pages 201-206.
- Collins M T, Gardner I A, Garry F B, Roussel A J and Wells S J. 2006. Consensus recommendations on diagnostic testing for the detection of paratuberculosis in cattle in the United States. *J Am Vet Med Assoc*, 229: 1912-1919.
- Collins DM., Gabric DM, and De Isle GW (1990). Identification of Two Groups of *Mycobacterium Paratuberculosis* Strains by Restriction Endonuclease Analysis and DNA Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (7): 1591–1596
- Corbière F, Pouget C, Bernardin E, Brugidou R, Schelcher F. performance of a blocking antibody ELISA bulk-tank milk test for detection of dairy sheep flocks exposed to border disease virus. *J Dairy Sci*.2012 Nov;95(11):6542-5.
- Delbrouck Y. , Valeur informative d’outils utilisables à grande échelle pour déterminer le statut des troupeaux bovins laitiers vis-à-vis de l’infection par *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*, Thèse pour le Doctorat Vétérinaire, Faculté de Médecine de Nantes, 2008.
- 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 (5) : 857–866
- Dhand NK, Sergeant E, Toribio JR, Whittington RJ. 2010. Estimation of sensitivity and flock-sensitivity of pooled faecal culture for *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in sheep. *Preventive Veterinary Medicine* 95(3-4) : 248-57.
- Eamens G.J., D.M. Walker, N.S. Porter, S.A. Fell, Pooled faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* in goats, *Aust. Vet. J.* 85 (2007) 243–251.
- Eamens G.J. , R.J. Whittington, M.J. Turner, S.L. Austin, S.A. Fell, I.B. Marsh, Evaluation of radiometric faecal culture and direct PCR on pooled faeces for detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in cattle, *Vet. Microbiol.* 125 (2007) 22–35
- Eisenberg S W, Nielen M, Hoeboer J, Rutten V, Heederik D and Koets A P. 2012. Environmental contamination with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* within and around a dairy barn under experimental conditions. *J Dairy Sci*, 92: 6477-6482.
- Græsboell K, Andresen LO, Halasa T, Toft N. 2016. Opportunities and challenges when pooling milk samples using ELISA. *Preventive Veterinary Medicine* 139(Pt B):93-98
- Grébert V., valeur informative de prélèvements d’environnement et de grand mélange pour évaluer le niveau de contamination de troupeaux caprins par *mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, Thèse pour le Doctorat Vétérinaire, Faculté de Médecine de Nantes, 2013.
- Hendrick SH, Duffield TE, Kelton DE, Leslie KE, Lissemore KD, Archambault M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays performed on milk and serum samples for detection of paratuberculosis in lactating dairy cows. *J Am Vet Med Assoc*. 2005 Feb 1;226(3):424-8.
- Herthnek, Nielsen, Lindberg, Bölske. 2008. A robust method for bacterial lysis and DNA purification to be used with real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in milk *Journal of Microbiological Methods* 75 : 335–340.
- Huda A, Jungersen G, Lind P. Longitudinal study of interferon-gamma, serum antibody and milk antibody responses in cattle infected with *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. *Vet Microbiol.* 2004 Nov 30;104(1-2):43-53.
- Hugnet J. Concordance entre deux troussees sérologiques dans le diagnostic de la paratuberculose ovine : éléments de description à partir de 14 élevages du Lot (France), Thèse pour le Doctorat Vétérinaire, Université Paul-Sabatier de Toulouse, 2017.

