



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

pour le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*Mention : Biologie*

**Ecole doctorale Vie-Agro-Santé**

présentée par

**Pascale CREIGNOU-MERCIER**

préparée à l'unité de recherche ONIRIS/INRA 1300  
(Bio-Agression, Epidémiologie et Analyse de risque)

---

## **Bases épidémiologiques pour la maîtrise de la paratuberculose caprine**

**Thèse soutenue à Rennes le 27 octobre 2010**

devant le jury composé de :

**J-S PIERRE** Professeur , Université de Rennes1/ *président*

**Gilles FOUCRAS** Professeur, ENV de Toulouse/ *rapporteur*

**Marc GOVAERTS** Chef de travaux – CODA/CERVA – Bruxelles (Belgique)/ *rapporteur*

**Laurence GUILLOTEAU** Chargée de recherches, INRA-IASP Nouzilly/ *examineur*

**Xavier MALHER** Professeur, ONIRIS Nantes/ *directeur de thèse*

**BASES EPIDEMIOLOGIQUES**  
**POUR LA MAITRISE DE LA**  
**PARATUBERCULOSE CAPRINE**



## **Remerciements**

### **A notre Président de thèse**

Monsieur le Professeur Jean-Sébastien PIERRE,  
qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury.

### **A notre Directeur de thèse**

Monsieur le Professeur Xavier MALHER, pour ses précieux conseils et sa disponibilité

### **A nos juges**

Monsieur le Professeur Gilles FOUCRAS et Monsieur le Docteur Marc GOVAERTS, qui ont accepté de juger ce travail en qualité de rapporteurs.

Madame le Docteur Laurence GUILLOTEAU, qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury.

**Aux co-encadrants de la thèse** : pour leur implication dans nos travaux et leurs conseils

Monsieur le Professeur François BEAUDEAU, ONIRIS Nantes

Monsieur le Professeur Henri SEEGERS, ONIRIS Nantes

**Aux membres du comité de thèse** : pour l'intérêt porté à nos travaux et la pertinence de leurs conseils

Madame le Docteur Karine LAROUCAU, Anses – Laboratoire de santé animale de Maisons-Alfort

Monsieur le Professeur Jean-Pierre HUGOT, Hopital Robert Debré, Paris

Monsieur Rémi VERMESSE, GDS 35

Aux collègues de l'Anses à Niort et Maisons-Alfort, pour leur soutien constant. Un remerciement particulier à Marie-Pierre PELLET.

A l'Anses et à la Région Poitou-Charentes, pour le financement de ce travail.

Aux éleveurs et différents partenaires, qui ont rendu possibles ces travaux

A Pierre, Anne-Sophie, Guillaume et Héloïse, pour leur patience et leur confiance. Ils m'ont donné la force de conduire ce projet jusqu'au bout.

## Table des matières

<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>10</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>13</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>14</b>
<b>Chapitre 1. Introduction générale</b> .....	<b>15</b>
<b>Chapitre 2. Etude bibliographique</b> .....	<b>19</b>
A - La production caprine française .....	19
I - Effectifs et troupeaux .....	21
II - Systèmes de production .....	23
III - Structure des troupeaux .....	26
IV - Conclusion.....	27
B - La bactérie, Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis .....	28
I - Taxonomie et analyse phylogénique .....	28
II - Microbiologie et écologie microbienne.....	30
III - Pouvoir pathogène et immunogène.....	31
III - 1 - Facteurs de virulence .....	31
III-1-1- Attachement et internalisation.....	31
III-1-2- Persistance et multiplication dans les macrophages.....	32
III - 2 - Propriétés antigéniques .....	32
C - L'infection chez les caprins.....	32
I - Symptômes et lésions .....	34
I - 1 - Symptômes .....	34
I - 2 - Lésions .....	34
I-2-1- Lésions macroscopiques .....	34
I-2-2- Lésions microscopiques .....	37
II - Importance économique .....	38
III - Epidémiologie .....	39
III - 1 - Epidémiologie descriptive .....	39
III-1-1- Répartition géographique .....	39
III-1-2- Prévalence .....	39
III - 2 - Epidémiologie analytique .....	39
III-2-1- Voies d'excrétion et matières virulentes .....	40

III-2-2- Transmission .....	41
III-2-3- Facteurs de risque.....	41
III - 3 - Epidémiologie synthétique .....	42
<i>IV - Physiopathologie.....</i>	<i>44</i>
IV - 1 - Devenir de la bactérie dans l'organisme .....	44
IV-1-1- Porte d'entrée et extension locale .....	44
IV-1-2- Dissémination dans l'organisme .....	45
IV - 2 - Réponse immunitaire .....	45
IV-2-1- Immunité innée .....	45
IV-2-2- Immunité adaptative.....	45
<i>V - Diagnostic.....</i>	<i>47</i>
V - 1 - Méthodes de détection basées sur la mise en évidence des lésions.....	47
V-1-1- Mise en évidence des lésions macroscopiques.....	47
V-1-2- Mise en évidence des lésions microscopiques.....	48
V - 2 - Méthodes de détection basées sur la mise en évidence de l'agent.....	48
V-2-1- Bactérioscopie .....	48
V-2-2- Culture .....	49
V-2-3- PCR (Polymerase Chain Reaction) .....	51
V-2-4- Immunohistochimie.....	52
V - 3 - Méthodes de détection basées sur la mise en évidence des réactions immunitaires.....	53
V-3-1- Mise en évidence des réactions immunitaires à médiation cellulaire .....	53
V-3-2- Mise en évidence des réactions immunitaires à médiation humorale .....	55
V - 4 - Limites des tests de diagnostic.....	58
V - 5 - Utilisation des différents tests.....	59
<i>VI - Mesures de maîtrise de l'infection .....</i>	<i>61</i>
VI - 1 - Mesures médicales de maîtrise.....	61
VI-1-1- Différents vaccins .....	61
VI-1-2- Protocole vaccinal .....	63
VI-1-3- Conséquences de la vaccination.....	63
VI - 2 - Mesures sanitaires de maîtrise.....	65
VI-2-1- Diminution de la contamination du milieu .....	65
VI-2-2- Protection des jeunes.....	66

VI - 3 - Organisation collective de la lutte .....	67
D - Potentiel zoonotique.....	68
<i>I - Description de la maladie de Crohn.....</i>	<i>68</i>
<i>II - Relation avec Map.....</i>	<i>68</i>
<i>III - Exposition de l'Homme.....</i>	<i>69</i>
III - 1 - Sources de Map pour l'homme.....	69
III-1-1- Sources non alimentaires.....	69
III-1-2- Sources alimentaires.....	69
III - 2 - Influence des traitements .....	70
III-2-1- Traitements de l'eau .....	70
III-2-2- Traitements du lait.....	70
<i>IV - Conclusion.....</i>	<i>71</i>
<b>Chapitre 3. Etude expérimentale .....</b>	<b>73</b>
A - Distribution de la prévalence de l'infection par Map dans les troupeaux caprins .....	73
<i>I - Détermination de la qualité de deux tests de diagnostic de l'infection par Map chez les caprins par utilisation de techniques bayésiennes.....</i>	<i>74</i>
I - 1 - Matériel et méthodes .....	75
I-1-1- Tests de diagnostic .....	75
I-1-2- Animaux/population .....	75
I-1-3- Logiciels de calcul .....	75
I - 2 - Résultats .....	77
I-2-1- Méthode fréquentielle .....	77
I-2-2- Méthode bayésienne.....	78
I - 3 - Discussion .....	79
I-3-1- Vérification du paradigme de Hui et Walter.....	79
I-3-2- Choix des priors .....	79
I-3-3- Choix d'une approche .....	79
I - 4 - Conclusion de cette étude.....	80
<i>II - Estimation de la prévalence de l'infection par Map dans les troupeaux caprins français .....</i>	<i>80</i>
II - 1 - Matériel et méthodes.....	81
II-1-1- Sélection des troupeaux .....	81
II-1-2- Test ELISA .....	81

II-1-3- Analyse des données.....	82
II - 2 - Résultats .....	83
II-2-1- Prévalence troupeau.....	83
II-2-2- Prévalence individuelle.....	83
II-2-3- Prévalence intra-troupeau .....	83
II - 3 - Discussion .....	84
II - 4 - Conclusion .....	86
B - Description des performances des outils de diagnostic pour la détection des différents statuts.....	86
<i>I - Comparaison de la qualité des tests en fonction de l'âge des animaux.....</i>	<i>87</i>
I - 1 - Matériel et méthodes .....	87
I-1-1- Population et prélèvements .....	87
I-1-2- Analyses de laboratoire.....	87
I-1-3- Stratégie d'analyse .....	88
I - 2 - Résultats .....	89
I-2-1- Résultats aux tests selon le troupeau.....	89
I-2-2- Résultats aux tests selon l'âge.....	89
I-2-3- Sensibilité et spécificité des 6 tests dans chaque classe d'âge.....	92
I-2-4- Concordance entre les tests .....	92
I - 3 - Discussion .....	95
I - 4 - Conclusion.....	96
<i>II - Qualité des tests pour la détection de l'excrétion.....</i>	<i>97</i>
II - 1 - Matériel et méthodes.....	98
II-1-1- Animaux .....	98
II-1-2- Analyses.....	99
II-1-3- Définition des statuts .....	102
II-1-4- Traitement des données .....	103
II - 2 - Résultats .....	103
II-2-1- Résultats généraux .....	103
II-2-2- Détection des animaux excréteurs .....	104
II-2-3- Evolution des réponses aux tests dans le temps .....	105
II-2-4- Répétition des tests .....	107
II-2-5- Qualités des tests immunologiques pour la détection des excréteurs.....	108

II - 3 - Discussion .....	110
II - 4 - Conclusion .....	112
<b>Chapitre 4. Discussion générale .....</b>	<b>113</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>122</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>123</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>146</b>

## Liste des abréviations

ACERSA : Association pour la certification en santé animale

ADN : Acide DesoxiriboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

Afssa : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

AOP : Appellation d'Origine Protégée

BAAR : Bacille acido-alcalo-résistant

BTPL : Bureau Technique de Promotion Laitière

CAEV : Arthrite Encéphalite Caprine à Virus

CF : culture Fécale

CPA : cellules présentatrices d'antigènes

Ct : Threshold Cycle (seuil de positivité pour la PCR quantitative)

DO : Densité optique

ELISA : Enzyme linked ImmunoSorbent Assay

E/P : échantillon/positif

HEYM : milieu de Herrold au jaune d'oeuf

HPC : Chlorure d'hexacétylpyridinium

HTST : High Temperature Short Time (pasteurization)

IC : Intervalle de confiance

IDC : IntraDermotuberculation Comparative

IDG : Immuno-Diffusion en Gélose

IFN $\gamma$  : interféron gamma

Ig : Immunoglobulines

IL : InterLeukine

IS : séquence d'insertion

kDa : kiloDalton

LAM : Lipoarabinomannane

Maa : *Mycobacterium avium* subspecies *avium*

MAC : Complexe *Mycobacterium avium*-intracellulaire

MAMT : Mycobactéries autres que les Mycobactéries de la Tuberculose

Map : *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

MC : Maladie de Crohn

MICI : Maladie Inflammatoire Chronique Intestinale

MIF : Macrophages migration inhibitory factor

ML : Maximum Likelihood (Maximum de vraisemblance)

NF : norme française

OIE : Organisation mondiale de la santé animale

PA : prévalence apparente

PACA : région Provence-Alpes-Côte-d'Azur

PAT : prévalence apparente au niveau troupeau

PCR : Polymerase Chain Reaction

PFGE : gel d'électrophorèse par champ pulsé

PPD : Purified Protein Derivative (extrait protéique purifié)

PV : prévalence vraie

PVT : vraie prévalence au niveau troupeau

RIMC : Réaction Immunitaire à Médiation Cellulaire

RIMH : Réaction Immunitaire à Médiation Humorale

SC : sous-cutanée

Se : Sensibilité

Sp : Spécificité

TAGS : Test in Absence of a Gold-Standard

Th : Lymphocyte T helper

UE : Union Européenne

UFC : Unité formant colonie

ZN : coloration de Ziehl-Neelsen

$\sigma$  : écart-type

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Répartition des effectifs caprins selon la taille des troupeaux .....	21
Tableau 2 : Taille moyenne des troupeaux dans les principales régions caprines .....	21
Tableau 3 : Caractéristiques des différents types de producteurs .....	23
Tableau 4 : Principales régions caprines selon la destination du lait .....	23
Tableau 5 : Répartition des effectifs au contrôle laitier en fonction du rang de lactation.....	26
Tableau 6 : Données technico-économiques des 445 élevages suivis par le réseau des fermes de référence .....	26
Tableau 7 : Les antigènes majeurs de Map .....	33
Tableau 8 : Résultats semi-quantitatifs de la culture pour les caprins .....	50
Tableau 9 : Comparaison des résultats de la culture en fonction du type de milieu pour les bovins .....	51
Tableau 10 : Concentrations en immunoglobulines chez les bovins .....	57
Tableau 11 : Qualité du test ELISA chez les caprins .....	57
Tableau 12 : Caractéristiques des principales techniques de diagnostic de la paratuberculose	60
Tableau 13 : Description des principaux vaccins inactivés.....	62
Tableau 14 : Description des principaux vaccins vivants .....	62
Tableau 15 : Paramètres a et b des différentes lois béta (Be (a/b)) utilisées comme valeurs a priori dans les quatre modèles .....	77
Tableau 16 : Résultats croisés de la culture fécale et du test ELISA dans les deux sous-populations .....	77
Tableau 17 : Estimation des différents paramètres à partir du logiciel TAGS .....	77
Tableau 18 : Valeurs a posteriori des différents paramètres pour les quatre modèles utilisés avec le logiciel WinBUGS : médiane .....	78
Tableau 19 : Distribution des résultats .....	83
Tableau 20 : Fréquence et proportion de réponses positives pour chaque test de diagnostic de l'infection par Map dans les échantillons de 12 troupeaux caprins .....	90
Tableau 21 : Fréquence et proportion de réponses positives pour chaque test de diagnostic de l'infection par Map chez 412 chèvres selon leur classe d'âge .....	91
Tableau 22 : Sensibilités et spécificités de chaque test de diagnostic de l'infection par Map dans les différentes classes d'âge (IC 95%) chez 412 chèvres .....	93
Tableau 23 : Concordance entre les paires de tests pour le diagnostic de l'infection par Map selon la classe d'âge chez 412 chèvres : coefficient Kappa .....	94
Tableau 24 : Plan de la plaque de stimulation .....	100
Tableau 25 : Plan de la plaque pour le dosage de l'IFN gamma .....	101
Tableau 26 : Les différentes catégories d'excréteurs.....	102
Tableau 27 : Description du suivi .....	103
Tableau 28 : Résultats comparés de la PCR et de la culture fécale au cours du suivi .....	104
Tableau 29 : Nombre d'animaux positifs en PCR au cours du suivi .....	104
Tableau 30 : Caractérisation de l'excrétion .....	105
Tableau 31 : Nombre d'animaux positifs en IFN et en ELISA au cours du suivi.....	106

Tableau 32 : Distribution des profils de réponses aux différents contrôles pour chaque test	106
Tableau 33 : Résultats aux tests en fonction de la répartition des contrôles .....	108
Tableau 34 : Qualités des tests immunologiques pour la détection des excréteurs.....	109

## Liste des figures

Figure 1 : Répartition des effectifs de caprins dans l'UE en 2007 .....	20
Figure 2 : Répartition de la production laitière caprine dans l'UE en 2006 .....	20
Figure 3 : Les régions caprines .....	22
Figure 4 : Répartition de la collecte de lait en France en 2007 .....	25
Figure 5 : Arbre phylogénétique des mycobactéries à croissance lente basé sur la séquence de l'ARN16S .....	29
Figure 6 : Intestin d'une chèvre atteinte de paratuberculose comparé à un intestin sain.....	35
Figure 7 : Hypertrophie des noeuds lymphatiques mésentériques et cachexie chez une chèvre atteinte de paratuberculose clinique .....	36
Figure 8 : Foyers de calcification des noeuds lymphatiques mésentériques.....	36
Figure 9 : Hypertrophie et caséification d'un noeud lymphatique mésentérique .....	37
Figure 10 : Granulome au niveau de l'iléon .....	37
Figure 11 : Introduction et évolution possible de la paratuberculose dans un troupeau .....	43
Figure 12 : Coloration de Ziehl-Neelsen positive .....	48
Figure 13 : Test d'immuno-diffusion en gélose .....	55
Figure 14 : Distribution de la prévalence intra-troupeau apparente dans les troupeaux séro-positifs .....	84
Figure 15 : Evolution théorique des réactions immunitaires et de l'excrétion fécale au cours de l'infection par Map .....	114
Figure 16 : Evolution des réponses positives aux tests au cours du temps .....	116

## Chapitre 1. Introduction générale

La paratuberculose ou maladie de Johne est une entérite chronique des ruminants causée par *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map) (O.I.E., 2008). Map est une bactérie qui se multiplie lentement, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Elle a été observée pour la première fois par Johne et Frothingham en 1895. La paratuberculose a d'abord été décrite chez les bovins, chez lesquels elle se manifeste par un amaigrissement lent et progressif et une diarrhée. Puis elle a été décrite chez les ovins et les caprins. La diarrhée est rare chez les petits ruminants, en particulier chez les caprins. La paratuberculose affecte essentiellement les ruminants, domestiques et sauvages, mais elle a également été rapportée chez de nombreuses espèces animales. Chez les caprins, les signes cliniques liés à l'infection par Map apparaissent généralement sur des animaux de plus de 2 ans. L'infection des caprins est généralement associée à des souches d'origine bovine.

