

VALEUR INFORMATIVE DE DIFFERENTES ANALYSES DE MELANGE POUR EVALUER LE STATUT DES TROUPEAUX LAITIERS VIS-A-VIS DE L'INFECTION PAR *MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS**

Gilles Roger¹, Alain Joly^{1,2}, François Beaudeau², Raphaël Guatteo²,
Henri Seegers² et Christine Fourichon²

RESUME

L'objectif de cette étude était d'estimer la valeur informative de différentes analyses de mélange pour déterminer le statut de troupeaux bovins laitiers vis-à-vis de la paratuberculose. Dans 55 troupeaux laitiers avec historique de paratuberculose connu, différentes analyses (ELISA, PCR, paraJEM®) ont été réalisées sur des prélèvements de lait et/ou de fèces individuels ainsi que sur des petits mélanges reconstitués au laboratoire et des prélèvements d'environnement. La sensibilité d'une combinaison d'analyses basée sur la réalisation d'ELISA sur des laits de mélange ciblés selon le rang de lactation des vaches et de PCR ou de paraJEM® sur les fèces prélevées dans l'environnement ou sur de jeunes animaux a été forte selon la précision souhaitée. Par rapport aux méthodes de référence habituellement choisies (analyses individuelles sur tous les animaux), la méthode proposée permet de réduire considérablement les coûts avec un niveau de sensibilité équivalent à celui apporté par le gold-standard.

Mots-clés : paratuberculose, statut, troupeau laitier, analyse de mélange.

SUMMARY

This study was designed to evaluate the informative value of pool milk samples to determine the status of dairy herds regarding Paratuberculosis. In 55 dairy herds with a history of Paratuberculosis, various tests (ELISA, PCR and paraEM) were carried out on individual milk and feces samples, as well as on pooled samples prepared in the laboratory. High sensitivity was obtained from ELISA tests on pooled milk samples and from PCR and paraEM tests on feces samples collected in the environment or from young animals.

Compared to conventional techniques requiring analyses of samples from all (individual animals), the proposed method leads to a considerable cost reduction with the same level of sensitivity.

Keywords: Paratuberculosis, Status, Dairy herd, Pooled samples.



* Texte de la communication orale présentée au cours des Journées scientifiques AEEMA, 21 mai 2010

¹ Union Bretonne des Groupements de Défense Sanitaire, 56003, Vannes, France

² Unité Mixte BioEpaR 1300, Oniris, INRA Université Nantes Angers Le Mans, 44300, Nantes, France

I - CONTEXTE/ENJEUX

La paratuberculose est une maladie chronique, infectieuse, contagieuse due à la prolifération d'une mycobactérie *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), appelée aussi Bacille de Johne. Les principaux symptômes de la paratuberculose, encore appelée maladie de Johne, sont une diarrhée chronique, incurable, survenant le plus souvent après le premier ou le second vêlage ; l'amaigrissement est progressif et irrémédiable.

Cette maladie a un impact économique extrêmement important. Par exemple, des pertes de production ont été mises en évidence et chiffrées : dans une étude [Beaudeau *et al.*, 2007] portant sur 15 490 vaches issues de 569 troupeaux. On constate que la production laitière journalière moyenne par vache est significativement inférieure chez les vaches issues de troupeaux contenant au moins une vache infectée. Les pertes de production laitière ont été évaluées à 1,6, 2,5, 2, 1 et 6,2 Kg/jour respectivement pour les vaches à réponse négative dans un troupeau infecté, les vaches séropositives non vaccinées, celles à PCR ou culture fécale positive et enfin les animaux atteints de diarrhée (stade avancé de la maladie).