- 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 (1) : 35–44
- Kostoulas P, Browne WJ, Nielsen SS, Leontides L. Bayesian mixture models for partially verified data: age- and stage-specific discriminatory power of an antibody ELISA for paratuberculosis. *Prev Vet Med*. 2013 Sep 1;111(3-4):200-5
- Kostoulas, Leontides, Enøe, Billinis, Florou, Sofia (2006). Bayesian estimation of sensitivity and specificity of serum ELISA and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis in Greek dairy sheep and goats. *Preventive Veterinary Medicine* 76, 56–73
- Krishnan MY, Manning EJB, Collins MT (2009). Comparison of Three Methods for Susceptibility Testing of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis to 11 Antimicrobial Drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64 (2) : 310–316.
- Kruze J., G.Monti, F.Schulze, A.Mella, S.Leiva. 2013. Short communication : Herd-level prevalence of *Map* infection in dairy herds of southern Chile determined by culture of environmental fecal samples and bulk-tank milk qPCR. *Preventive Veterinary Medicine* 111 (3-4) : 319-324
- Lafort M.P., La paratuberculose chez les ovins : effet de la vaccination sur la réponse sérologique et l'excrétion fécale de Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis, Thèse pour le Doctorat Vétérinaire, Université Paul-Sabatier de Toulouse, 2015.
- Lavers CJ, Barkema HW, Dohoo IR, McKenna SL, Keefe GP. 2014. Evaluation of milk ELISA for detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in dairy herds and association with within-herd prevalence. *J Dairy Sci*.97(1):299-309
- Lavers CJ, Dohoo IR, McKenna SL, Keefe GP. Sensitivity and specificity of repeated test results from a commercial milk enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc*. 2015 Jan 15;246(2):236-44
- Lombard JE, Byrem TM, Wagner BA, McCluskey BJ. Comparison of milk and serum enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in dairy cattle. *J Vet Diagn Invest*. 2006 Sep;18(5):448-58
- Lombard JE, Wagner BA, Smith RL, McCluskey BJ, Harris BN, Payeur JB, Garry FB and Salman MD. 2006. Evolution of environmental sampling and culture to determine Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis distribution and herd infection status on US dairy operations *J Dairy Sci*, 89: 4163-4171.
- Lovell R, Levi M, Francis J (1944). Studies on the survival of Johne's bacilli. *J. Comp. Path.*, 54, 120-129
- Mathevon Y, Foucras G, Falguières R, Corbiere F. Estimation of the sensitivity and specificity of two serum ELISAs and one fecal qPCR for diagnosis of paratuberculosis in subclinically infected young-adult French sheep using latent class Bayesian modeling. *BMC Veterinary Research* (2017) 13:230
- Mercier P, Baudry C, Beaudeau 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.
- Milner, Mack, Coates, Hill, Gill, Sheldrick. 1990. The sensitivity and specificity of a modified ELISA for the diagnosis of Johne's disease from a field trial in cattle. *Veterinary Microbiology*, 25, 193-198
- Moloney BJ, Whittington RJ. Cross species transmission of ovine Johne's disease from sheep to cattle: an estimate of prevalence in exposed susceptible cattle. *Aust Vet J*. 2008 ; 86 : 117–23.
- Moravkova M., V. Babak, A. Kralova, I. Pavlik, I. Slana, Culture- and Quantitative IS900 Real-Time PCR-Based Analysis of the Persistence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in a Controlled Dairy Cow Farm Environment, *Appl. Environ. Microbiol*. 78 (2012) 6608–6614