La paratuberculose figure sur la liste des maladies notifiables à l'Organisation mondiale de la santé animale (O.I.E.) comme maladie commune à plusieurs espèces, en raison de son caractère incurable et de son importance économique pour les troupeaux atteints. Celle-ci est liée à des effets directs associés à des baisses de performances (production laitière, amaigrissement, réforme précoce) et à de la mortalité, et des effets indirects, tels que la perte du potentiel génétique ou des entraves commerciales.

En France, la paratuberculose n'est pas une maladie réputée contagieuse, ni une maladie à déclaration obligatoire. En 2004, l'inscription de la paratuberculose sur la liste des maladies à déclaration obligatoire, a été jugée prématurée par le comité d'experts spécialisés de l'Afssa chargé de la santé animale, en raison de l'inefficacité des outils de dépistage et de contrôle. A l'époque, il avait été proposé de ré-examiner la question quand les outils auraient été améliorés.

La paratuberculose n'est pas, à ce jour, considérée comme une zoonose avérée, car les relations de causalité entre l'agent causal de la paratuberculose et la maladie de Crohn, bien qu'évoquées à de nombreuses reprises, n'ont pas pu être établies formellement. L'hypothèse actuelle est que Map pourrait être un des facteurs impliqués dans l'étiologie d'une partie des cas de cette maladie multifactorielle et pour laquelle il existe des prédispositions génétiques démontrées (Anonyme, 2009a).

La paratuberculose des ruminants est une maladie chronique, avec une longue période asymptomatique, qui fait suite à l'infection par Map. Ainsi, au niveau d'un troupeau, les animaux atteints par la maladie au sens strict (i.e. concomitance avec la présence de signes cliniques) peuvent être comparés à la partie émergée d'un iceberg. La partie immergée de l'iceberg, qui correspond aux animaux en phase asymptomatique, est liée à l'infection par Map et peut provoquer des pertes de production importantes (Nielsen, 2009). Dans un troupeau de bovins, schématiquement, pour chaque animal malade, on peut considérer qu'il y a environ 25 animaux infectés (Whitlock et Buergelt, 1996). Le terme de paratuberculose peut ainsi prêter à confusion et nous avons donc retenu l'expression « infection par Map », sachant que l'apparition des signes cliniques représente la phase terminale de l'infection.

L'infection est définie comme la présence de la bactérie dans les macrophages intestinaux (Nielsen et Toft, 2008). Le processus infectieux est long et met en jeu différents types de réactions immunitaires. Différentes phases peuvent donc être définies au cours de l'infection (Whitlock et Buergelt, 1996) :

- l'infection silencieuse : les animaux sont infectés, mais ne présentent pas réaction immunitaire humorale et sont asymptomatiques,
- l'infection sub-clinique : les animaux infectés sont asymptomatiques, mais produisent des réactions immunitaires et sont excréteurs,

- l'infection clinique : les animaux infectés sont malades et excréteurs.

La principale particularité de la paratuberculose est donc son caractère chronique (Nielsen, 2009). Dans un troupeau infecté par Map, les animaux peuvent présenter différentes formes pathologiques et immunologiques et se trouver en différents endroits du spectre de réponses. La compréhension de cet aspect est particulièrement importante car la réponse de l'animal aux différents tests de diagnostic est associée à sa position dans le spectre (Clarke et Little, 1996 ; Perez et al., 1997). La qualité des tests doit donc être estimée par rapport au statut que l'on veut mettre en évidence. Dans ces conditions, le temps est une composante importante des études sur l'infection par Map et les suivis longitudinaux semblent *a priori* plus appropriés pour étudier la qualité des tests, mais ils sont coûteux.

Au total, ces enjeux en termes de santé publique, de santé animale et d'impact économique pour les élevages, motivent la mise en place d'actions de maîtrise de l'infection par Map dans les troupeaux caprins. Ces actions de maîtrise peuvent avoir différents objectifs :

- diminuer la contamination du milieu par Map, pour diminuer l'exposition humaine et réduire la contamination des élevages : diminution de la quantité de bactéries excrétées et diminution du nombre d'animaux excréteurs,
- diminuer les pertes économiques en limitant les signes cliniques,
- diminuer le nombre de troupeaux infectés, voire éradiquer l'infection,
- protéger les troupeaux non infectés.

La conception et l'évaluation de l'efficacité des actions de maîtrise supposent de disposer au préalable d'outils performants de qualification des animaux et de détermination de la situation sanitaire des troupeaux vis-à-vis de l'infection et/ou de l'excrétion. Elles requièrent également la connaissance du cours naturel de l'infection afin de pouvoir évaluer les outils les plus adaptés aux différents stades de l'infection. Ainsi, la qualité des outils de diagnostic détermine la qualité des données épidémiologiques produites.

A ce jour, les connaissances épidémiologiques concernant la paratuberculose caprine sont limitées et largement extrapolées des connaissances obtenues chez les bovins. La prévalence de l'infection par Map dans les troupeaux caprins n'est pas connue précisément et est considérée comme supérieure à 20% en Europe (Nielsen et Toft, 2009). Pour les troupeaux caprins français, la prévalence de l'infection par Map est inconnue. Les données concernant les qualités des outils de diagnostic de l'infection par Map chez les caprins sont limitées : elles n'existent que pour la culture fécale et la détection des anticorps par ELISA (Nielsen et Toft, 2008).

Ainsi, compte-tenu des lacunes de connaissances et des besoins d'étude présentés ci-dessus, l'objectif de la thèse est de produire des connaissances épidémiologiques descriptives avec pour finalité la conception ultérieure de plans de maîtrise de l'infection des caprins par Map. Les résultats attendus sont de disposer de connaissances sur :

- [1]. La prévalence de l'infection par Map dans les troupeaux caprins français,
- [2]. Les performances des différents outils de diagnostic (directs et indirects, cellulaires et humoraux) et de leur capacité à détecter différentes catégories d'animaux dans les conditions naturelles d'infection.

Le manuscrit de thèse est articulé selon le plan suivant :

- 1. Introduction générale
- 2. Etude bibliographique : Etat des connaissances sur la production caprine et sur la paratuberculose caprine
- 3. Etude expérimentale :
  - Estimation de la prévalence de l'infection par Map dans les troupeaux caprins
  - Description des performances des outils de diagnostic pour la détection de différents statuts
- 4. Discussion générale et conclusion



## **Chapitre 2. Etude bibliographique**

Dans la partie introductive (Chapitre 1), les enjeux relatifs à la maîtrise de l'infection par Map chez les caprins ont été exposés. Il s'agit essentiellement d'enjeux en santé animale en raison des pertes économiques et de l'impact sur le bien-être animal. Les enjeux de santé publique existent également car, même si une relation de causalité entre Map et la maladie de Crohn n'est, à ce jour, pas établie, il est important de réduire le risque d'exposition de l'homme à cette bactérie.

L'objectif de cette étude bibliographique est d'exposer les connaissances et les contraintes relatives à la lutte contre la paratuberculose caprine. Ces paramètres sont liés à l'organisation des troupeaux caprins, à la bactérie, à l'évolution de l'infection et au potentiel zoonotique.

Le premier chapitre, consacré à la production caprine française, va permettre de situer l'originalité de cette production et de décrire les caractéristiques techniques des élevages qui peuvent influencer l'évolution de l'infection.

Le deuxième chapitre est consacré à la bactérie. Le troisième chapitre est destiné à dresser l'état des connaissances sur la paratuberculose caprine. Du fait d'un nombre limité de publications spécifiques aux caprins, en comparaison de celles relatives aux bovins, l'analyse de la littérature a été réalisée sur les données caprines, quand elles existent, mais également en partie sur des données ovines ou bovines. Ainsi, les données scientifiques relatives aux manifestations cliniques, à l'épidémiologie, à la physiopathologie, aux outils de diagnostic et aux méthodes de lutte vont être passées en revue.

Enfin, l'aspect zoonotique sera abordé à travers le rôle potentiel de Map dans la maladie de Crohn et les conditions d'exposition de l'homme à cette bactérie.

### **A - LA PRODUCTION CAPRINE FRANÇAISE**

Avec un effectif de 1,25 millions de caprins (G.E.B., 2008), la France se situe au troisième rang des pays de l'Union Européenne, derrière la Grèce et l'Espagne, en termes d'effectifs (Figure 1), mais elle occupe la première place en terme de production laitière (Figure 2). Ainsi, avec un cheptel qui représente 10 % des effectifs de femelles reproductrices, la production laitière française représente 28% de la production de l'Union Européenne. Par ailleurs, la France a réalisé 13 % des abattages de caprins dans l'Union Européenne à 25. Ceux-ci sont constitués par des chevreaux d'engraissement (4 300 t en 2007) ou des chèvres de réforme (2 800 t en 2007), qui peuvent être considérés comme des sous-produits de l'élevage laitier. La production caprine française est donc orientée principalement vers la production de lait destiné à être transformé en fromages.

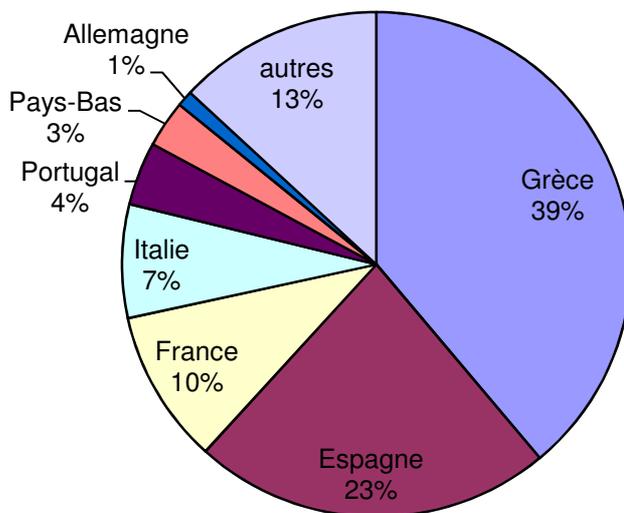


Figure 1 : Répartition des effectifs de caprins dans l'UE en 2007 (G.E.B., 2008)

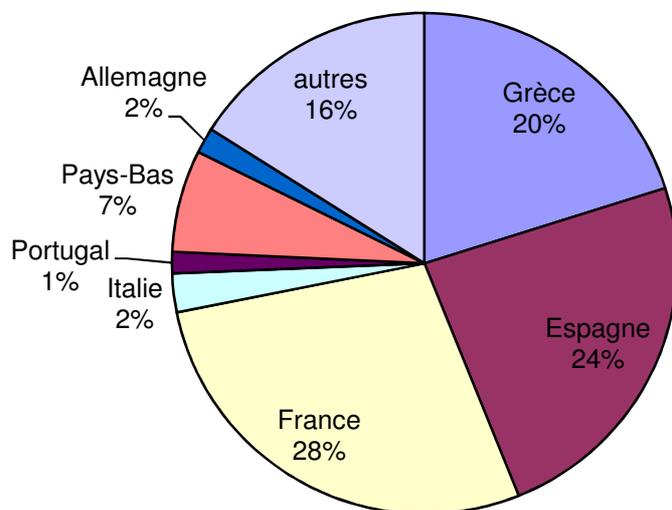


Figure 2 : Répartition de la production laitière caprine dans l'UE en 2006 (G.E.B., 2008)

## I - Effectifs et troupeaux

En France, on comptait fin 2007, 686 000 chèvres réparties dans 5 300 troupeaux détenant au moins 10 chèvres (Tableau 1) mais la moitié de cet effectif total appartient à des troupeaux de plus de 200 chèvres.

Tableau 1 : Répartition des effectifs caprins selon la taille des troupeaux (chiffres 2007) – source G.E.B., 2008) (exploitations caprines détenant au moins 10 chèvres)

Nombre de chèvres par exploitation	Part des exploitations	Part des effectifs caprins
10 à 49 chèvres	30 %	7 %
50 à 99 chèvres	22 %	12 %
100 à 199 chèvres	27 %	30 %
200 chèvres et plus	21 %	51 %

Cinq régions se partagent 90 % de ce cheptel (Agreste, 2009) : 37 % en Poitou-Charentes, de loin la première région caprine française, 15 % en Rhône-Alpes, 14% dans le Centre et dans les Pays de la Loire, et 10 % en Midi-Pyrénées. Neuf autres régions ont des effectifs caprins significatifs (plus de 5 000 chèvres) (Figure 3). Il s'agit de la Bretagne, de la Basse-Normandie, de la Bourgogne, de l'Aquitaine, du Limousin, de l'Auvergne, du Languedoc-Roussillon, de Provence-Alpes-Côte d'Azur (PACA) et de la Corse.

Tableau 2 : Taille moyenne des troupeaux dans les principales régions caprines – (G.E.B., 2008 – chiffres 2007)

Région	Taille moyenne (n)
Poitou-Charentes	200
Rhône-Alpes	72
Centre	117
Pays de la Loire	250
Midi-Pyrénées	169
France	130

La taille moyenne des troupeaux caprins est de 130 chèvres mais il existe une disparité selon les régions (Tableau 2) : en Pays de la Loire, Poitou-Charentes et Midi-Pyrénées les troupeaux ont des effectifs supérieurs à la moyenne, tandis que Centre et Rhône-Alpes ont des troupeaux de taille inférieure à la moyenne. Pour chaque région, la taille moyenne des troupeaux est influencée par le système de production dominant : troupeaux de grande taille pour les régions « laitières » (Poitou-Charentes et Pays de la Loire), troupeaux de taille limitée pour les régions « fromagères » (Rhône-Alpes) (cf paragraphe II).