A l'échelon local, il est difficile de connaître la prévalence réelle de la maladie, compte tenu, d'une part, du défaut de sensibilité des tests, d'autre part, de la difficulté qu'ont les gestionnaires de la santé, et notamment les Groupements de défense sanitaire, à coordonner leurs objectifs en matière de maîtrise de la paratuberculose. Les tests disponibles à ce jour ne permettent pas de détecter tous les animaux infectés. Plusieurs techniques sont disponibles. Les plus fréquemment utilisées sont les techniques ELISA appliquées au sang ou au lait, dont la sensibilité est relativement mauvaise (entre 30 et 80% selon les coffrets et les auteurs). La spécificité des ELISA sur sérum est fréquemment comprise entre 90% et plus de 99% [Coquin, 2007]. La mise en évidence des Mycobactéries dans les matières fécales est possible grâce à des techniques de culture sur milieu spécifique ou des techniques PCR. Leur sensibilité reste également médiocre (entre 20 et 40%). La spécificité est bonne et proche de 100% en conditions de terrain, même si les

sondes utilisées dans le cadre de la PCR, basées sur la détection de l'IS 900, peuvent croiser avec d'autres mycobactéries. Depuis peu, une technique nouvelle (paraJEM® combinant culture en milieu liquide et PCR après 42 jours sur le milieu de culture) semble améliorer la sensibilité de façon assez conséquente [Daly *et al.*, 2009]. Enfin, il convient de rappeler l'absence de réelle technique de référence, ce qui provoque toujours des débats sur les niveaux de sensibilité et de spécificité des différents outils.

Si l'assainissement des élevages infectés est un objectif visé par la plupart des GDS, la maîtrise des nouvelles infections peut également être envisagée au travers de dispositifs destinés à garantir les animaux commercialisés. Un dispositif national est disponible en France, sous l'autorité de l'ACERSA, mais ne concerne qu'un nombre très faible d'élevages, le plus souvent vendeurs d'animaux de très haute valeur génétique ou de mâles reproducteurs destinés aux stations de testage. Mais force est de constater que la plupart des éleveurs régulièrement vendeurs d'animaux reproducteurs (génisses amouillantes, vaches en lactation) ne connaissent pas le statut de leur troupeau vis-à-vis de l'infection par MAP et contribuent donc à infecter de nouveaux troupeaux.

Les GDS du Grand Ouest (Bretagne, Pays de Loire et Normandie) ont engagé et partagé avec l'UMT Maîtrise de la santé des troupeaux bovins une réflexion sur le long terme visant à organiser les mouvements d'animaux en fonction du risque paratuberculose. L'objectif de ce projet est de concevoir et d'évaluer des dispositifs de définition et d'utilisation de statuts de cheptels s'appuyant sur une analyse de risque et reposant sur le principe de flux orientés des bovins entre cheptels selon ces statuts (un cheptel ne pouvant introduire des bovins que s'ils sont issus de troupeaux à statut équivalent ou plus favorable).

L'objectif de cette étude préliminaire, menée sur un échantillon restreint et stratifié de 55 troupeaux laitiers, est d'estimer la valeur informative d'analyses effectuées sur des prélèvements de petit mélange et d'essayer d'identifier la (les) combinaison(s) la (les) plus pertinente(s) possible(s).

II - MATERIEL/METHODES

1. CHOIX DES ELEVAGES

Cinquante cinq élevages laitiers bretons détenant en moyenne 40 vaches laitières ont été recrutés en fonction de leur prévalence attendue vis-à-vis de la paratuberculose. dix d'entre eux étaient des élevages à réponses régulièrement négatives au regard des critères de l'ACERSA. Les 45 autres avaient fait l'objet de trois classes : faiblement contaminés (séroprévalence apparente $\leq 3\%$), moyennement contaminés (3 à 10%) et fortement contaminés ($> 10\%$). Il n'a pas été tenu compte des réformes réalisées entre la date de la dernière analyse et la date de l'inclusion. Le choix des élevages s'est fait sur la base du volontariat et de la facilité à réaliser les prélèvements.