- Moriceau C, 2013. Evaluation de la valeur informative d'outils diagnostiques utilisés seuls ou en combinaison pour définir le statut des troupeaux bovins vis-à-vis de l'infection par *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. Docteur vétérinaire, ONIRIS,170.
- Mortier RA, Barkema HW, De Buck J. Susceptibility to and diagnosis of *Mycobacterium Avium* subspecies paratuberculosis infection in dairy calves: a review. *Prev Vet Med.* 2015;121:189–98.
- Ngwa V, Cuteri V, Pacifici L, Preziuso S, Moriconi M, Attili A.R. 2016. Evaluation of the association between the lactation stage and serum and milk ELISA results in the diagnosis of ovine Paratuberculosis. *Small Ruminant Research Volume 138, Pages 60-66*
- Nielsen SS, Gronbaek C, Agger J F and Houe H. 2002. Maximum-likelihood estimation of sensitivity and specificity of ELISAs and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis. *Prev Vet Med*, 53: 191-204.
- Nielsen S.S. , S.M. Thamsborg, H. Houe, V. Bitsch, Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds, *Prev. Vet. Med.* 44 (2000) 1–7.
- Nielsen et Toft (2014). Bulk tank milk ELISA for detection of antibodies to *Mycobacterium avium* subsp.paratuberculosis: Correlation between repeated tests and within-herd antibody-prevalence. *Preventive Veterinary Medicine* 113 : 96–102.
- Nielsen SS, Toft N (2009). A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Preventive Veterinary Medicine*, 88, 1–14
- Nielsen SS, Toft N (2008). Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon- γ assay and faecal culture techniques. *Veterinary Microbiology*, 129,217–235.
- Petit H (2006). La paratuberculose des petits ruminants : résultats d'une enquête GDS sur la paratuberculose. *Le Point Vétérinaire*, 263, 46-50
- Pesqueira MN, Yus E, Factor C, Mato I, Sanjuán ML, Eiras C, Arnaiz I, Diéguez FJ. Short communication: Correlation between within-herd antibody-prevalence and bulk tank milk antibody levels to *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis using 2 commercial immunoassays. *J Dairy Sci.* 2017 Sep;100(9):7544-7548.
- Pillai S and Jayarao B. 2002. Application of IS900 PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis directly from raw milk. *J Dairy Sci*, 85: 1052-1057.
- Pillars R.B., D.L. Grooms, J.B. Kaneene, Longitudinal study of the distribution of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in the environment of dairy herds in the Michigan John's disease control demonstration herd project, *Can Vet J.* 50 (2009) 1039–1046.
- Pradhan A K, Mitchell R M, Kramer A J, Zurakowski M J, Fyock T L, Whitloch R H, Smith J M, Hovingh E, Van Kessel J A, Karns J S and Schukken Y H. 2011. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in a longitudinal study of three dairy herds. *J Clin Microbiol* , 49: 893-901
- Raizman E.A. , S.J. Wells, S.M. Godden, R.F. Bey, M.J. Oakes, D.C. Bentley, et al., The distribution of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis in the environment surrounding Minnesota dairy farms, *J. Dairy Sci.* 87 (2004) 2959–2966.
- Rapport AFSSA : Paratuberculose des ruminants, 2009
- Salgado M, Manning EJ, Collins MT. Performance of a John's disease enzyme-linked immunosorbent assay adapted for milk samples from goats. *J Vet Diagn Invest.* 2005 Jul;17(4):350-4.
- Sergeant et Whittington, More. 2002. Sensitivity and specificity of pooled faecal culture and serology as flock-screening tests for detection of ovine paratuberculosis in Australia. *Preventive Veterinary Medicine* 52 : 199–211.
- Sevilla I, Garrido JM, Geijo M, Juste RA (2007). Pulsed-Field Gel Electrophoresis Profile Homogeneity of *Mycobacterium Avium* Subsp. Paratuberculosis Isolates from Cattle and Heterogeneity of Those from Sheep and Goats. *BMC Microbiology*, 7 (18): 1-15