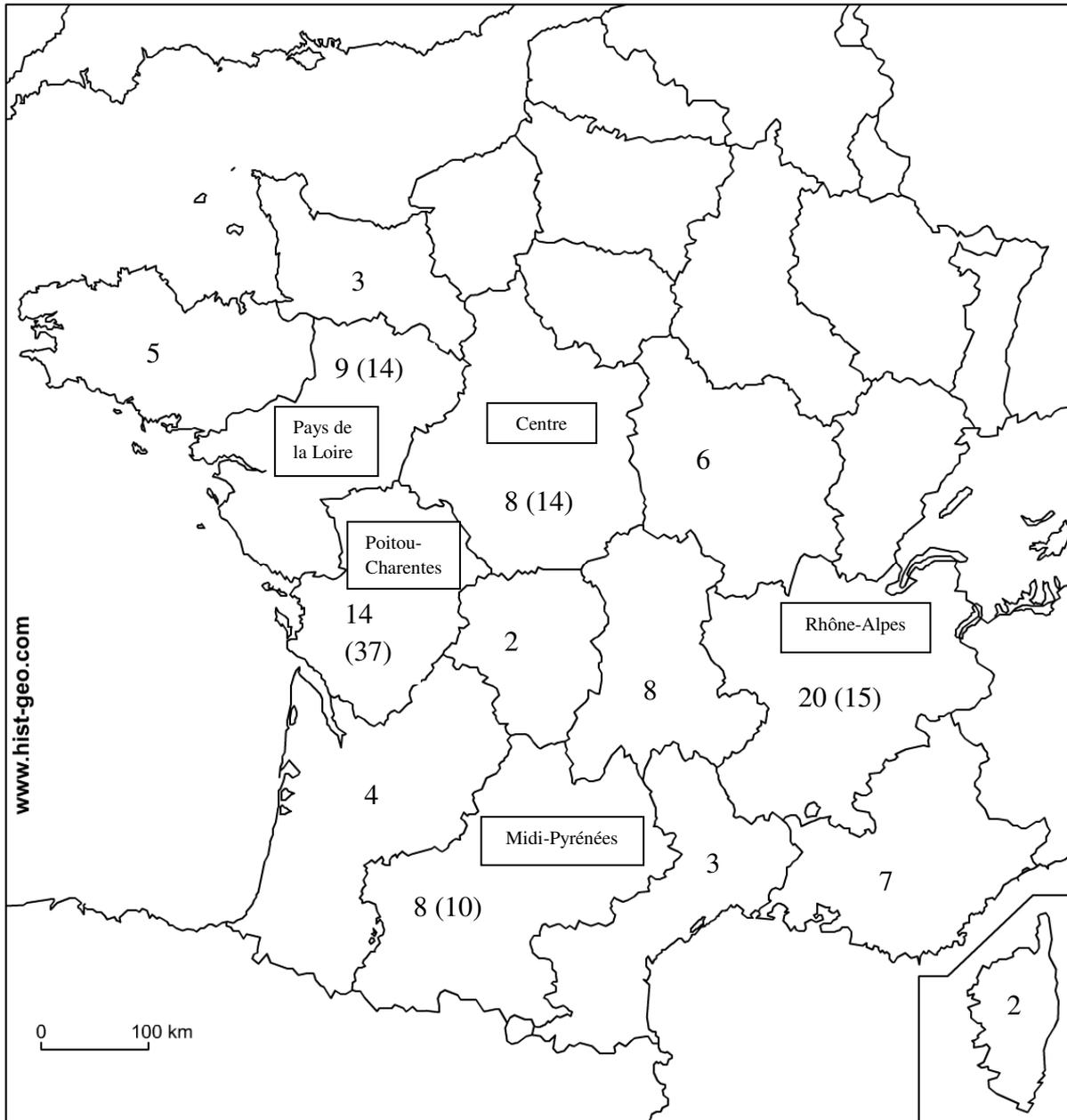


Figure 3 : Les régions caprines (% de troupeaux dans chaque région, () % de chèvres) - Source Agreste, 2009

: Les principales régions

## II - Systèmes de production

En France, le système allaitant, pourtant largement dominant au plan mondial, est très peu représenté. La quasi-totalité du cheptel femelle français est donc soumis à la traite, après une phase d'allaitement naturel, absente ou réduite (de quelques heures à quelques jours). En conséquence, la principale caractérisation du système d'élevage caprin en France repose sur le mode de valorisation du produit de la traite. On distingue ainsi :

- les livreurs (ou laitiers) qui livrent leur lait à l'industrie, coopérative ou privée,
- les fromagers (ou fermiers) qui transforment le lait en fromages à la ferme (processus complet ou complété chez des affineurs).

Au plan national, 50 % des producteurs sont des livreurs, 45 % des fromagers et 5 % des mixtes (Tableau 3).

Tableau 3 : Caractéristiques des différents types de producteurs (G.E.B., 2008 – données 2007)

	Livreurs	Fromagers	Mixtes
Répartition des exploitations (%)	50	45	5
Répartition des chèvres (%)	72	23	6
Répartition de la production (%)	77	17	6
Taille moyenne des troupeaux	186	66	160

L'essentiel de la production laitière caprine est assurée par les livreurs (72 % des chèvres et 77 % du lait) dont la taille moyenne de troupeau est supérieure à celle des fromagers. La taille plus réduite des troupeaux chez les fromagers peut en effet s'expliquer par le fait que leur charge de travail est non seulement consacrée à la production de lait, mais aussi à la transformation en fromage et à la vente.

Les 2 types de producteurs se répartissent différemment selon les régions (Tableau 4). En Poitou-Charentes et dans les Pays de la Loire, les éleveurs livrent de façon presque exclusive leur lait à l'industrie. De même, en Midi-Pyrénées et en Aquitaine, on observe une majorité de livreurs. En revanche, dans le Centre, en Rhône-Alpes et en Bourgogne, une forte proportion de producteurs transforme à la ferme.

Tableau 4 : Principales régions caprines selon la destination du lait (G.E.B., 2008 – données 2007)

Région	Lait produit (millions de l)	Lait livré (%)
Poitou-Charentes	219	98
Centre	71	60
Pays de la Loire	72	97
Rhône-Alpes	66	53
Midi-Pyrénées	46	78
Aquitaine	17	88
Bourgogne	16	27
Autres régions	60	54
<b>Total national</b>	<b>567</b>	<b>80</b>

La grande majorité des exploitations caprines peut être considérée comme spécialisée (produit brut de l'atelier caprin supérieur à 70% du produit brut de l'exploitation) (Barbin et al., 2008). Les exploitations caprines mixtes avec une ou plusieurs autres productions associées forment une grande diversité de systèmes qui pèsent relativement peu chacun en nombre de chèvres. Les plus représentés sont les élevages avec des bovins allaitants, puis les élevages avec des cultures et enfin des associations avec d'autres productions animales (vaches laitières ou ovins).

Chez les livreurs, les systèmes d'exploitation sont diversifiés, avec un tiers des élevages spécialisés, un tiers en association avec des grandes cultures (surtout en Poitou-Charentes), et un tiers avec d'autres herbivores (surtout en Pays de la Loire avec des bovins allaitants). En raison de la charge de travail (élevage et production de lait, transformation en fromage et vente), les fromagers sont généralement spécialisés.

En réalisant des regroupements régionaux, il est possible de définir 2 zones (Barbin et al., 2008) : une zone à dominante « fromagère » et une zone à dominante « livraison ».

Dans la zone avec une dominante de fromagers on trouve :

- le Centre : avec le nord de la Bourgogne et une partie de la région Centre (zone AOP),
- le Massif Central : avec l'Auvergne, le Limousin, le sud de la Bourgogne et le nord de Rhône-Alpes,
- le Sud : avec le sud de Rhône-Alpes, PACA, Languedoc-Roussillon, Corse.

Dans la zone avec une dominante de livreurs on trouve :

- l'Ouest : avec Pays de la Loire et Bretagne,
- le Centre-Ouest : avec Poitou-Charentes et une partie de la région Centre,
- le Sud-Ouest : avec Midi-Pyrénées et Aquitaine.

La région Poitou-Charentes est la première région française pour la production caprine aussi bien pour les effectifs (37 % des chèvres) que pour la production laitière (39 % du lait produit) ou la collecte (51 %, Figure 4).

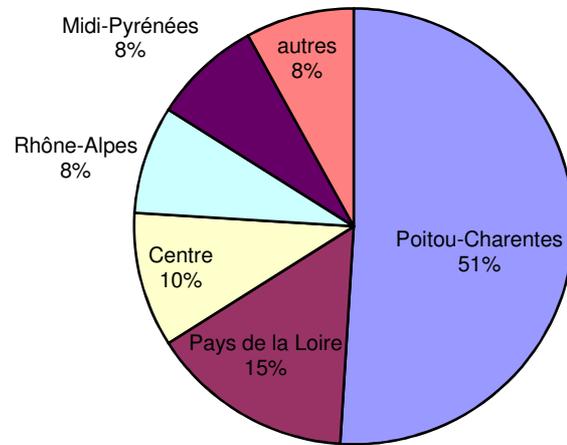


Figure 4 : Répartition de la collecte de lait en France en 2007 (G.E.B., 2008)

### III - Structure des troupeaux

La structure des troupeaux caprins français peut être estimée à partir des caractéristiques technico-économiques des élevages inscrits au contrôle de performances (contrôle laitier principalement) ou ceux bénéficiant d'un suivi technico-économique proposé par différentes structures (réseau des fermes de référence de l'Institut de l'élevage, BTPL).

Environ un tiers des troupeaux caprins français (1 912 troupeaux en 2007) sont inscrits au contrôle laitier. Le niveau de production des chèvres françaises est important : la production moyenne des chèvres contrôlées est de 791 kg de lait par chèvre et par lactation (Anonyme, 2008b). Les troupeaux caprins sont constitués principalement d'animaux jeunes puisque plus de 50 % des effectifs sont représentés par des chèvres en première ou deuxième lactation (moins de 3 ans (Tableau 5)).

Tableau 5 : Répartition des effectifs au contrôle laitier en fonction du rang de lactation – (Anonyme, 2008b)

Rang de lactation	Effectifs (%)
1	30,2
2	24,3
3	17,2
4	12,1
5	7,8
6	4,5
7	2,3
8 et plus	1,7

Le réseau des fermes de référence de l'Institut de l'élevage était constitué de 445 élevages caprins en 2006 (soit 8 % de la population) (Bossis et al., 2008), dont 321 élevages livreurs et 124 élevages fromagers répartis dans les principales régions caprines (Tableau 6).

Tableau 6 : Données technico-économiques des 445 élevages suivis par le réseau des fermes de référence (année 2006)

Critère	Livreurs (n= 321)	Fromagers (n = 124)
UMO* totales	2,1	2,1
UMO caprines	1,5	1,9
Chèvres (n)	231	69
Chevrettes (n)	83	18
Taux de renouvellement (%)	35	22
Parcours utilisé (ha)	28	66
Lait par chèvre (l)	795	587
Concentrés (kg/chèvre)	441	280
Déshydratés (kg/chèvre)	195	75

\*U.M.O. : Unité de Main d'Oeuvre

Ce réseau de référence permet de montrer que les livreurs se caractérisent par un système intensif avec des troupeaux plus grands, un taux de renouvellement plus important, une

utilisation importante des aliments concentrés et déshydratés et un niveau de production par chèvre supérieur. En revanche, chez les fromagers, le système est moins intensif : les troupeaux sont plus petits, le taux de renouvellement est moindre, le pâturage est plus important et le niveau de production par chèvre est plus faible.

Dans les systèmes laitiers intensifs de l'ouest de la France, Malher et al. (1999), ont observé des taux de réforme et de renouvellement moyens de 24,3% et 35,4 % respectivement. L'âge moyen des animaux dans ces troupeaux était de 2,7 ans, ce qui traduit des pyramides des âges avec une base large (nombreux animaux jeunes). Les principales causes de réforme relevées dans cette enquête étaient un trouble de santé (dont la cachexie) dans 10,3 % des cas et une production insuffisante dans 10,0% des cas. Le taux de renouvellement est élevé et traduit une pression de sélection importante.

Ainsi, à la séparation géographique des 2 types de producteurs, on peut superposer 2 systèmes de production :

- un système très intensif (livreurs de l'ouest de la France), avec des troupeaux de grande taille, ayant recours à des fourrages conservés (ensilage ou foin) et aux aliments concentrés, et des animaux élevés en stabulation permanente,
- un système moins intensif (celui des fromagers), avec des troupeaux plus petits et avec un recours au pâturage. Cependant en Corse, des animaux plus rustiques sont élevés dans des troupeaux de grande taille.

On peut également distinguer des troupeaux en phase de croissance, qui peuvent acheter des animaux pour assurer l'augmentation du cheptel et chez lesquels les réformes sont limitées, et des troupeaux en phase d'équilibre, pour lesquels les réformes peuvent être raisonnées en fonction de la situation sanitaire du troupeau.

Par ailleurs, dans les troupeaux caprins français, on observe des pratiques d'élevage qui sont défavorables à l'obtention d'un état sanitaire maîtrisé :

- des troupeaux de grande taille (>200 animaux) élevés en stabulation permanente, ce qui favorise la contamination du milieu et la transmission des germes,
- une conduite des animaux en lots constitués le plus souvent en fonction des dates de mises-bas et une absence quasi généralisée de local de mise-bas,
- un regroupement des animaux de renouvellement, associé à la distribution de colostrum de mélange,
- la pratique du pâturage dans certains élevages, toujours liée à une infestation parasitaire par des strongles,
- une cohabitation de plusieurs espèces : surtout avec des bovins allaitants avec des pâturages communs (Bourgogne) ou distribution des refus des chèvres aux bovins,
- l'achat d'animaux, en particulier de boucs, qui peuvent être à l'origine de l'introduction de maladies. Pour les autres catégories d'animaux (chevrettes, femelles), les achats sont limités, sauf lors d'agrandissement de troupeau ou de reconstitution de troupeau, suite à un événement sanitaire majeur.

#### **IV - Conclusion**

Ainsi, les troupeaux caprins français sont des troupeaux spécialisés pour la production laitière. Les systèmes de production sont diversifiés mais les niveaux de production sont dans l'ensemble élevés, grâce à l'amélioration génétique et à une alimentation qui favorise l'expression du potentiel génétique.

La spécialisation laitière des troupeaux caprins français a des conséquences sur les pratiques d'élevage :

- faible valeur des animaux de réforme, ce qui ne favorise pas leur élimination tant que la production laitière persiste,
- séparation précoce des jeunes, dans les heures ou les jours qui suivent la naissance, avec recours à l'allaitement artificiel après une phase colostrale plus ou moins longue.

## **B - LA BACTÉRIE, MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSPECIES PARATUBERCULOSIS**

Il s'agit ici de présenter les principales caractéristiques de la bactérie, qui permettent de comprendre l'évolution de l'infection et le choix des outils de diagnostic.

*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* a été isolée pour la première fois en 1895 par Johne et Frothingham sur un bovin. Ses dénominations antérieures ont été *Mycobacterium johnei* puis *Mycobacterium paratuberculosis*. La souche type est la souche ATCC 19698 (Thorel et al., 1990).

### **I - Taxonomie et analyse phylogénique**

*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map) appartient à l'ordre des Actinomycetales, au sous-ordre des Corynebacterineae et à la famille des Mycobacteriaceae. Cette famille ne contient que le genre Mycobacterium. Les Mycobactéries comprennent 149 espèces (Euzéby, 2009) et sont largement répandues dans l'environnement. Si beaucoup d'entre elles sont saprophytes, certaines sont pathogènes pour l'homme et les animaux.