2. PRELEVEMENTS

2.1. REALISATION DES PRELEVEMENTS ELEMENTAIRES

Dans tous les élevages, les prélèvements suivants ont été réalisés :

- 40 ml de lait individuel sur toutes les vaches en lactation,
- 40 g de fèces individuel sur toutes les vaches en lactation,
- lait de tank,
- 40 g de fèces sur l'aire d'attente, en 5 ou 6 points différents,
- 40 g de fèces sur l'aire d'exercice, en 5 ou 6 points différents.

2.2. CONSTITUTION DES PRELEVEMENTS DE PETIT MELANGE

A partir des prélèvements individuels, les mélanges suivants ont été reconstitués :

- Mélange de cinq laits individuels, ajustés selon la parité. Par exemple, dans un élevage où étaient présentes 13 vaches en première lactation (L1), trois mélanges de cinq laits individuels ont été constitués (deux laits individuels contribuant chacun dans cet exemple à deux mélanges différents). Le même principe a été appliqué pour les vaches en deuxième lactation (L2), pour les vaches en troisième

lactation (L3) et pour les vaches en quatrième lactation ou plus (L4+) ;

- Mélange de cinq laits individuels à partir de vaches vèlées depuis moins de deux mois, sans tenir compte de la parité ;
- Mélange de cinq fèces individuelles, ajustées selon la parité, sur les mêmes principes que les mélanges de laits individuels.

3. LES ANALYSES

Les prélèvements ainsi réalisés ont été soumis aux analyses décrites dans le tableau 1. Pour les ELISA, nous avons choisi les coffrets commercialisés par la société LSI et par IdVet. Pour la PCR et le paraJEM®, nous avons choisi les coffrets commercialisés par la société LSI.

4. TRAITEMENT DES RESULTATS

4.1. EXPRESSION DES RESULTATS

Les résultats ont été fournis selon les modalités prévues par les fabricants de réactifs, à la fois en données qualitatives (Positif, Douteux, Négatif) ou quantitative (Rapport E/P de l'ELISA ou valeur du Ct pour la PCR).

Pour les analyses ELISA réalisées sur les laits de petit mélange ou sur le lait de tank, les seuils fournis par le fabricant pour les analyses individuelles ont été appliqués.

4.2. ANALYSE DES RESULTATS

4.2.1. Première étape : Classement des cheptels selon la méthode de référence

La référence de classement a été obtenue par la combinaison des analyses individuelles sur lait (ELISA) et fèces (PCR). Les cheptels ont été classés selon les modalités décrites dans le tableau 2. Nous avons volontairement choisi de classer « positif » un cheptel dans lequel une seule sérologie individuelle était positive, ce classement privilégiant la sensibilité au détriment de la spécificité puisque nous intervenions dans des élevages à historique de paratuberculose.

Tableau 1
Nature des analyses mises en œuvre

Analyse	Support	Coffrets utilisés
ELISA Ac	- lait individuel - lait de petit mélange - lait de tank	2 coffrets commerciaux
PCR	- fèces individuelles	1 coffret PCR commercial
PCR et paraJEM®	- fèces de petit mélange - fèces aire d'attente (AA) - fèces aire d'exercice (AE) - lait de tank	paraJEM®

Tableau 2
Principes de classement des cheptels selon la méthode de référence

	Toutes les sérologies ELISA négatives	Au moins une sérologie ELISA positive
Toutes PCR individuelles négatives	A (négatif)	B (séropositif)
Au moins une PCR positive		C (excréteur)

4.2.2. Deuxième étape : Classement des cheptels selon les résultats des outils

Chaque analyse réalisée sur des petits mélanges a permis de classer les troupeaux selon un résultat positif ou négatif vis-à-vis du mélange étudié. Par exemple, lorsque les sérologies ELISA réalisées sur les laits de petit mélange des 1^{ères} lactations étaient toutes négatives, le cheptel était classé « négatif » au vu des ELISA L1. A l'inverse, si au moins 1 des petits mélanges s'avérait positif sur les

mêmes prélèvements, le cheptel était classé « positif ».