- Sweeney RW, Whitlock RH, Hamir AN, Rosenberger AE, Herr SA. Isolation of mycobacterium paratuberculosis after oral inoculation in uninfected cattle. *Am J Vet Res.* 1992 ; 53 : 1312–4.
- Tavornpanich S., C.A. Muñoz-Zanzi, S.J. Wells, E.A. Raizman, T.E. Carpenter, W.O. Johnson, et al., Simulation model for evaluation of testing strategies for detection of paratuberculosis in midwestern US dairy herds, *Prev. Vet. Med.* 83 (2008) 65–82.
- Van Weering H, Van Schaik G, Van der Meulen A, Waal M, Franken P and Van Maanen K, 2007. Diagnostic performances of the Pourquier ELISA for detection of antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in individual milk and bulk milk samples of dairy herds. *Vet Microbiol*, 125: 233-244.
- Whan L, Grant IR, Rowe MT (2006). Interaction between *Mycobacterium Avium* Subsp. Paratuberculosis and Environmental Protozoa. *BMC Microbiology*, 6 : 63.
- Whitlock RH, Wells S J, Sweeney R W and Van Tiem J, 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet Microbiol*, 77: 387-398.
- Whitlock RH, 2006. Johne's disease: *Mycobacterium paratuberculosis* super-shedders: detection and contribution to passive shedding (false positive fecal culture) In 39th Annual conference of the American Association of Bovine Practitioner, pp. 286-2
- Whittington RJ, Fell S, Walker D, McAllister S, Marsh I, Sergeant E, Taragel CA, Marshall DJ, Links JJ. 2000. Use of pooled fecal culture for sensitive and economic detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in flocks of sheep. *J Clin Microbiol* 38(7):2550-6
- Whittington R.J. , D.J. Marshall, P.J. Nicholls, I.B. Marsh, L.A. Reddacliff, Survival and Dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in the Environment, *Appl Environ Microbiol.* 70 (2004) 2989–3004
- Wilson DJ, Rood K, Biswas P and Byrem TM. 2010. Herd-level prevalence of Johne's disease in Utah and adjacent areas of the intermountain west as detected by a bulk-tank milk surveillance project. *J Dairy Sci*, 93: 5792-5797.
- Winterhoff C, Beyerbach M, Homuth M, Strutzberg K, Gerlach GF. [Establishment and evaluation of an ELISA for the detection of antibodies in milk against *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 2002 May;109(5):230-4.
- Wolf R., H.W.Barkema, J.De Buck, K.Orsel (2015) Sampling location, herd size, and season influence *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* environmental culture results. *Journal of Dairy Science* 98 (1) :275-287
- Wolf R., H.W.Barkema, J.De Buck, M.Slomp[†], J.Flaig[†], D.Haupstein[‡], C.Pickel, K.Orsel. 2014. High herd-level prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Western Canadian dairy farms, based on environmental sampling. *Journal of Dairy Science* 97 (10) : 6250-6259

ANNEXES

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 1/20 de la solution de lavage (20X) dans de l'eau distillée (soit pour une plaque, 20 mL dans 380 mL 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 100 µL 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 300 µL de Solution de lavage. Eviter le dessèchement des cupules entre les lavages.
- Préparer le Conjugué en diluant le Conjugué concentré au 1/25 avec le Tampon de dilution 3.
 - Distribuer 100 µL 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 300 µL de Solution de lavage.
 - Distribuer 100 µL de Solution de révélation dans chaque cupule.
 - Incuber 15 min +/- 2min a 21°C (+/- 5°C) à l'obscurité.
 - Distribuer 100 µL 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 1/20 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 100 µL 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 300 µL de Solution de lavage. Eviter le dessèchement des cupules entre les lavages.
- Préparer le Conjugué en diluant le Conjugué concentré au 1/25 avec le Tampon de dilution N°1.
 - Distribuer 100 µL 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 300 µL de Solution de lavage.
 - Distribuer 100 µL de Substrat TMB N°9 dans chaque cupule.
 - Incuber 10 min +/- 3min à 21°C (+/- 5°C) à l'obscurité.
 - Distribuer 100 µL de Solution d'arrêt N°3 dans chaque cupule pour arrêter la réaction.
 - Mesurer et enregistrer les densités optiques à 450 nm.

Tableau 10 : Sensibilités relatives après dilutions (5 et 10), calculées à différents seuils pour la trousse IDEXX avec n le nombre d'échantillons positifs au seuil considéré ;
 * 1 Positif Fort mélangé avec des échantillons Dtx, NF ou Nf ; ** 1 Positif faible mélangé avec des échantillons Nf exclusivement ; *** 2 Positifs faibles mélangés avec des échantillons Nf exclusivement.