Pour des raisons pratiques, les mycobactéries sont réparties en 3 groupes (Euzéby, 2009) :

- *Mycobacterium leprae*, responsable de la lèpre
- les mycobactéries du complexe *M. tuberculosis*, responsables de la tuberculose : *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii* et *M. tuberculosis*,
- les mycobactéries autres que les mycobactéries de la tuberculose (MAMT), qualifiées autrefois de mycobactéries atypiques.

Dans la classification de Runyon, les MAMT sont distinguées en 4 groupes, selon leurs caractéristiques de croissance (vitesse et couleur des colonies) :

- le groupe I rassemble les mycobactéries photochromogènes à croissance lente : présence de caroténoïdes seulement lors d'exposition à la lumière,
- le groupe II rassemble les mycobactéries scotochromogènes à croissance lente : présence de caroténoïdes.
- le groupe III rassemble les mycobactéries non chromogènes à croissance lente, dont fait partie Map,
- le groupe IV rassemble les mycobactéries pigmentées ou non, à croissance rapide, représentées par des souches non pathogènes de l'environnement, comme par exemple *M. phlei*.

Pour les souches à croissance lente, l'analyse de la séquence de l'ARNr 16S permet de mettre en évidence les relations phylogénétiques entre les différentes espèces (Springer et al., 1996) (Figure 5).

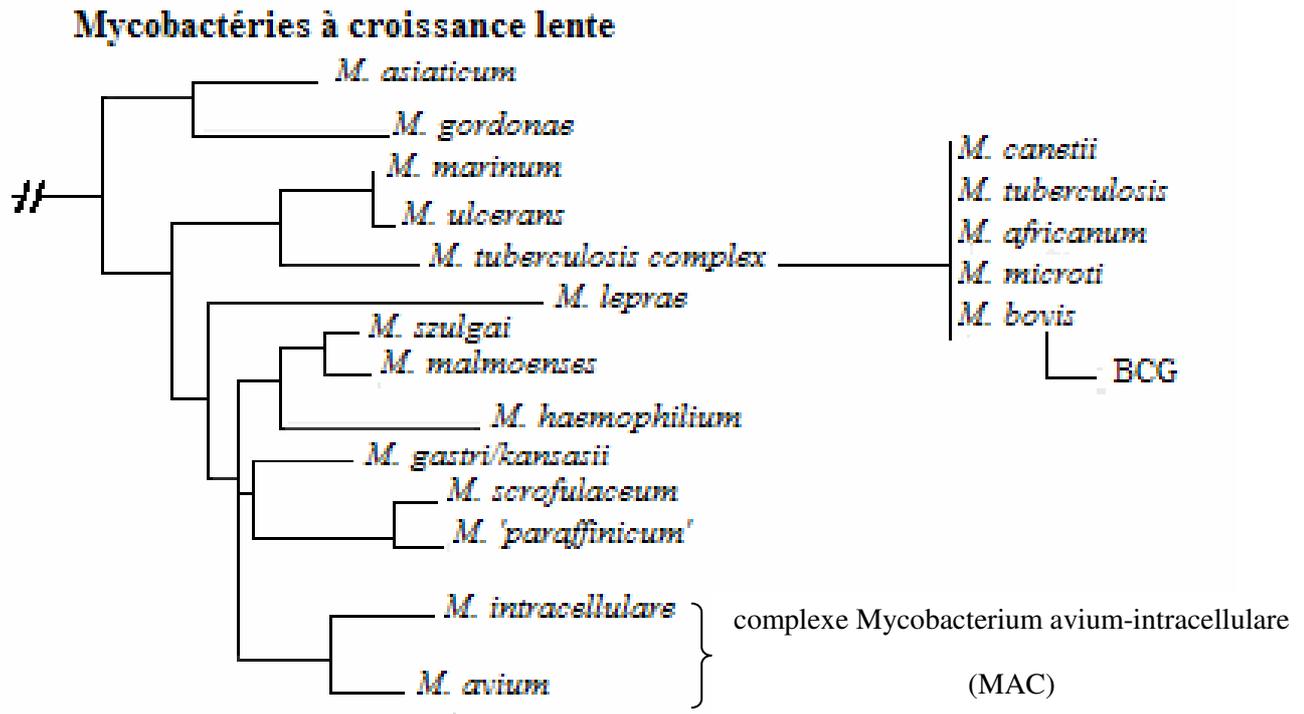


Figure 5 : Arbre phylogénétique des mycobactéries à croissance lente basé sur la séquence de l'ARN16S (d'après Brosch et al., 2001)

Map appartient au complexe Mycobacterium avium-intracellulare (MAC) (Biet et al., 2005). Au sein de l'espèce *Mycobacterium avium*, les études d'hybridation ADN-ADN ont pu mettre en évidence 4 sous-espèces :

- *M. avium* sous-espèce *avium* (Maa),
- *M. avium* sous-espèce *paratuberculosis* (Map),
- *M. avium* sous-espèce *silvaticum* (Mas),
- *M. avium* sous-espèce *hominissuis*.

Les quatre sous-espèces possèdent de très nombreux antigènes en commun et peuvent néanmoins être spécifiquement distinguées par des méthodes moléculaires et certains caractères phénotypiques.

Map présente une très forte homologie avec *M. avium avium* (98 à 100 % selon les régions du génome étudiées) mais se différencie des autres sous-espèces du point de vue génotypique, par la présence, dans son génotype, de 15 à 20 copies de la séquence d'insertion IS900 (Green et al., 1989). Cependant, la séquence IS900 a également été identifiée chez *Mycobacterium cookii* (Cousins et al., 1995 ; Lilenbaum et al., 2007).

Pour Map, des techniques de typage moléculaire (restriction, hybridation) ont permis de mettre en évidence 3 groupes de souches (De Juan et al., 2006) :

- les souches du groupe C (cattle ou type II) : fréquentes chez les bovins ainsi que chez les caprins, en particulier en Nouvelle-Zélande et en Norvège (Collins et al., 1990a), en Espagne (De Juan et al., 2005), Argentine, Allemagne, au Danemark, en Italie, au Royaume Uni, en Australie et aux Etats Unis (Sevilla et al., 2007). Ces souches ont également été isolées chez des ovins au Canada (Collins et al., 1990a), aux Etats Unis, en République

Tchèque, en France, en Grèce, en Australie, au Royaume Uni (Sevilla et al., 2007) et en Espagne (Sevilla et al., 2005).

- les souches du groupe S (sheep ou type I) : isolées généralement sur les ovins et parfois sur des caprins en Nouvelle-Zélande (Collins et al., 1990a) et en Espagne (Sevilla et al., 2005). Des souches de ce groupe ont également été isolées sur des bovins en Australie et en Islande (Whittington et al., 2001).

- les souches du groupe I (intermédiaire ou type III) : présentes chez des moutons d'Islande, du Canada (Sevilla et al., 2005) et d'Afrique du Sud (Pavlik et al., 1995) ainsi que sur des caprins en Espagne (De Juan et al., 2005 ; De Juan et al., 2006 ; Sevilla et al., 2007).

Chez les caprins, les souches de Map appartiennent généralement au groupe C, mais en de rares occasions, des souches du groupe S ou I peuvent être isolées, en particulier dans les pays où la situation épidémiologique (élevages mixtes, pâturages communs) rend possibles les échanges entre ovins et caprins, comme par exemple en Espagne (De Juan et al., 2005) ou en Grèce (Florou et al., 2008). Les analyses par PFGE permettent de mettre en évidence une grande variabilité génétique des souches d'origine caprine (De Juan et al., 2005).

Le séquençage du génome de Map (souche K-10) a été achevé en 2004. Il comprend un chromosome unique et circulaire de plus de  $4,8.10^6$  paires de bases et codant 4 350 gènes (Pribylova et al., 2009). Le génome de Map présente des particularités par rapport à celui des autres Mycobactéries. Il possède un grand nombre de gènes de régulation et beaucoup de gènes liés au métabolisme lipidique. La fonctionnalité d'environ un tiers des gènes doit encore être définie.

## **II - Microbiologie et écologie microbienne**

Comme toutes les mycobactéries, Map est une bactérie aérobie gram-positive non sporulée caractérisée par une croissance lente et une résistance à la coloration à la fuchsine acide. C'est donc un Bacille Acido-Alcool-Résistant (BAAR). Cette acido-alcool-résistance lui est conférée par une paroi cellulaire épaisse et riche en lipides, en particulier des acides mycoliques. Ces composés confèrent également à la bactérie une résistance à des agents chimiques, qui est mise à profit pour l'isolement (méthodes de décontamination des prélèvements avant mise en culture).

Map est un bacille de  $0,5 \times 1,5 \mu\text{m}$ . D'un point de vue phénotypique, Map se différencie des autres sous-espèces par sa dépendance à la mycobactine, molécule nécessaire au transport du fer. Mais ce critère n'est pas pathognomonique car *M. avium silvaticum* et certaines souches de *M. avium avium* présentent également cette dépendance (Lilenbaum et al., 2007). L'incapacité de Map à produire la mycobactine la rend incapable de se multiplier dans le milieu extérieur, et en fait donc un pathogène obligatoire des animaux, chez lesquels elle se trouve en position intra-cellulaire (Klein, 2006).

Map est une mycobactérie cultivable qui croît lentement, avec un temps de doublement de plus de 22 heures (Klein, 2006). Dans le domaine vétérinaire, la culture est réalisée le plus souvent sur le milieu de Herrold à l'œuf (HEYM) supplémenté en mycobactine. Map forme des colonies petites (de la taille d'un grain de poussière jusqu'à 5 mm), plutôt rugueuses et blanchâtres. La culture s'effectue pendant plusieurs mois (6 voire plus). Les caractères cultureux sont variables selon les groupes de souches :

- les souches du groupe C sont faciles à isoler à partir de culture de fèces ou de tissus, après 8 à 12 semaines d'incubation (Bauerfeind et al., 1996). Les colonies obtenues sont non pigmentées, d'aspect rugueux et non uniforme (Dohmann et al., 2003).
- les souches du groupe S sont très lentes à cultiver et nécessitent des milieux particuliers (Collins et al., 1990a ; Bauerfeind et al., 1996). Les colonies obtenues sont pigmentées, lisses et uniformes (Dohmann et al., 2003).
- les souches du groupe I poussent également très lentement (De Juan et al., 2005).

Map est une bactérie très résistante aussi bien aux agents physiques (froid, chaleur, rayonnements) qu'aux agents chimiques (désinfectants, antibiotiques) (Manning et Collins, 2001). Par conséquent Map peut survivre dans l'environnement (sol, eau) pendant de longues périodes. Dans l'eau, la survie de Map a été estimée à 6-18 mois dans l'eau courante (Pickup et al., 2005) ou encore l'eau de mare (Lovell et al., 1944 ; Larsen et al., 1956), et jusqu'à 15 mois dans l'eau distillée (Collins et al., 2001). De même, les pâturages doivent être considérés comme une source d'infection pendant au moins 1 an (Manning et Collins, 2001).

Cependant, il est important de noter que la plupart des données disponibles, quant à la survie et à la résistance de Map, ont été publiées il y a plus de 30 ans. Par ailleurs, bien que les méthodes de détection et de dénombrement aient évolué depuis, aucune étude plus récente sur l'écologie de Map n'est disponible. De plus, les données n'existent parfois que pour d'autres mycobactéries, comme par exemple *M. avium avium*, qui, clairement, diffère en termes de vitesse de croissance, de répllication possible ou non en dehors d'une cellule hôte, ce qui pourrait avoir un effet direct sur la susceptibilité à certains facteurs environnementaux (Collins et al., 2001).

Map ne se multiplie pas dans le milieu extérieur mais elle y survit grâce à ses capacités de résistance.

### **III - Pouvoir pathogène et immunogène**

La plupart des données concernant le pouvoir pathogène de Map ont été obtenues *in vitro*.

#### **III - 1 - Facteurs de virulence**

Peu de facteurs de virulence ont été décrits pour Map (Chacon et al., 2004).

##### **III-1-1- Attachement et internalisation**

Il semblerait que l'attachement et l'internalisation de Map dans la muqueuse intestinale soient réalisés par une protéine de liaison à la fibronectine (Chacon et al., 2004). Une protéine d'environ 32 kDa ayant près de 90% d'homologie avec son homologue de Maa a été identifiée *in vitro* chez des souches de Map et dénommée FAP-P (Secott et al., 2001).

De plus, une protéine de 35 kDa (MMP) réagissant avec des antisérums issus de bovins paratuberculeux joue, elle aussi, un rôle dans l'invasion de cellules épithéliales bovines et est surexprimée dans des conditions d'hypoxie simulant le milieu intestinal (Bannantine et al., 2003).

### III-1-2- Persistance et multiplication dans les macrophages

Map possède des mécanismes lui permettant d'échapper à l'activité bactéricide des macrophages activés :

- sa paroi riche en lipides, très hydrophobe, lui confère une grande imperméabilité,
- sa paroi contient des molécules protectrices vis-à-vis de l'action oxydante de certaines substances, telles que les sulfatides (Stabel, 2007),
- l'inhibition de la fusion phagosome-lysosome et de l'acidification du phagosome a été démontrée (Anonyme, 2009a).

### III - 2 - Propriétés antigéniques

Même si on ne connaît pas le rôle exact des différentes protéines et antigènes dans le développement de la maladie et de la réponse immunitaire, on sait que celle-ci fait intervenir des réactions immunitaires cellulaires et humorales. L'étude des antigènes est rendue difficile par la lenteur de la croissance et par l'existence de composants communs aux Mycobactéries (Lilenbaum et al., 2007). Map possède au moins 44 composants antigéniques, dont la plupart sont communs avec les autres sous-espèces de *M. avium* ou avec *M. bovis* (Gunnarsson et Fodstad, 1979) (

Tableau 7).

Néanmoins, la recherche d'antigènes spécifiques de Map, pour le diagnostic ou la vaccination, a permis la découverte de plusieurs protéines immunogènes (Harris et Barletta, 2001 ; Leroy et al., 2007 ; Roupie et al., 2008 ; Leroy et al., 2009). Des antigènes glycolipidiques ou glycopeptidolipidiques (tels le lipoarabinomannane) ont également été identifiés (Klein, 2006).

Les antigènes MAP2609, MAP2492c, MAP0210c (Willemsen et al., 2006) pourraient être des candidats pour la détection de la réponse immunitaire précoce.

## **C - L'INFECTION CHEZ LES CAPRINS**

L'infection débute avec la colonisation de la muqueuse intestinale par Map (Whittington et Sergeant, 2001) et évolue avec une phase subclinique, pouvant durer plusieurs années, et une phase clinique, qui représente la phase terminale de l'infection. La période d'incubation est longue et inversement proportionnelle à la dose ingérée (Whittington et Sergeant, 2001).

Selon Nielsen et Toft (2008), plusieurs états peuvent être définis :

- Animaux atteints par Map : animaux avec des manifestations cliniques dues à la paratuberculose.
- Animaux infectieux pour Map : animaux excréteurs et susceptibles de transmettre la bactérie. Dans cette catégorie, on pourrait aussi inclure des animaux non-infectés mais qui excrètent Map dans les fèces suite à un transfert passif de la bactérie dans le tube digestif ; le statut « infectieux » de ces animaux doit être considéré comme transitoire. L'excrétion peut avoir lieu par les fèces (cas le plus fréquent), mais aussi par le lait ou le colostrum ou par l'utérus.
- Animaux infectés par Map : animaux pour lesquels Map est en position intracellulaire mais sans multiplication. Il s'agit d'une infection latente qui induit des réactions immunitaires et qui est considérée comme persistante.
- Animaux « sains » : animaux qui ne sont ni atteints, ni infectieux, ni infectés.