4.2.3. Troisième étape : Analyse des qualités intrinsèques des outils simples. Calcul de sensibilité et la spécificité

Les valeurs de sensibilité (Se) et de spécificité (Sp) de chaque outil simple ont ensuite été calculées par rapport au classement de référence, selon l'exemple décrit dans le tableau 3.

Tableau 3
Principes de classement des cheptels selon la technique d'analyse choisie

Nombre de troupeaux positifs selon la référence	Nombre de troupeaux positifs avec l'outil utilisé	Nombre de troupeaux négatifs avec l'outil utilisé (ex ELISA L1)
A	a	a'
B	b	b'
C	c	c'

Pour discriminer les troupeaux excréteurs (C) des autres troupeaux :

$$Se = \frac{c}{c+c'} \quad Sp = \frac{a'+b'}{(a+b)+(a'+b')}$$

Pour discriminer les troupeaux positifs des autres troupeaux :

$$Se = \frac{b+c}{b+c+b'+c'} \quad Sp = \frac{a'}{a+a'}$$

Ces calculs ont été effectués pour tous les outils utilisés.

4.2.4. Quatrième étape : Analyse des qualités intrinsèques des outils combinés

A partir des données de sensibilité et spécificité calculées pour les outils simples, nous avons ensuite recherché les combinaisons d'outils simples permettant d'obtenir les meilleurs Se et Sp par rapport à la méthode de référence. Le travail a été effectué pour toutes les combinaisons possibles à partir de deux, trois ou quatre outils simples. Par exemple, nous avons combiné les résultats donnés par l'ELISA sur le lait de tank : lorsque au moins un des résultats était positif, la combinaison était bien entendue considérée comme positive. Nous avons ensuite recalculé les sensibilités et spécificités des combinaisons selon les mêmes modalités que pour les outils simples.

III - PRINCIPAUX RESULTATS

L'étude des cheptels avec la méthode de référence a permis de classer six cheptels en A, 22 en B et 27 en C (cf. tableau 4). Dans ces deux dernières catégories, on observe une

variabilité importante à la fois pour la séroprévalence (de 1 à 15 séropositifs par troupeau) que pour l'excrétion (de 1 à 15 positifs également).

Tableau 4
Classement des cheptels selon la méthode de référence

	Nombre	%
A (négatifs)	6	11
B (séropositifs)	22	40
C (excréteurs)	27 ¹	49
Total	55	100

¹ dont deux sans vache séropositive

Si l'on considère les outils simples, il faut souligner les performances de certains d'entre eux : ainsi, l'ELISA réalisée sur des mélanges de cinq laits des vaches en deuxième lactation (ELISA L2) permet de détecter 15 des 27 troupeaux C (Se= 0,56) ou 17 des 49 troupeaux B ou C (Se= 0,35) (tableau 5). Les performances de l'ELISA sur les L4+ sont comparables (respectivement 0,59 et 0,37). La sensibilité de la PCR réalisée sur des fèces

prélevées sur l'aire d'exercice pour détecter les troupeaux excréteurs est de 0,44 alors que celle de la technique ParaJEM® appliquée aux mêmes prélèvements est de 0,74 pour détecter les C et de 0,55 pour les B et C. A noter enfin que la sensibilité de l'ELISA lait de tank est de 0,44 pour détecter les troupeaux C et que ni la PCR ni le paraJEM® appliqués au lait de tank ne sont performants (Se= 0).