SENSIBILITE IDEXX

| | | MOY | ECT | 1 Positif fort * (> 90) [n = 21] | | | | | | | | | | | |
|---------|--------------|--------------|-----|---|--------|----|--------|----|--------|----|--------|----|-------|----------------|-------|
| Seuil | | | | 15 | | 20 | | 25 | | 30 | | 35 | | 55 (fabricant) | |
| | | | | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Dil. 5 | 66,96 | 15,67 | | 21 | 100,0% | 21 | 100,0% | 21 | 100,0% | 20 | 95,2% | 20 | 95,2% | 15 | 71,4% |
| Dil. 10 | 47,02 | 16,20 | | 21 | 100,0% | 19 | 90,5% | 19 | 90,5% | 17 | 81,0% | 16 | 76,2% | 10 | 47,6% |
| | | | | 1 Positif faible ** (55 - 90) [n = 37] | | | | | | | | | | | |
| Seuil | | | | 15 | | 20 | | 25 | | 30 | | 35 | | 55 (fabricant) | |
| | | | | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Dil. 5 | 32,76 | 11,90 | | 32 | 86,5% | 28 | 75,7% | 23 | 62,2% | 21 | 56,8% | 19 | 51,4% | 1 | 2,7% |
| Dil. 10 | 21,00 | 9,65 | | 24 | 64,9% | 17 | 45,9% | 14 | 37,8% | 7 | 18,9% | 7 | 18,9% | 0 | 0,0% |
| | | | | 2 Positifs faibles *** (55 - 90) [n = 21] | | | | | | | | | | | |
| Seuil | | | | 15 | | 20 | | 25 | | 30 | | 35 | | 55 (fabricant) | |
| | | | | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Dil. 5 | 58,81 | 7,51 | | 21 | 100,0% | 21 | 100,0% | 21 | 100,0% | 21 | 100,0% | 20 | 95,2% | 16 | 76,2% |
| Dil. 10 | 42,26 | 7,65 | | 21 | 100,0% | 20 | 95,2% | 20 | 95,2% | 19 | 90,5% | 17 | 81,0% | 2 | 9,5% |

Tableau 11 : Spécificités relatives après dilutions (5 et 10), calculées à différents seuils pour la trousse IDEXX avec n le nombre d'échantillons positifs au seuil considéré ; * que des échantillons Négatifs faibles ; ** 1 Négatif Fort mélangé avec des échantillons Nf exclusivement ; *** 2 Négatifs Forts mélangés avec des échantillons Nf exclusivement.

SPECIFICITE IDEXX

| | | MOY | ECT | Négatifs faibles* (< 20) [n = 30 à dil.5 et n = 21 à dil.10] | | | | | | | | | | | |
|---|--------------|-------------|-----|--|--------|----|--------|----|--------|----|--------|----|--------|----------------|--------|
| Seuil | | | | 15 | | 20 | | 25 | | 30 | | 35 | | 55 (fabricant) | |
| | | | | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Dil. 5 | 6,19 | 2,76 | | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% |
| Dil. 10 | 4,70 | 1,56 | | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% |
| 1 Négatif fort** (20 -45) [n = 41 à dil.5 et n = 38 à dil.10] | | | | | | | | | | | | | | | |
| Seuil | | | | 15 | | 20 | | 25 | | 30 | | 35 | | 55 (fabricant) | |
| | | | | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Dil. 5 | 8,55 | 4,48 | | 5 | 87,8% | 2 | 95,1% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% |
| Dil. 10 | 6,40 | 3,02 | | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% |
| 2 Négatifs forts*** (20 -45) [n = 21 à dil.5 et n = 28 à dil.10] | | | | | | | | | | | | | | | |
| Seuil | | | | 15 | | 20 | | 25 | | 30 | | 35 | | 55 (fabricant) | |
| | | | | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Dil. 5 | 14,11 | 6,31 | | 11 | 47,6% | 6 | 71,4% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% |
| Dil. 10 | 6,33 | 3,42 | | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% |

Tableau 12 : Sensibilités relatives après dilutions (5 et 10), calculées à différents seuils pour la trousse IDVET avec n le nombre d'échantillons positifs au seuil considéré ;
 * 1 Positif Fort mélangé qu'avec des échantillons Pf (maximum 1), Dtx, NF ou Nf ; ** 1 Positif faible mélangé avec des échantillons Dtx (maximum 1), Nf (maximum 1) ou Nf ;
 *** 2 Positifs faibles mélangés avec des échantillons Nf exclusivement.