La première catégorie, la seule identifiable sans recours au diagnostic de laboratoire, ne représente qu'un faible nombre d'animaux. Ainsi cette répartition des animaux d'un élevage infecté est souvent comparée à l'image de l'iceberg, la partie émergée correspondant aux animaux atteints.

Tableau 7 : Les antigènes majeurs de Map (Harris et Barletta, 2001 ; Chacon et al., 2004 ; Gumber et al., 2009 ; Biet et al., 2008)

Nature de l'antigène	Nom	Caractéristiques	Taille (en kDa)
Glycopeptido-lipidique	Lipoarabinomannane (LAM)	Molécule appartenant à la capsule de l'enveloppe	-
Lipo-peptide	L5P	Lipopentapeptide	
Protéique	GroES	Protéine de choc thermique	10
Protéique	AphD	Alkyl hydroperoxyde réductase D	19
Protéique	32-kDa antigen	Protéine de liaison à la fibronectine, Protéine sécrétée	32
Protéique	34-kDa antigen	Antigène de la paroi cellulaire, épitope des cellules B	34
Protéique	34-kDa antigen	Sérine protéase	34
Protéique	34,5-kDa antigen	Protéine cytoplasmique, spécifique de Map	34,5
Protéique	35-kDa antigen	Protéine membranaire majeure	35
Protéique	42-kDa antigen	Protéine cytoplasmique, spécifique de Map	42
Protéique	44,3-kDa antigen	Protéine soluble	44,3
Protéique	AphC	Alkyl hydroperoxyde réductase C	45
Protéique	GroEL, 65 kDa Ag	Protéine de choc thermique	65
Protéique	Complexe 85 (85A, 85B et 85C)		
Protéique	SodA	Super-oxyde dismutase manganèse-dépendante	
Protéique	22 kDa	Protéine exportée	22
Protéique	Hsp70	Protéine de choc thermique	70
Protéique	MAP2609,	Antigènes sécrétés	9
	MAP2492c,		15
	MAP0210c		34
Protéique	Ag D	Bacterioferritine	17
Protéique	HspX	Protéine de choc thermique	16

Radostits et al. (2000) définissent une cinquième catégorie ; il s'agit d'animaux « résistants » (ou guéris ou exposés). Après l'infection, ces animaux développent une résistance, contrôlent l'infection, ne produisent pas d'anticorps et ne sont pas excréteurs de Map. Cet état « résistant » peut correspondre à plusieurs évolutions (animal réfractaire à l'infection, porteur latent, animal blanchi) mais il est impossible de les distinguer.

La paratuberculose a été décrite pour la première fois chez la chèvre en 1916 par McFadyean et Sheather en Angleterre. En France, la première description chez les caprins a été faite par Cottureau et Poulénard en 1964 (cité par Thorel et Valette, 1979).

## **I - Symptômes et lésions**

La paratuberculose est une maladie cachectisante chronique liée à la présence de lésions inflammatoires situées sur l'intestin. Ces lésions sont provoquées par la multiplication de Map dans la muqueuse intestinale.

### **I - 1 - Symptômes**

Chez les bovins, il y a une relation entre d'une part la dose de Map ingérée, et d'autre part, le délai d'apparition et la sévérité des manifestations cliniques (Sweeney et al., 1992b).

Les manifestations cliniques apparaissent généralement sur des caprins de plus de 2 ans (Thomas, 1983 ; Sigurdardottir et al., 1999 ; Vialard, 2000 ; Lybeck et al., 2009). Des cas cliniques ont été observés sur des caprins âgés de 2 à 8 ans (Thomas, 1983). Dans les environnements fortement contaminés par Map, les signes cliniques sont plus fréquents et apparaissent plus tôt (Whittington et Sergeant, 2001).

Les premières manifestations cliniques de l'infection par Map se traduisent par une baisse de la production laitière (Fodstad et Gunnarsson, 1979 ; Thomas, 1983 ; Molina et al., 1991) qui peut parfois passer inaperçue. Le principal signe clinique est un amaigrissement progressif et irréversible, sans fièvre et avec un appétit conservé (Thomas, 1983 ; Catton, 2002 ; Manning et al., 2003). Des pertes de poids comprises entre 4 et 30 kg ont été observées chez les caprins (Straube et Mcgregor, 1982 ; Gezon et al., 1988). Contrairement aux bovins, seuls 10 à 20 % des caprins présentent de la diarrhée (Stehman, 1996). Les matières fécales des caprins sont plus sèches que celles des bovins, et la modification de la consistance des matières fécales apparaît dans cette espèce suite à des lésions intestinales importantes (Catton, 2002).

Le poil est terne et cassant (Catton, 2002 ; Manning et al., 2003 ; Kruse et al., 2006). Des oedèmes (en particulier sous maxillaires) sont signalés dans les cas avancés (Vialard, 2000). De l'anémie a été décrite dans certains cas (Thomas, 1983 ; Vialard, 2000). Les cas avancés peuvent présenter de l'apathie et de l'anorexie (Thomas, 1983 ; Gezon et al., 1988).

L'évolution se traduit par la mort de l'animal au bout de quelques semaines dans un état de marasme physiologique.

Certains éleveurs habitués aux manifestations cliniques de la paratuberculose, procèdent à la réforme de leurs animaux dès qu'une baisse de production associée à un amaigrissement est observée (Anonyme, 2000 ; Vialard, 2000 ; Whittington et Sergeant, 2001). Ainsi, dans certains troupeaux caprins intensifs, la paratuberculose peut se traduire par des taux de réforme importants sur des animaux de 2-3 ans (Malher et al., 1999).

### **I - 2 - Lésions**

Les principales lésions observées sont des lésions d'entérite chronique. Les premières lésions précèdent l'apparition des signes cliniques, puis elles se développent pendant la phase clinique.

#### **I-2-1- Lésions macroscopiques**

Les lésions générales sont celles que l'on retrouve dans les maladies cachectisantes : cachexie (Thomas, 1983), disparition du tissu adipeux sous-cutané et des divers dépôts internes, émaciation musculaire (Manning et al., 2003), décoloration des muqueuses, œdème sous-

maxillaire, œdème du mésentère et des sillons coronaires. A l'ouverture des grandes cavités et du sac péricardique s'écoule un transsudat séreux jaune citrin, translucide, coagulant fréquemment au contact de l'air (Vialard, 2000).

L'essentiel des lésions se situe au niveau intestinal. On note un épaissement de la paroi de l'intestin grêle, principalement au niveau de l'iléon, de la valvule iléo-caecale et du jéjunum (Catton, 2002 ; Valheim et al., 2002a)(Figure 6). Les lésions sont situées préférentiellement au niveau des formations lymphoïdes de l'intestin (Valheim et al., 2002a). Fodstad et Gunnarsson (1979) ont observé des lésions macroscopiques de l'intestin sur 47 % des chèvres infectées. Dans les cas avancés, les lésions peuvent s'étendre à d'autres portions de l'intestin (duodénum, caecum, colon) (Lenghaus et al., 1977 ; Gezon et al., 1988 ; Molina et al., 1991). Les lésions d'entérite induisent une réduction de l'absorption intestinale des nutriments, ce qui se traduit par un amaigrissement des animaux, malgré des apports alimentaires satisfaisants (Clarke, 1997 ; Manning et Collins, 2001).

On note également une augmentation de la taille des nœuds lymphatiques iléo-cæcal et mésentériques avec œdème (Catton, 2002) (Figure 7). On constate parfois des lésions de calcification et de caséification au niveau de ces nœuds lymphatiques (Figure 8 et Figure 9) (Lenghaus et al., 1977 ; Fodstad et Gunnarsson, 1979 ; Straube et McGregor, 1982 ; Thomas, 1983 ; Gezon et al., 1988 ; Valheim et al., 2002a ; Manning et al., 2003 ; Kruze et al., 2006) ; celles-ci sont considérées comme assez évocatrices de l'infection par Map chez les caprins (Fodstad et Gunnarsson, 1979).



Figure 6 : Intestin d'une chèvre atteinte de paratuberculose (en haut) comparé à un intestin sain (Collins et Manning, 2010)



Figure 7 : Hypertrophie des noeuds lymphatiques mésentériques et cachexie chez une chèvre atteinte de paratuberculose clinique (Bouzigues, 2006).

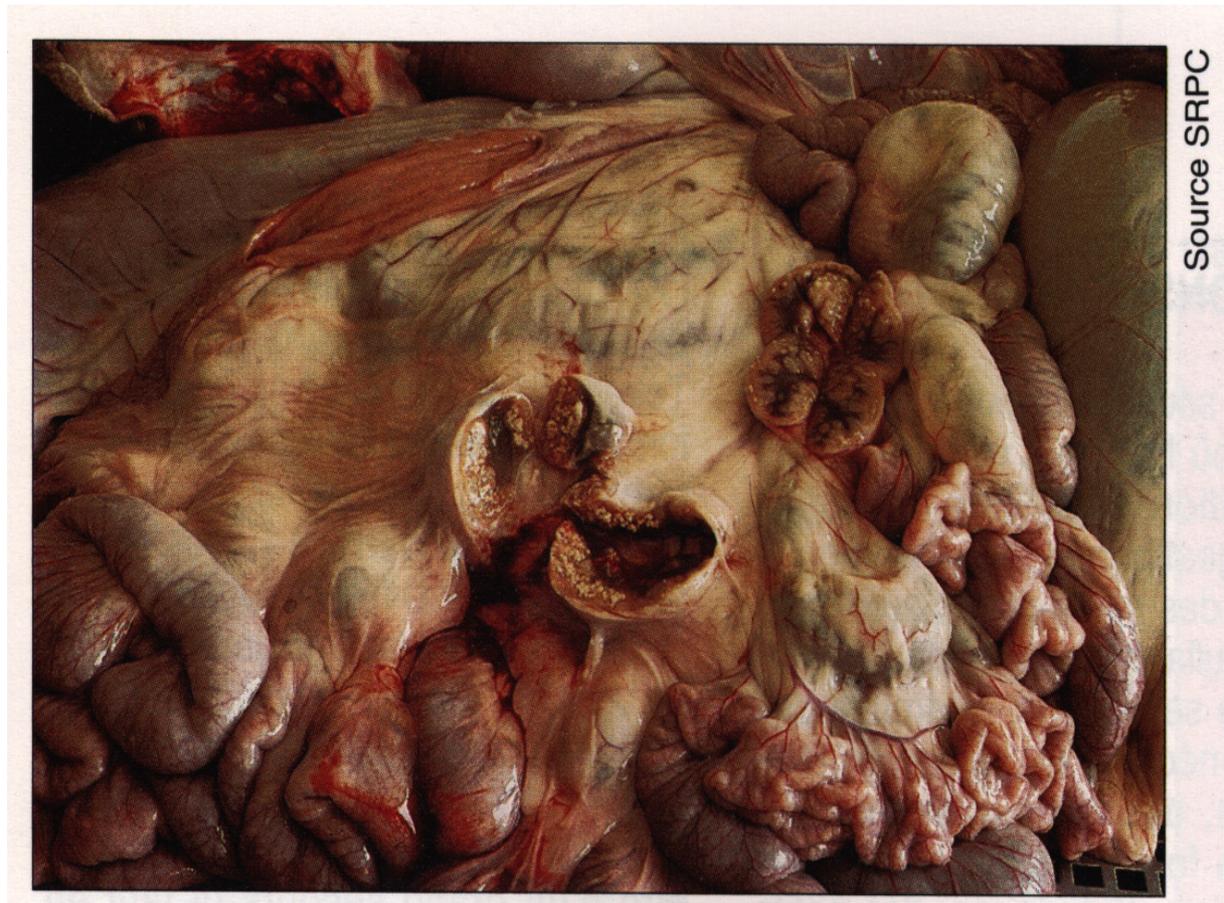


Figure 8 : Foyers de calcification des noeuds lymphatiques mésentériques



Figure 9 : Hypertrophie et caséification d'un noeud lymphatique mésentérique

#### I-2-2- Lésions microscopiques

La lésion de base est un granulome (Figure 10). Au niveau de l'intestin, l'infection par Map se traduit donc par une entérite granulomateuse hypertrophiante, diffuse ou localisée, essentiellement au niveau de l'iléon et du jéjunum (Stehman, 1996 ; Sigurdardottir et al., 1999) mais qui peut également être présente dans le caecum et le colon (Gezon et al., 1988 ; Manning et al., 2003 ; Kruze et al., 2006). Les lésions se situent principalement au niveau des plaques de Peyer intestinales (Valheim et al., 2002a).

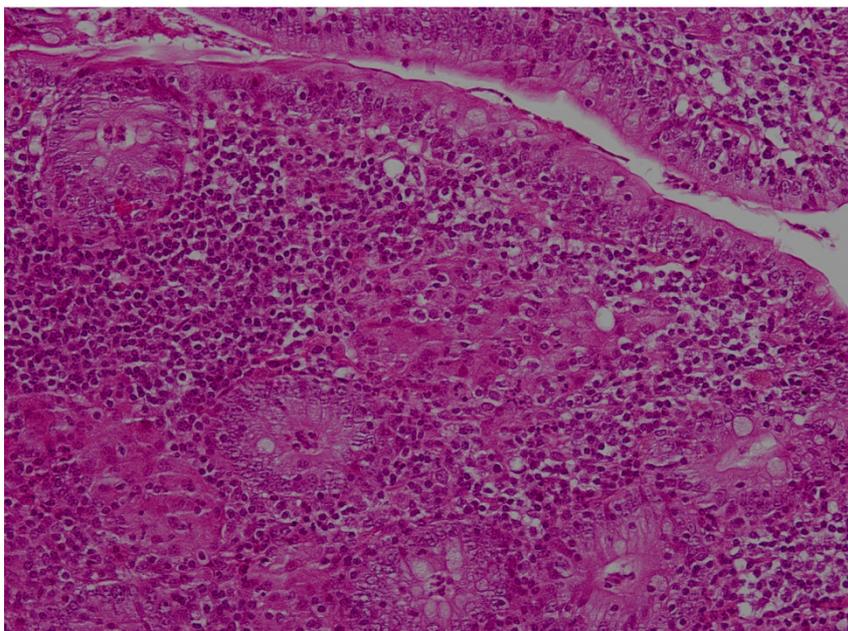


Figure 10 : Granulome au niveau de l'iléon (coloration hémalun-éosine, Microscope optique Nikon, images X 200, C. Rossignol, INRA Nouzilly)

Deux types de lésions ont été décrites (Navarro et al., 1998 ; Corpa et al., 2000b) :

- des lésions paucibacillaires (ou tuberculoïdes) caractérisées par une infiltration lymphocytaire diffuse de la lamina propria, avec peu de Mycobactéries. Ces lésions ne sont pas très fréquentes chez les caprins (15 à 27 % des chèvres). Ce type de lésions est associé à des fortes réactions immunitaires à médiation cellulaire, et pourrait être considéré comme des lésions latentes (ou maîtrisées). Ces lésions sont associées à une importante population de lymphocytes Th 1 et une faible excrétion fécale des bactéries (Dimareli-Malli et al., 2009).

- des lésions multibacillaires (ou lépromateuses) caractérisées par une entérite granulomateuse avec des macrophages contenant de nombreuses Mycobactéries. Ces lésions sont les plus fréquentes chez les caprins (jusqu'à 70% des chèvres observées par Tripathi et al., 2006). Ce type de lésions est associé à des fortes réactions immunitaires à médiation humorale et pourrait être assimilé à une extension de l'infection. Ces lésions sont également associées à une importante population de lymphocytes Th 2.