Tableau 5

Nombre de troupeaux détectés par des outils simples en comparaison avec la référence

	Nb	ELISA L2	ELISA L4+	PCR AA ¹	Para Jem AA
A	6	0	0	0	1
B	22	2	2	2	7
C	27	15	16	12	20

¹ Aire d'attente de la salle de traite

Différentes combinaisons d'outils simples ont été testées. Parmi les plus performantes, on peut retenir, pour détecter les troupeaux infectés, la combinaison ELISA sur les L2 et les L4+ associée à une PCR réalisée sur les fèces prélevées sur l'aire d'attente (Se= 0,78). Pour repérer les troupeaux B et C, la sensibilité de cette combinaison est de 0,57 (Sp=1). Si la PCR est remplacée par une paraJEM®, les sensibilités sont égales respectivement à 0,93 et 0,72. En outre, un troupeau classé en A est également détecté (tableaux 6 et 7).

Les derniers résultats d'intérêt concernent une combinaison d'outils ELISA sur les L2 et les L4+ associés à une paraJEM® réalisée sur les fèces des vaches en première lactation (Se= 0,96 pour les C et 0,77 pour les B+C).

Enfin, d'autres combinaisons ont été testées, (en ajoutant un ou plusieurs outils simples) permettant le plus souvent d'augmenter la sensibilité [Joly *et al.*, 2009]. A noter que cinq troupeaux A restent négatifs quelles que soient les combinaisons testées. Il s'agit de cheptels présumés négatifs au vu des critères ACERSA.

Tableau 6

Nombre de troupeaux détectés par des combinaisons d'outils simples (lait et environnement) en comparaison avec la référence

Classement selon la méthode de référence	Nb de troupeaux positifs selon les combinaisons	
	E L2, E L4+, PCR AA	EL2, E L4+, paraJEM® AA
A	6	1
B	22	10
C	27	25

Tableau 7

Nombre de troupeaux détectés par des combinaisons d'outils simples (lait+petits mélanges de fèces)

Classement selon la méthode de référence	Nb de troupeaux positifs selon les combinaisons	
	E L2, E L4+, paraJEM® L1	
A	6	1
B	22	12
C	27	26

IV - DISCUSSION/PERSPECTIVES

Les résultats de cette étude préliminaire sont très prometteurs.

- Le premier intérêt de cette étude est de montrer que la combinaison d'analyses sérologiques et bactériologiques (au sens large), ciblées sur des classes d'âge différentes est très pertinente pour optimiser les chances de détecter les troupeaux infectés: les meilleurs classements sont obtenus en réalisant des analyses ELISA sur les animaux les plus âgés et la recherche de Mycobactérie dans l'environnement ou chez des jeunes animaux (vaches en première lactation).
- Le deuxième intérêt de cette étude est de suggérer l'avantage d'une démarche en plusieurs étapes en utilisant des outils différents selon les objectifs. En effet, une première combinaison d'analyses simples à mettre en oeuvre (ELISA de petit mélange sur les deuxièmes et quatrièmes lactations et plus) permet de détecter plus de 60% des troupeaux excréteurs et une partie des troupeaux "séropositifs". Si l'objectif est de détecter les troupeaux excréteurs, la réalisation d'une PCR, ou, mieux, d'une paraJEM® sur des prélèvements d'environnement peut s'avérer suffisante. Si, au contraire, l'objectif est de détecter la majorité des troupeaux non négatifs, une paraJEM® réalisée dans un second temps sur des prélèvements de fèces individuelles analysées en mélanges de 5, contribue de façon très raisonnable à améliorer la sensibilité de la méthode.

La méthode de référence ici choisie est très robuste, puisqu'elle associe sérologie et PCR individuelles sur toutes les vaches en lactation, ce qui est plus exigeant que les recommandations de l'ACERSA. Si les calculs de sensibilité de nos outils simples et des combinaisons étaient refaits par rapport à une seule technique de référence (ELISA individuelle OU PCR individuelle), toutes les valeurs de sensibilité seraient augmentées, et atteindraient 1 pour certaines d'entre elles. A l'inverse, la spécificité serait dégradée, mais on serait en droit d'évoquer un défaut de sensibilité de la référence plutôt qu'un défaut de spécificité de notre méthode. A ce titre, des investigations complémentaires dans l'élevage A détecté positif par la combinaison ELISA L2 ELISA L4+ et paraJEM® sur l'aire d'attente

montrent qu'il s'agit bien d'un élevage infecté et donc d'un faux négatif par la méthode de référence et non pas d'un faux positif par notre méthode.