SENSIBILITE IDVET

| 1 Positif fort * (> 140) [n = 38 à la dil.5 et n = 41 à la dil.10] | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--------|-------|----|--------|----|--------|----|--------|----|--------|----|--------|----------------|-------|
| Seuil | MOY | ECT | 20 | | 25 | | 30 | | 35 | | 40 | | 70 (fabricant) | |
| | | | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Dil. 5 | 110,55 | 42,51 | 38 | 100,0% | 38 | 100,0% | 38 | 100,0% | 37 | 97,4% | 37 | 97,4% | 27 | 71,1% |
| Dil. 10 | 72,97 | 38,60 | 38 | 92,7% | 37 | 90,2% | 34 | 82,9% | 34 | 82,9% | 30 | 73,2% | 18 | 43,9% |
| 1 Positif faible ** (70 - 140) [n = 41 à la dil.5 et n = 49 à la dil.10] | | | | | | | | | | | | | | |
| Seuil | MOY | ECT | 20 | | 25 | | 30 | | 35 | | 40 | | 70 (fabricant) | |
| | | | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Dil. 5 | 46,24 | 17,29 | 36 | 87,8% | 32 | 78,0% | 30 | 73,2% | 26 | 63,4% | 22 | 53,7% | 5 | 12,2% |
| Dil. 10 | 26,36 | 13,78 | 26 | 53,1% | 23 | 46,9% | 17 | 34,7% | 13 | 26,5% | 10 | 20,4% | 3 | 6,1% |
| 2 Positifs faibles *** (70 - 140) [n = 8] | | | | | | | | | | | | | | |
| Seuil | MOY | ECT | 20 | | 25 | | 30 | | 35 | | 40 | | 70 (fabricant) | |
| | | | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Dil. 5 | 62,19 | 9,13 | 8 | 100,0% | 8 | 100,0% | 8 | 100,0% | 8 | 100,0% | 8 | 100,0% | 2 | 25,0% |
| Dil. 10 | 41,77 | 7,32 | 8 | 100,0% | 8 | 100,0% | 8 | 100,0% | 7 | 87,5% | 4 | 50,0% | 0 | 0,0% |

Tableau 13 : Spécificités relatives après dilutions (5 et 10), calculées à différents seuils pour la trousse IDVET avec n le nombre d'échantillons positifs au seuil considéré ; * que des échantillons Négatifs faibles ; ** 1 Négatif Fort mélangé avec des échantillons Nf exclusivement ; *** 2 Négatifs Forts mélangés avec des échantillons Nf exclusivement.

SPECIFICITE IDVET

| Négatifs faibles* (< 40) [n = 33 à dil.5 et n = 44 à dil.10] | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-------|------|----|--------|----|--------|----|--------|---|--------|----------------|--------|---|--------|
| Seuil | MOY | ECT | 20 | | 25 | | 30 | 35 | | 40 | 70 (fabricant) | | | |
| | | | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Dil. 5 | 5,18 | 4,70 | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% |
| Dil. 10 | 5,30 | 4,46 | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% |
| 1 Négatif fort** (40 - 60) [n = 15 à dil.5 et n = 25 à dil.10] | | | | | | | | | | | | | | |
| Seuil | MOY | ECT | 20 | | 25 | | 30 | 35 | | 40 | 70 (fabricant) | | | |
| | | | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Dil. 5 | 8,14 | 4,26 | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% |
| Dil. 10 | 5,61 | 5,59 | 2 | 92,0% | 1 | 96,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% |
| 2 Négatifs forts*** (40 -60) [n = 6] | | | | | | | | | | | | | | |
| Seuil | MOY | ECT | 20 | | 25 | | 30 | 35 | | 40 | 70 (fabricant) | | | |
| | | | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Dil. 5 | 32,92 | 4,65 | 6 | 0,0% | 5 | 16,7% | 5 | 16,7% | 3 | 50,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% |
| Dil. 10 | 23,70 | 2,99 | 5 | 16,7% | 2 | 66,7% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% | 0 | 100,0% |