Chez les caprins, il existe une grande diversité des lésions avec des stades intermédiaires (Sigurdardottir et al., 1999 ; Corpa et al., 2000b). Chez des animaux en phase clinique, on peut observer soit des lésions paucibacillaires, soit des lésions multibacillaires (Navarro et al., 1998 ; Catton, 2002).

Dans les nœuds lymphatiques, les foyers granulomateux sont localisés dans le cortex externe et dans le paracortex (Navarro et al., 1998 ; Valheim et al., 2002a ; Kruze et al., 2006). On peut également observer une accumulation de macrophages remplis de Mycobactéries (Gezon et al., 1988). Chez certaines chèvres, on observe des foyers minéralisés, entourés par des macrophages et une capsule fibreuse (Valheim et al., 2002a).

Des lésions granulomateuses ont également été observées dans le foie et les poumons de chèvres dans les cas avancés (Thomas, 1983 ; Gezon et al., 1988 ; Manning et al., 2003). Des lésions de dégénérescence axonale des nerfs sciatiques et du plexus brachial ainsi que des foyers d'amyloïdose des glomérules rénaux, des glandes surrénales et de la glande mammaire ont été observés sur des chèvres (Gezon et al., 1988).

## **II - Importance économique**

Les pertes économiques sont liées à la mortalité, à des réformes anticipées, à une diminution de la production laitière (Ott et al., 1999) et à l'amaigrissement. Pour les caprins, il n'existe pas beaucoup de données et des études complémentaires seraient nécessaires.

L'effet de la paratuberculose sur la baisse de la production laitière a été mesurée chez les bovins (Benedictus et al., 1987 ; Spangler et al., 1992 ; Nordlund et al., 1996 ; Ott et al., 1999 ; Kudahl et al., 2004 ; Hendrick et al., 2005a ; Lombard et al., 2005) : les vaches infectées produisent moins de lait (entre 2 et 19 % pour Nordlund et al., 1996 ; entre 179 et 748 kg selon Ott et al., 1999 ; entre 173 et 548 kg, selon Hendrick et al., 2005a ; entre 1,58 et 7,20 kg/j selon Beaudeau et al., 2007). La baisse de production des vaches avec une infection subclinique est environ la moitié de celle des vaches avec une infection clinique (Buergelt et Duncan, 1978).

L'augmentation de la mortalité a été évaluée chez les bovins (Ott et al., 1999) : dans les troupeaux atteints de paratuberculose, la mortalité est supérieure (entre 15 et 43 %). Pour les ovins, la mortalité due à la paratuberculose varie selon les auteurs entre 1 et 17,5 % (Sigurdsson, 1960 ; Crowther et al., 1976 ; Cranwell, 1993 ; Bush et al., 2006).

Le taux de réforme des vaches excrétrices est supérieur (6 fois selon Wilson et al., 1993 ; 3 fois selon Hendrick et al., 2005a) à celui des vaches non excrétrices. De même, le taux de réforme des vaches séro-positives est supérieur (environ 2 fois, selon Hendrick et al., 2005a). Chez les caprins, le taux de réforme moyen due à la forme clinique a été estimé à 19% (Petit, 2006).

Les pertes économiques peuvent également être liées à une diminution de la fertilité. L'effet de l'infection sub-clinique sur la fertilité a été étudié sur des chèvres laitières grecques (Kostoulas et al., 2006a). Paradoxalement, la fertilité est meilleure chez les animaux infectés que chez les animaux non infectés, pour les chèvres de parité inférieure à 4. Pour les chèvres plus âgées (parité supérieure à 6), l'infection a un effet défavorable sur la fertilité tandis que pour les chèvres de parité comprise entre 4 et 6 aucun effet n'a été observé. Ces résultats doivent être interprétés avec prudence car il est possible qu'il y ait eu un biais d'échantillonnage.

Chez les caprins, les pertes globales liées à l'infection ont été estimées à 5 229 € par troupeau, avec de grandes disparités selon les troupeaux (de 373 à 15 000 €) (Petit, 2006).

### **III - Epidémiologie**

#### **III - 1 - Epidémiologie descriptive**

##### **III-1-1- Répartition géographique**

La paratuberculose caprine a une répartition géographique mondiale (Stehman, 2000). Elle a été décrite dans de nombreux pays : en Europe (France, Espagne, Portugal, Grèce, Norvège, Suisse, Royaume-Uni, Islande, Italie, Autriche, Croatie, Slovénie, Danemark, Pologne), en Amérique (Etats-Unis, Chili, Argentine, Mexique, Canada), en Océanie (Australie, Nouvelle-Zélande), en Asie (Inde, Iran, Liban, Corée, Turquie) et en Afrique (Afrique du Sud).

##### **III-1-2- Prévalence**

En Europe, un grand nombre d'études ont été conduites pour estimer la prévalence de l'infection par Map, mais faute d'un protocole standard, les comparaisons sont difficiles. Nielsen et Toft (2009), à partir des données espagnoles et suisses, considèrent que la prévalence chez les petits ruminants doit être supérieure à 20 %. Aucune valeur de prévalence intra-troupeau n'est définie. Pour pouvoir comparer les différentes études, il faudrait pouvoir connaître la prévalence réelle, estimée à partir de la prévalence apparente (calculée avec le test utilisé) et de la qualité (sensibilité et spécificité) du test utilisé (Nielsen et Toft, 2009).

En France, l'infection par Map est considérée comme largement répandue (Petit, 2006) mais aucune étude nationale de prévalence n'a été conduite jusqu'à présent chez les bovins, les ovins ou les caprins.

#### **III - 2 - Epidémiologie analytique**

La paratuberculose affecte surtout les ruminants domestiques et sauvages.

### III-2-1- Voies d'excrétion et matières virulentes

#### 1 - Excrétion fécale

L'excrétion fécale débute avant l'apparition des premiers signes cliniques (Clarke, 1997). Les quantités de bacilles excrétées en début d'infection sont faibles et l'excrétion est intermittente. Au fur et à mesure que l'infection progresse, l'excrétion devient permanente et importante. Ainsi, des bovins infectés excrètent 10 à 100 bactéries par gramme de fèces en début d'infection et entre  $10^4$  et  $10^{12}$  bactéries par gramme à un stade avancé (Rossiter et Burhans, 1996). L'excrétion fécale a été observée sur des caprins âgés de 2 à 8 ans, avec un pourcentage d'animaux excréteurs dans chaque classe d'âge compris entre 11 et 33% (Thomas, 1983). Le pourcentage maximal a été observé chez les chèvres de 8 ans.

En outre, dans les troupeaux fortement contaminés, bovins (McDonald et al., 1999; Whittington et Sergeant, 2001 ; Van Roermund et al., 2007) et caprins (Manning et al., 2003), il pourrait exister une excrétion passive de la bactérie, qui correspond à son transit dans l'intestin sans provoquer d'infection. Cette excrétion passive a été décrite par Sweeney et al. (1992c) chez des bovins de 2 ans inoculés expérimentalement par intubation intra-ruminale : l'excrétion de la bactérie apparaît 1 à 6 jours après l'inoculation et est proportionnelle à la quantité inoculée. Ces animaux excréteurs n'ont pas exprimé de signes évocateurs de l'infection (réactions immunitaires ou réactions histologiques) mais ils ont été abattus rapidement (28 jours) après l'inoculation. Dans les conditions naturelles d'infection, il n'est pas établi que l'excrétion passive ait lieu (Van Roermund et al., 2007).

#### 2 – Excrétion par la mamelle (lait et colostrum)

La dissémination de l'infection dans la glande mammaire a été mise en évidence chez la chèvre (Stehman, 1996) et chez les bovins (Brady et al., 2008). Map a été isolé dans le colostrum et dans le lait de bovins malades ou infectés subcliniques (Streeter et al., 1995 ; Sweeney et al., 1992a). Il en est de même pour les ovins (Muehlherr et al., 2003) et les caprins malades et infectés (Singh et Vihan, 2004 ; Nebbia et al., 2006 ; Kumar et al., 2008). Chez les bovins, l'excrétion par la mamelle est plus fréquente pour les animaux fortement excréteurs (Streeter et al., 1995 ; Sweeney et al., 1992a). La quantité de Map excrétées dans du lait de vache a été estimée entre 2 et 8 UFC/50 ml dans le cas d'animaux asymptomatiques (Sweeney et al., 1992a). Le lait d'animaux malades peut contenir jusqu'à 100 UFC/ml (Giese et Ahrens, 2000).

Sur des chèvres au stade sub-clinique, l'excrétion, détectée par nested-PCR, est intermittente et maximale en début de lactation (Nebbia et al., 2006).

#### 3 - Excrétion dans le sperme

On a retrouvé le bacille dans le sperme de taureau (Pfeiffer, 2004) et de bélier. Il pourrait en être de même chez le bouc lors de formes disséminées, mais il n'existe aucune donnée expérimentale.

### III-2-2- Transmission

#### 1 - Transmission par voie orale

La voie orale représente la principale voie de contamination. Les animaux se contaminent en ingérant des aliments souillés par des matières fécales (eau, pâturages, ...), du lait ou du colostrum, ou par léchage de matériel souillé. La transmission horizontale entre veaux est possible par contact avec des veaux excréteurs (Van Roermund et al., 2007), infectés ou non.

Dans les troupeaux caprins intensifs, il faut souligner l'importance épidémiologique du colostrum de mélange, constitué à partir du colostrum de plusieurs chèvres, qui peut contaminer l'ensemble des animaux de renouvellement. Chez les bovins, l'utilisation de colostrum de mélange augmente la probabilité que le colostrum contienne des concentrations plus importantes de Map (Nielsen et al., 2008). Cette pratique est d'autant plus risquée que la thermisation (56°C-60 min) ne permet pas de détruire Map (Pachoud, 1991 ; Lambeth et al., 2004). En revanche, la pasteurisation (60°C-60 min) semble efficace pour détruire Map (Godden et al., 2006) quand la concentration initiale n'est pas trop importante (Grant et al., 2002) et la distribution de colostrum pasteurisé diminue l'exposition initiale des veaux à Map (Stabel, 2008).

#### 2 – Transmission par voie utérine

L'infection des fœtus par voie transplacentaire a été reportée pour la première fois en 1929. Cette voie a été confirmée chez les bovins (Whittington et Windsor, 2009), les ovins (Lambeth et al., 2004) et chez les caprins (Manning et al., 2003 ; Alinovi et al., 2009a). Cette transmission est d'autant plus probable que les mères sont fortement infectées (Sweeney, 1996 ; Lambeth et al., 2004).

Cependant, des inconnues persistent quant aux modalités de l'infection utérine et au statut futur du fœtus infecté (Whittington et Windsor, 2009).

La transmission verticale constitue la principale voie de transmission, en particulier dans les troupeaux à faible prévalence (Benedictus et al., 2008), mais une transmission horizontale est également possible chez les veaux (Van Roermund et al., 2007 ; Benedictus et al., 2008).

### III-2-3- Facteurs de risque

#### 1 – Facteurs favorisant l'infection

##### L'âge

Chez les bovins, une méta-analyse conduite récemment a mis en évidence une plus grande susceptibilité des jeunes à l'infection par Map (Windsor et Whittington, 2010). Cependant, l'infection est possible chez les adultes, en particulier avec des doses infectantes élevées. L'effet de l'âge n'a pas été mis en évidence chez les caprins (Hines et al., 2007b).

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer les différences de susceptibilité entre jeunes et adultes. Sweeney (1996) considère que la perméabilité intestinale du nouveau-né, qui permet le passage des immunoglobulines, rend également possible la pénétration de Map. Les réactions immunitaires jouent aussi leur rôle (Chiodini, 1996) puisque les cellules qui favorisent les réactions immunitaires à médiation cellulaire (les lymphocytes T  $\gamma/\delta$ +

représentent entre 30 et 80 % des lymphocytes circulant chez le nouveau-né, contre 15 à 30% chez les adultes.

### Les facteurs génétiques

Chez les bovins, des facteurs génétiques sont impliqués dans la susceptibilité à la maladie, avec des valeurs moyennes pour l'héritabilité à l'infection (Koets et al., 2000 ; Mortensen et al., 2004 ; Gonda et al., 2006). Le gène CARD15 est également impliqué dans la susceptibilité des bovins à l'infection par Map (Pinedo et al., 2009). Le même phénomène semble être observé chez les ovins (Reddacliff et al., 2005), mais il n'existe pas de données pour les caprins.

## 2 – Facteurs favorisant l'expression clinique

Les facteurs de stress, tels que la mise-bas, peuvent induire l'évolution d'une forme sub-clinique vers une forme clinique chez les bovins (Karcher et al., 2008a). L'état physiologique peut moduler l'expression clinique : la gestation s'accompagne souvent d'une rémission momentanée des symptômes, avec reprise de l'évolution à la faveur de la mise-bas. De même, les cas cliniques de paratuberculose sont plus fréquemment observés chez les vaches hautes productrices, compte tenu des contraintes physiologiques, notamment lors du pic de lactation (Anonyme, 2009a).

### III - 3 - Epidémiologie synthétique

La paratuberculose est typiquement une maladie d'achat (Whittington et Sergeant, 2001). La contamination du troupeau se fait la plupart du temps suite à l'introduction d'un animal infecté (sauf cas particulier de contamination par la faune sauvage, par du matériel souillé provenant d'un autre élevage, ou lors de pâtures communes avec un troupeau présentant de la paratuberculose).

L'évolution de l'infection dans un troupeau suit la plupart du temps le même schéma (Figure 11). Deux évolutions sont possibles (Vialard, 2002) :

- l'animal introduit développe une forme clinique du fait du stress engendré par le changement d'exploitation. L'excrétion fécale du germe étant plus importante en phase clinique, l'animal introduit contamine alors rapidement les jeunes. Dans ce cas, les premiers cas cliniques sur des animaux nés dans l'exploitation apparaissent 2 à 3 ans plus tard.

- l'animal introduit reste asymptomatique, mais excrète quand même à bas bruit des bacilles paratuberculeux dans l'environnement. Il peut alors s'écouler plusieurs années avant que la charge bactérienne soit suffisante pour contaminer les jeunes. L'apparition de premiers cas cliniques sur des animaux nés dans l'exploitation est alors beaucoup plus tardive, et il devient très difficile d'identifier l'animal responsable de l'introduction de la maladie dans le troupeau.

Une transmission interspécifique a également été prouvée (Vialard, 2002). Ainsi un troupeau de bovins infectés peut être une source de contamination pour les chèvres. Une transmission inter-espèces semble également possible entre caprins et ovins, car des isolats de même profil ont été mis en évidence chez ces 2 espèces dans un troupeau grec (Dimareli-Malli et al., 2009). De la même façon, les ruminants sauvages sont incriminés dans la transmission de la maladie. En Inde, le même génotype de Map a été retrouvé sur des antilopes et des caprins partageant le même environnement (pâtures et points d'eau) (Kumar et al., 2010). Néanmoins, le rôle épidémiologique de ces espèces est probablement limité (Vialard, 2002).