- Le troisième intérêt de cette étude porte sur les coûts : compte tenu des tarifs habituellement pratiqués par les laboratoires d'analyse, le coût des analyses nécessaires au classement d'un troupeau de 40 vaches laitières par la méthode de référence est d'environ 1 520 euros. Pour une qualification de type ACERSA, il serait de 320 ou de 1 000 euros environ selon la technique choisie (ELISA ou PCR). Avec la méthode proposée, il n'est que de 60 euros pour détecter un élevage C ou de 135 euros pour détecter un élevage B ou C (analyses sur mélanges de fèces individuelles)

Bien évidemment, il est important de consolider les premières informations apportées par ce protocole. Plusieurs points méritent d'être traités:

- Confirmation sur plusieurs centaines d'élevages de l'intérêt des combinaisons privilégiées ici,
- Recherche sur les mêmes élevages d'autres combinaisons d'intérêt,
- Calcul des sensibilités et spécificités des différents outils et combinaisons sur plusieurs centaines de troupeaux ,
- Exploitation des données quantitatives pour ajuster les seuils en ELISA de mélange,
- Adaptation de la méthode aux élevages allaitants.

Pour répondre à ces différentes interrogations, un protocole sera mis en oeuvre en 2010 dans 400 élevages (dont une centaine d'allaitants et une centaine de troupeaux présumés indemnes). Les résultats sont espérés pour mi 2011 et devraient permettre de proposer une méthode reconnue de classement des cheptels selon leur statut vis-à-vis de la paratuberculose, selon leur risque de détenir des animaux infectés. Ces statuts pourraient servir de base à des règles de commercialisation des animaux.

V - CONCLUSION

Si l'objectif de définir un statut d'élevage vis-à-vis de la paratuberculose a déjà fait l'objet de divers travaux, cette étude est novatrice sur plusieurs points. D'une part, la discrimination des cheptels est réalisée par une association d'analyses directes et indirectes. D'autre part, les outils utilisés sont des combinaisons pertinentes de petits mélanges issus de prélèvements réalisés sur des animaux ciblés et/ou sur l'environnement. Enfin, les matrices employées (notamment le lait), ainsi que les mélanges réalisés permettent de réduire de manière très importante le coût de l'établissement d'un tel statut en élevage.

De nombreuses données sont encore à exploiter et viendront affiner les résultats. Il s'agit des informations semi-quantitatives des tests utilisés et la possibilité de faire varier les seuils de positivité.

La validation à grande échelle des méthodes suggérées par cette étude et leur adaptation aux élevages allaitants laissent entrevoir une généralisation possible de la connaissance des statuts des troupeaux et une organisation des échanges commerciaux susceptible de contribuer à la maîtrise des nouvelles infections.

BIBLIOGRAPHIE

Beaudeau F., Belliard M., Joly A., Seegers H. - Reduction in milk yield associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map) infection in French dairy cows. *Veterinary Research*, 2007, **38**(4), 625-634.

Coquin A. - Evolution du statut de vaches laitières initialement détectées non infectées par *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* dans des troupeaux infectés. *Thèse Vétérinaire*, Nantes, 2007-065.

Daly S., Caquineau L., Legall G., Mercier G., Roger G., Joly A., Sellal E. - The LSI para-JEM® Ampli Kit: An innovative tool for efficient prophylaxis of bovine paratuberculosis. *European Buiatric Forum*, Marseille, 2009.

Joly A., Roger G., Beaudeau F., Guatteo R., Fourichon C., Le Dréan E., Doré C. - Assessing the informative value of tools applied to different pooled fecal and milk samples to determine the status of dairy herds for MAP infection. *European Buiatric Forum*, Marseille, 2009.