TITRE : EVALUATION DES PERFORMANCES DIAGNOSTIQUES DE LA SEROLOGIE ELISA APPLIQUEE A DES PETITS MELANGES DE SERUMS POUR LE DIAGNOSTIC DE LA PARATUBERCULOSE A L'ECHELLE COLLECTIVE CHEZ LES OVINS.

RESUME :

La paratuberculose ovine est une infection chronique incurable due à *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map). Son diagnostic est difficile au stade préclinique du fait de la complexité de la physiopathologie et de l'absence d'un test de référence.

L'objectif de cette étude était d'évaluer les performances diagnostiques relatives de la sérologie appliquée à des mélanges de sérums pour le diagnostic de la paratuberculose ovine à l'échelle collective et de définir les conditions de mise en œuvre (nombre d'échantillons par mélange et seuil de décision) permettant de garantir une bonne sensibilité de détection tout en ne dégradant pas la spécificité. Pour ce faire, les résultats sérologiques obtenus à partir de 2 trousse ELISA du commerce après dilutions d'échantillons de sérums provenant de 14 élevages du Lot, infectés par la paratuberculose, ont été étudiés.

Les résultats indiquent que l'application à des mélanges de sérums des seuils de positivité recommandés par les fabricants pour les analyses d'échantillons individuels conduit à une dégradation trop importante de la sensibilité de détection. L'abaissement des seuils de décision permet en revanche d'obtenir une sensibilité et spécificité en mélanges satisfaisantes, dépendant cependant de la valeur S/P initiale de l'échantillon dilué. Les meilleures performances diagnostiques des trousse ELISA ont été constatées pour les mélanges dans lesquels se trouvent des échantillons ayant initialement les plus hautes valeurs S/P.

MOTS-CLES : Paratuberculose ; Ovins ; Sérologie ; ELISA ; Sérums ; Mélanges ; Sensibilité ; Spécificité.

TITLE : DIAGNOSTIC PERFORMANCES OF SERUM ELISA APPLIED TO POOLED SAMPLES FOR DIAGNOSIS OF PARATUBERCULOSIS AT THE FLOCK LEVEL IN SHEEP.

ABSTRACT :

Paratuberculosis in sheep is a chronic and fatal infection due to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map). The lack of a perfect Gold Standard test and the complex pathophysiology of the infection course make it difficult to diagnose in sub-clinically infected animals.

This work aimed at evaluating the relative sensitivity and the sensibility of serology applied to pooled serum samples for Map detection and to define the conditions (pool sizes and decision thresholds) for which a good detection rate without loss of specificity could be achieved.

The ELISA serological results yielded by two commercial kits in diluted serum samples from 14 paratuberculosis infected flocks from South West France (Lot), were analysed. .

Our results indicate that for both ELISA kits, applying the decision thresholds defined by the manufacturers to pooled serum samples resulted in a significant loss in sensitivity. Lowering the decision threshold, though, lead to suitable sufficient sensibilities and specificities. Results were however highly dependent on the initial S/P value of the diluted sample. The best diagnostic performances were were reached for pools with samples which had initially the higher S/P values.

KEY WORDS : Paratuberculosis ; Sheep ; Serology ; ELISA ; Serum ; Pooled samples ; Sensitivity ; Specificity.