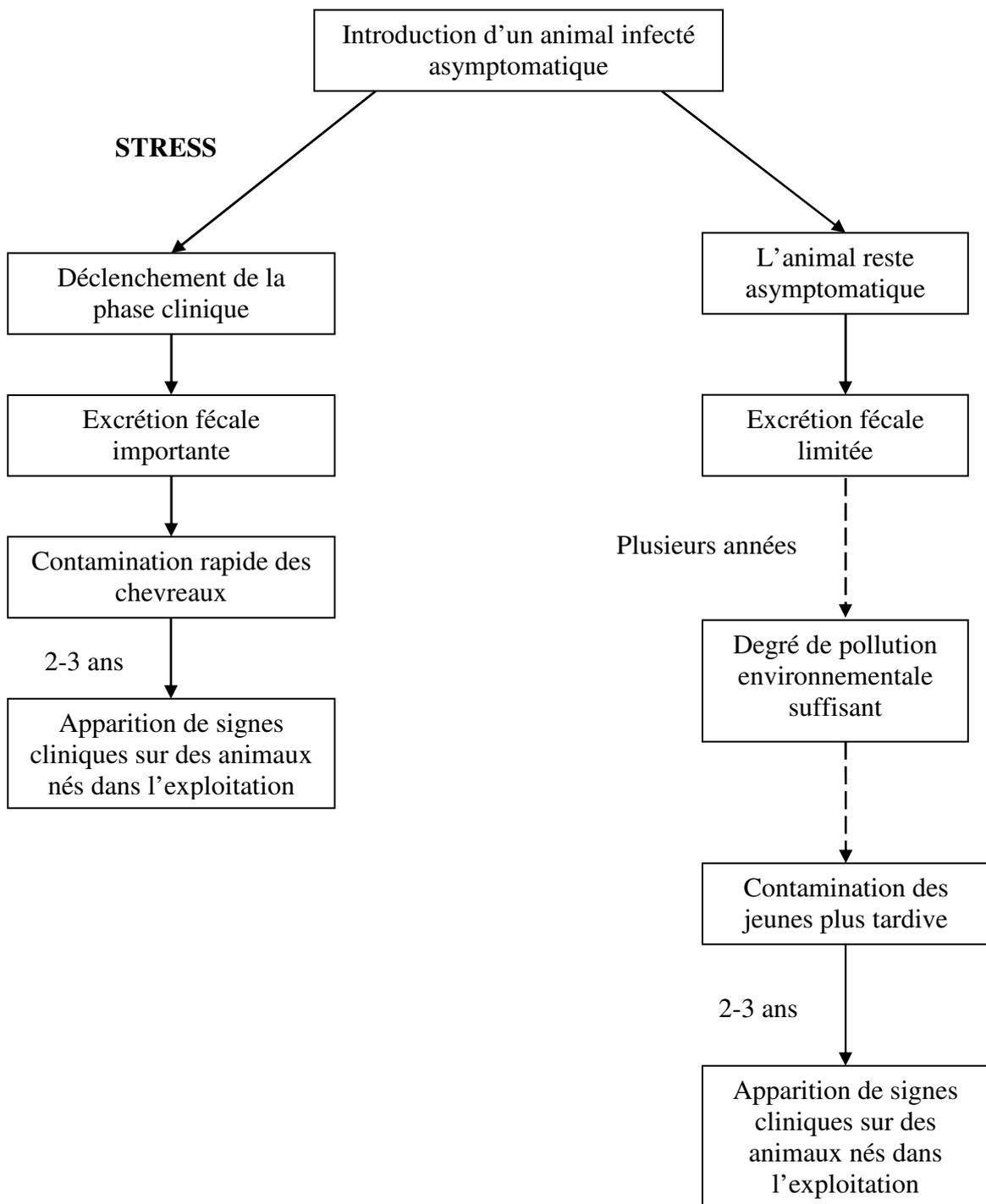


Figure 11 : Introduction et évolution possible de la paratuberculose dans un troupeau (Wintz, 2006)

## **IV - Physiopathologie**

Map ne produit aucune toxine. Son rôle dans la genèse des lésions et des signes cliniques est lié aux réactions inflammatoires induites par la réponse immunitaire à médiation cellulaire (Clarke, 1997). Celle-ci semble en quelque sorte être détournée de son objectif premier de protection, et être à l'origine des effets cliniques.

Des glyco-peptides appartenant à la paroi de Map pourraient être impliqués dans la formation de biofilm et dans la virulence de la bactérie (Wu et al., 2009).

### **IV - 1 - Devenir de la bactérie dans l'organisme (Clarke, 1997)**

Les phagocytes mononucléés (monocytes, macrophages, cellules dendritiques) peuvent être considérés comme une des cibles majeures de l'infection par Map. En effet, chez un animal infecté, ces cellules :

- sont infectées chroniquement par Map ;
- présentent les antigènes de Map aux lymphocytes et initient ainsi la réponse immunitaire adaptative, avec implication des lymphocytes T pour la réponse à médiation cellulaire et des lymphocytes B pour la réponse à médiation humorale ;
- servent de vecteurs à Map pour sa dissémination sanguine.

#### **IV-1-1- Porte d'entrée et extension locale**

Dans les conditions naturelles, la voie orale apparaît comme la voie de contamination majeure, sinon unique, pour toutes les espèces (Stabel, 2007).

Chez les bovins, après ingestion, Map se localise primitivement dans les tonsilles et dans l'intestin grêle (Payne et Rankin, 1961) puis, chez les bovins (Momotami et al., 1988) et chez les caprins (Sigurdardottir et al., 2001) Map subit une endocytose par les cellules M du lympho-épithélium recouvrant les plaques de Peyer du jéjunum et de l'iléon. Chez les caprins, Map peut également traverser la paroi intestinale en dehors des plaques de Peyer (Sigurdardottir et al., 2005). Puis, dans les 2 espèces, des mycobactéries intactes ou dégradées sont transportées dans des vacuoles des cellules M jusqu'aux macrophages présents dans les zones subépithéliales et intraépithéliales des plaques de Peyer et dans la lamina propria adjacente (Momotami et al., 1988 ; Sigurdardottir et al., 2001). Entre 3 et 49 semaines après une infection expérimentale, il est possible de trouver ces lésions précoces au niveau des plaques de Peyer des caprins (Sigurdardottir et al., 1999). La présence des deux tiers des follicules lymphoïdes au niveau iléal explique ainsi la localisation initiale du processus infectieux et lésionnel à l'intestin grêle distal.

Les macrophages intestinaux représentent la cellule cible pour l'infection par Map. Dans les macrophages, l'action des cellules et des cytokines aboutit à la mort et la dégradation de Map. La résistance à ces mécanismes, permet la persistance et la multiplication de Map et le développement de l'infection. L'inflammation granulomateuse se développe progressivement, suite à l'afflux de cellules et de cytokines destinées à détruire Map présents dans les macrophages (Chiodini, 1996).

A partir de l'iléon, l'extension digestive est progressive, essentiellement vers le gros intestin. A partir des formations lymphoïdes pariétales, les macrophages transportent Map vers les nœuds lymphatiques de drainage loco-régionaux. L'excrétion fécale intervient plus tardivement mais le mécanisme est mal connu.

#### IV-1-2- Dissémination dans l'organisme

Il peut s'écouler plusieurs années avant qu'il n'y ait dissémination du bacille dans tout l'organisme. En effet, il est nécessaire qu'il y ait diminution de la sécrétion de MIF (Macrophages Migration Inhibitory Factor). Les lymphocytes CD4+ sécrétant ce facteur sont de moins en moins nombreux au niveau des nœuds lymphatiques mésentériques au stade terminal (Navarro et al., 1998). Ils sont remplacés par des CD8+, cytotoxiques.

Les macrophages infectés migrent dans le système lymphatique puis rejoignent la circulation sanguine au niveau de la veine cave. Une bactériémie peut être détectée. L'existence d'une véritable bactériémie est démontrée indirectement par la présence de lésions sur des organes autres que digestifs, comme le foie par exemple (Antognoli et al., 2008). La fréquence des bactériémies et le stade de l'infection auxquelles elles surviennent sont encore incomplètement connus.

Une dissémination de Map en dehors de la localisation intestinale a été démontrée pour les bovins (Sweeney, 1996 ; Brady et al., 2008) et pour les caprins (Manning et al., 2003), en général en relation avec l'extension de l'infection. Map peut ainsi être présent dans le foie, l'utérus, dans les nœuds lymphatiques rétro-mammaires, dans la mamelle ou dans les organes sexuels mâles.

#### IV - 2 - Réponse immune

La complexité de la réponse immune à l'infection par Map est liée :

- aux mécanismes d'évasion développés par la bactérie vis-à-vis de la réponse innée ;
- à l'évolution de la nature même de la réponse adaptative au cours de l'infection.

#### IV-2-1- Immunité innée

##### Résistance à la bactéricidie

La persistance de Map dans les monocytes est la résultante de processus simultanés de dégradation et de multiplication (Woo et al., 2006).

Pour survivre dans les macrophages, dont une fonction essentielle est la bactéricidie, Map, tout comme les autres mycobactéries, développe différents mécanismes d'évasion qui sont encore à l'étude (Woo et Czuprynski, 2008).

##### Présentation des antigènes

Les phagocytes mononucléés jouent un rôle essentiel de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) initiant ainsi la réponse immune adaptative.

##### Susceptibilité génétique

Chez les bovins, les gènes *CARD15/NOD2* participent à la susceptibilité à l'infection (Pinedo et al., 2009). Chez les ovins, il semble exister une influence génétique pour la susceptibilité à la maladie (Reddacliff et al., 2005).

#### IV-2-2- Immunité adaptative

Les études sur l'immunité vis-à-vis de Map chez les bovins (Stabel, 2000a) et chez les caprins (Storset et al., 2001) suggèrent des mécanismes identiques à ceux développés pour les autres mycobactéries avec des réactions immunitaires à médiation cellulaire et des réactions immunitaires à médiation humorale, tant au niveau local (Begara-Mcgorum et al., 1998) qu'au

niveau périphérique (Chiodini, 1996). L'ostéopontine favorise les réactions immunitaires à médiation cellulaire par son action sur les cytokines de type Th1 (Karcher et al., 2008b). L'immunité adaptative à médiation cellulaire joue un rôle majeur dans la protection. Les réactions immunitaires à médiation cellulaire sont considérées comme le principal mécanisme capable d'éliminer l'infection. Par ailleurs, compte tenu du caractère intracellulaire de Map, la réponse humorale est classiquement considérée comme non protectrice.

Les réactions cellulaires à médiation cellulaire reposent sur l'action des lymphocytes T : ils produisent des cytokines qui favorisent la destruction des mycobactéries par les macrophages. Les lymphocytes T comprennent plusieurs sous-populations dont les lymphocytes Th (helper). On peut distinguer 2 populations de lymphocytes Th qui produisent différentes cytokines. Les lymphocytes Th 1 sécrètent IFN $\gamma$ , IL-2 et IL-12, favorisent l'activation des macrophages et les réactions d'hypersensibilité retardée. Les lymphocytes Th 2 sécrètent IL-4, IL-5 et IL-10 et favorisent la différenciation des lymphocytes B et la production d'anticorps. Il existe une balance entre les 2 populations : IL-4 et IL-10 tendent à supprimer les réponses de type Th1, tandis que IFN $\gamma$  agit contre les réponses de type Th 2. Une réponse importante des lymphocytes Th 1 est associée à la production d'IFN $\gamma$ , des réactions d'hypersensibilité retardée et une réduction du nombre de mycobactéries (pouvant aller jusqu'à l'élimination de la bactérie associée à la guérison). En revanche, une réponse importante des lymphocytes Th 2 est associée à une faible production d'IFN $\gamma$ , une concentration élevée en anticorps et des charges importantes en mycobactéries. La succession entre les réactions des Th 1 et des Th2 a été démontrée sur des ovins et des bovins infectés expérimentalement par Map (Thorel et al., 1992 ; Stabel, 2000b).

Chez les animaux guéris, bovins (Chiodini, 1996) ou caprins (Storset et al., 2001 ; Manning et al., 2003), les réactions de type Th1 ont été suffisamment efficaces pour détruire complètement Map. Les lésions intestinales sont très limitées et les réactions de type Th2 ne se développent pas (Clarke, 1997).

De manière schématique, la polarisation de la réponse adaptative est considérée comme différente selon les phases de l'infection (Clarke, 1997 ; Manning et Collins, 2001 ; Tanaka et al., 2005 ; Stabel, 2007). La réponse de type Th1 correspondrait à une maîtrise de l'infection par le système immunitaire, dans les phases initiales de l'infection, et durerait ainsi quelques mois à quelques années, tandis que la réponse de type Th2 correspondrait à une rupture de l'équilibre au profit de Map, et à la phase clinique de l'infection. L'IFN $\gamma$  est la cytokine la plus importante pour le contrôle des infections par des mycobactéries (Stabel, 2000a). La réponse de type Th2 provoque l'activation et la prolifération des lymphocytes B (Waters et al., 1999), avec en conséquence la production d'anticorps.

Au cours de l'évolution de la paratuberculose, les réactions immunitaires à médiation cellulaire diminuent, ce qui rend possible la prolifération intracellulaire des mycobactéries. Les cellules infectées sont lysées et libèrent des antigènes qui stimulent la production d'anticorps. Ces anticorps ne sont pas efficaces pour détruire le reliquat des mycobactéries intracellulaires et ne protègent pas l'hôte de la maladie (Stabel, 2000a). Les anticorps sériques augmentent, les lésions s'étendent et les manifestations cliniques se développent. Les anticorps sont des indicateurs de l'évolution de l'infection vers la maladie (Stabel, 2000a). Les observations réalisées chez les caprins suite à des infections expérimentales confortent ce schéma pathogénique (Storset et al., 2001).

En résumé, les animaux d'un troupeau infecté par Map peuvent présenter différentes formes pathologiques et immunologiques et se trouver en différents endroits du spectre de réponses. Chacune de ces réponses immunologiques différentes peut apparaître à n'importe quel moment et l'expression de l'infection peut passer de la forme focale à la forme diffuse. La compréhension de cet aspect est particulièrement important car la réponse de l'animal aux différents tests de diagnostic est associée à sa localisation dans le spectre (Clarke et Little, 1996 ; Perez et al., 1997). Aucun test basé sur une réponse immunitaire, humorale ou cellulaire, ne peut, seul, identifier tous les animaux du spectre.

La forme subclinique est caractérisée par une réponse importante en IFN $\gamma$ , une excrétion fécale discontinue et une production faible d'anticorps sériques, tandis que la forme clinique est caractérisée par une diminution de la réponse en IFN $\gamma$ , par une augmentation de l'excrétion fécale et par une production importante d'anticorps sériques (Storset et al., 2001, pour les caprins ; Sohal et al., 2008).

## **V - Diagnostic**

Le diagnostic clinique de paratuberculose chez la chèvre est difficile à établir en raison de l'absence de symptômes spécifiques. Classiquement, on suspecte une paratuberculose sur des caprins de deux ans ou plus, présentant un amaigrissement progressif et une chute de production avec maintien de l'appétit. Ces signes cliniques sont communs à d'autres maladies avec un amaigrissement chronique telles que le parasitisme gastro-intestinal, les abcès internes à *Corynebacterium pseudotuberculosis*, l'arthrite-encéphalite caprine (CAEV), ou la malnutrition (Stehman, 1996).

Le diagnostic paraclinique de la paratuberculose fait appel à des outils de diagnostic variés. Il est mis en œuvre pour confirmer une suspicion clinique (diagnostic) ou pour dépister des animaux au stade subclinique (dépistage). Autant la confirmation au laboratoire d'une forme clinique apparaît aisée, autant la détection des animaux infectés, excréteurs ou non, est plus délicate, les animaux infectés non excréteurs restant très difficilement identifiables. D'une façon générale, les outils disponibles reposent sur la mise en évidence des lésions, sur la détection de la bactérie ou de son génome (bactérioscopie, culture, PCR), ou sur la mise en évidence de la réaction immunitaire (cellulaire ou humorale) induite chez l'hôte par Map. Leur usage dépend du statut infectieux que l'on veut mettre en évidence.

### **V - 1 - Méthodes de détection basées sur la mise en évidence des lésions**

#### **V-1-1- Mise en évidence des lésions macroscopiques**

Le recours à l'autopsie peut permettre de confirmer la suspicion clinique : un épaississement de la paroi intestinale, une hypertrophie des nœuds lymphatiques mésentériques avec des foyers de nécrose, voire de calcification, orientent fortement le diagnostic.

Les lésions macroscopiques peuvent être observées avant l'apparition des signes cliniques (Sigurdardottir et al., 1999 ; Sigurdardottir et al., 1999; Valheim et al., 2002a). Malheureusement, parfois aucune lésion macroscopique n'est visible sur des animaux infectés (Navarro et al., 1991).

## V-1-2- Mise en évidence des lésions microscopiques

Les lésions se développent progressivement et précèdent l'apparition des signes cliniques. Les prélèvements utilisés pour l'analyse histologique sont les intestins et les nœuds lymphatiques mésentériques. Après la mort de l'animal, ils sont fixés dans le formol à 10%. Puis les échantillons sont inclus dans des blocs de paraffine avant d'être découpés au microtome en fines sections (5 µm). Chaque coupe est déposée sur une lame puis on effectue la coloration à l'hématoxyline-éosine-safran. Les lames sont lues au microscope (objectif x 20).

Il s'agit de mettre en évidence les lésions associées à l'infection par Map : lésions tuberculoïdes ou lépromateuses. En raison de la dissémination des lésions, surtout en début d'évolution, il faut observer un grand nombre de prélèvements.

### V - 2 - Méthodes de détection basées sur la mise en évidence de l'agent (O.I.E., 2008)

Une des difficultés de l'utilisation des méthodes directes tient au fait que l'excrétion fécale de Map par les animaux est évolutive, d'abord nulle (animaux récemment infectés non excréteurs), puis intermittente, et enfin permanente en quantité croissante jusqu'à une éventuelle phase clinique. Par ailleurs, au moins chez les bovins, les bactéries sont inégalement distribuées dans les matières fécales, ce qui peut faire penser que l'excrétion est intermittente (Whittington et Sergeant, 2001).

#### V-2-1- Bactérioscopie

Il s'agit d'une observation microscopique (microscope à l'immersion, grossissement ×1000), après une coloration par la technique de Ziehl-Neelsen qui utilise la propriété d'acido-alcoolorésistance des Mycobactéries : les Mycobactéries apparaissent en rose sur un fond bleu. La lecture de chaque lame s'effectue pendant 15 minutes (Martinson et al., 2008). Une lame est considérée comme positive (Figure 12) si les bacilles sont regroupés en amas (plus de 3) (O.I.E., 2008).

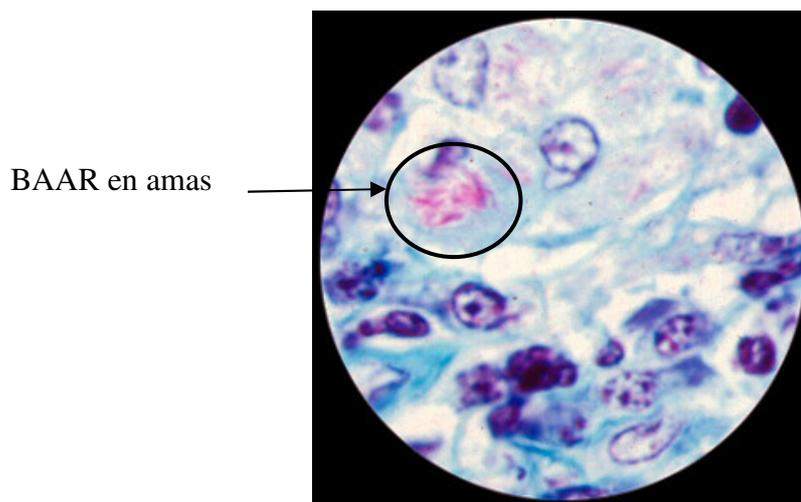


Figure 12 : Coloration de Ziehl-Neelsen positive (sur tissus)

Les prélèvements utilisés sont : les fèces et les organes atteints (valvule iléo-caecale et nœuds lymphatiques mésentériques).

C'est une technique rapide et économique mais elle est peu sensible ( $10^6$  bactéries/g de tissu sont nécessaires pour la détection) (Chiodini, 1989). Lorsqu'elle est réalisée sur des fèces de bovins, la sensibilité est meilleure pour les infections cliniques que pour les infections sub-cliniques (49,3 % versus 19,3 %) (Zimmer et al., 1999). Chez les ovins, la sensibilité est de 61,5 % sur les fèces et de 76,9 % sur les tissus (Coelho et al., 2008).

De plus, elle est également peu spécifique, car elle détecte tous les bacilles acido-alcool-résistants, mais aucune valeur n'a été définie pour la spécificité.

#### V-2-2- Culture

Il s'agit de la mise en évidence de la croissance de Map, après ensemencement d'un milieu de culture adapté, à l'aide de prélèvements réalisés sur l'animal (fèces, lait, organes) ou dans l'environnement. La culture réalisée sur des tissus atteints est considérée comme une méthode de référence (Whittington et al., 1999). Pour les caprins atteints (Dimareli-Malli et al., 2009), la culture à partir d'intestin donne de meilleurs résultats que la culture à partir de nœuds lymphatiques ou de fèces. La culture sur des échantillons de lait de chèvre est possible (Singh et Vihan, 2004) mais les colonies sont détectées plus tardivement que pour des cultures réalisées à partir de fèces ou de tissus (Kumar et al., 2008). La lenteur de la croissance peut être due à la présence de substances inhibitrices dans le lait (Singh et Vihan, 2004).

La technique comporte deux grandes étapes : la décontamination et l'ensemencement. Ces étapes ne sont pas standardisées et varient considérablement entre les laboratoires (Anonyme, 2000). Ce manque de standardisation rend très difficile la comparaison des résultats obtenus par différents laboratoires (Anonyme, 2000).

En France (norme NF U47-103), la décontamination est réalisée à l'aide de chlorure d'hexacétylpyridinium (HPC) à 0,75% pendant 18 heures à température ambiante. Cette étape a pour but de détruire les bactéries à croissance rapide et les champignons présents dans le prélèvement. Il existe d'autres procédés tels que la sédimentation, la sédimentation puis centrifugation, et la double incubation. Reddacliff et al. (2003) ont montré que des souches ovines de Map, présentes en faible quantité dans les prélèvements, pouvaient être détruites au cours de la phase de décontamination, induisant des réactions faussement négatives.

#### 1 - La culture conventionnelle

Il s'agit d'une culture sur milieu solide. La suspension obtenue après la décontamination est ensemencée sur un milieu spécifique, en tubes. Le milieu utilisé en France (norme NF U47-103) est le milieu de Herrold, avec du jaune d'œuf et de l'amphotéricine B et de la mycobactine. Quatre tubes (dont un sans mycobactine) sont ensemencés et mis à incuber à 37°C. La lecture est réalisée à 4, 8, 12 et 18 semaines.

L'identification de Map est ensuite basée sur des caractéristiques phénotypiques : le caractère acido-alcool-résistant objectivé par une coloration de Ziehl-Neelsen, la croissance lente (6 à 12 semaines, parfois plus), et la dépendance à la mycobactine, par comparaison avec le tube sans mycobactine.

Chez les bovins (Pithua et al., 2009) et chez les caprins (Salgado et al., 2007) la lecture peut être interprétée de façon semi-quantitative en fonction du nombre de colonies présentes (Tableau 8 et Tableau 9).

Tableau 8 : Résultats semi-quantitatifs de la culture pour les caprins (Salgado et al., 2007)

Niveau d'excrétion (UFC/g)	Statut animal
< 50	Faiblement excréteur
50-300	Moyennement excréteur
> 300	Fortement excréteur

## 2 - La culture radiométrique (Cousins et al., 1995 ; Whittington et al., 1998)

Le principe de cette méthode est la détection de l'activité métabolique de la mycobactérie en culture dans un milieu liquide (Middlebrook 7H12). Becton Dickinson fut le précurseur dans ce domaine en commercialisant à la fin des années 1980 le Bactec® 460 TB (Collins et al., 1990b). Cet appareil permettait de détecter par respirométrie radiométrique la croissance des mycobactéries en mesurant la quantité de  $^{14}\text{CO}_2$  libérée par le métabolisme de l'acide palmitique marqué au  $^{14}\text{C}$  présent dans le milieu de culture. L'appareil Bactec® mesure la quantité de  $^{14}\text{CO}_2$  présent dans l'atmosphère gazeuse du flacon et l'exprime selon une graduation appelée Index de Croissance (ou Growth Index) proportionnel au nombre de bactéries et à leur taux de croissance. Cet Index varie de 0 (absence de  $^{14}\text{CO}_2$ ) à 999 correspondant à la quantité maximale décelable par l'automate.

Actuellement, il existe plusieurs systèmes de culture des mycobactéries en milieu liquide (Shin et al., 2009) : Bactec, MGIT, Trek ESP, BacT/Alert 3D. Ces systèmes, développés pour les mycobactéries responsables de la tuberculose, peuvent également être utilisés pour Map, en choisissant des milieux de culture adaptés (présence de mycobactine).

La lecture est effectuée deux fois par semaine pendant les deux premières semaines, puis 1 fois par semaine pendant les six semaines suivantes. Le résultat est considéré comme potentiellement positif si l'index de croissance est supérieur à 10. Les lectures sont alors quotidiennes. Le résultat est considéré comme négatif si l'index de croissance est inférieur à 10 au bout de 8 semaines.

Quand l'index de croissance est supérieur ou égal à 100, il faut réaliser un frottis et une coloration de Ziehl-Neelsen afin de confirmer le caractère acido-alcool-résistant des bactéries en culture. Les résultats positifs sont alors confirmés par une culture conventionnelle. Une interprétation semi-quantitative peut être réalisée (Tableau 9).

Le principal avantage de cette méthode est sa rapidité, car elle permet de mettre en évidence une croissance des mycobactéries avant que les colonies ne soient visibles macroscopiquement (à partir de 4 semaines).

Cependant, ces systèmes mettent en évidence une croissance bactérienne et ne sont donc pas spécifiques. Les méthodes de décontamination et le choix des milieux de culture sont donc très importants (Shin et al., 2009). Par ailleurs, cette méthode est très coûteuse (appareil et consommables pour la culture). En outre, cette technique présente des contraintes liées à la manipulation et à l'élimination de produits radioactifs.

Aujourd'hui, de nouveaux milieux liquides n'utilisant pas de produit radioactif sont commercialisés. Ces méthodes reposent sur la détection d'un signal de fluorescence proportionnel à la quantité d'oxygène consommée dans le milieu par l'organisme en croissance (MGIT). Les premiers essais réalisés sur des prélèvements fécaux n'ont pas été satisfaisants (contaminations bactériennes et fongiques) (Anonyme, 2000).

Tableau 9 : Comparaison des résultats de la culture en fonction du type de milieu pour les bovins (Collins et al., 2005 ; Alinovi et al., 2009b ; Pithua et al., 2009)

note	Culture en milieu solide (colonies /tube)	Culture en milieu liquide (semaines)	Interprétation	Niveau d'excrétion (Map par g de fèces)
0	0	> 12	Négative	
1	1 à 9	> 8	Faiblement positive	$< 4 \times 10^3$
2	10 à 49	6 à 8	Modérément positive	$4 \times 10^3$ à $2 \times 10^4$
3	50 à 99	4 à 6	Fortement positive	$\geq 2 \times 10^4$
4	$\geq 100$	$\leq 4$	Très fortement positive	

Le niveau d'excrétion est considéré comme une mesure du stade d'infection (Collins et al., 2005) car l'excrétion est plus importante dans les stades avancés de l'infection.

Pour réduire le coût des analyses, en particulier pour les petits ruminants (Eamens et al., 2007), il est possible de réaliser des cultures sur des mélanges de fèces. Cette méthode, largement utilisée pour les bovins (Kalis et al., 2000 ; Wells et al., 2002 ; Wells et al., 2003 ; Tavornpanich et al., 2004) et les ovins (Whittington et al., 2000 ; Sergeant et al., 2002), a été testée en Australie pour les caprins (Eamens et al., 2007). Avec une culture radiométrique en milieu liquide, il est possible de détecter l'excrétion de Map par une chèvre dans un mélange de fèces de 25 chèvres. Cependant, le niveau minimum d'excrétion doit être supérieur ou égal à  $2 \times 10^4$  Map par grammes de fèces. La culture sur un mélange de fèces permet de réduire le coût des analyses de 75 à 90 % par rapport à des analyses individuelles (Eamens et al., 2007). La culture sur mélange de fèces est indiquée pour la détection des troupeaux infectés par Map (Kalis et al., 2000). Chez les ovins, cette méthode permet de détecter 93% des élevages infectés (Whittington et al., 2000). En revanche, cette méthode n'est pas adaptée à la détection des animaux infectés en vue de leur élimination (Van Schaik et al., 2007a).

Pour détecter à moindre coût, les troupeaux infectés par Map, des cultures peuvent également être réalisées sur des prélèvements issus de l'environnement (couloirs, lieu de stockage du fumier, fosses, etc, ...) (Whittington et al., 2003b ; Raizman et al., 2004 ; Berghaus et al., 2006 ; Lombard et al., 2006b ; Pillars et al., 2009). Avec ce type de prélèvements, il est aussi possible de prévoir la prévalence intra-troupeau (Raizman et al., 2004).

On considère que la limite inférieure de détection de la culture est de 100 bacilles par gramme de fèces (Chiodini et al., 1984a) ou 100 UFC par ml de lait (Giese et Ahrens, 2000). Pour les caprins, la sensibilité de la culture fécale a été estimée à 8 % (IC à 95% : 2-17) et la spécificité de la culture fécale a été estimée à 98 % (IC à 95% : 95-100) par une méthode sans Gold Standard (Kostoulas et al., 2006b). D'autres études sont nécessaires pour confirmer ces valeurs. La sensibilité de la culture fécale apparaît très faible par rapport aux résultats obtenus chez les bovins.

La culture fécale a longtemps été considérée comme la méthode de référence, mais cette caractéristique lui est aujourd'hui déniée.

### V-2-3- PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR consiste à amplifier un fragment d'ADN. La PCR cible la séquence IS900, spécifique de Map et présente en 15 à 20 exemplaires dans le génome de la bactérie. Elle comprend une étape préalable d'extraction de l'ADN, dont la réussite conditionne le résultat de la PCR

(Singh et al., 2008), puis une phase de révélation. Différents types de PCR peuvent être réalisés : classique, temps réel ou quantitative, nichée (« nested »). Seule la Reverse-transcriptase PCR pourrait permettre de conclure quant à la viabilité des cellules de Map.

Elle a été effectuée sur différents prélèvements caprins : fèces (Dimareli-Malli et al., 2009), organes (tissus) (Munjal et al., 2004 ; Singh et al., 2008 ; Dimareli-Malli et al., 2009), lait (Djonne et al., 2003 ; Munjal et al., 2004 ; Nebbia et al., 2006 ; Kumar et al., 2008), sang (Ikonomopoulos et al., 2007). Elle peut également être réalisée sur des prélèvements issus de l'environnement (Cook et Britt, 2007). Elle peut aussi être utilisée pour identifier des colonies bactériennes. C'est une méthode rapide (48 heures) et des kits sont commercialisés (LSI, Adiaçène, en France).

Les performances de la PCR sont variables selon les auteurs : la limite inférieure de détection de la PCR est de 10 bactéries par ml de lait pour certains (Grant et al., 2000 ; Stratmann et al., 2002) ou de 1000 UFC par ml de lait pour d'autres (Giese et Ahrens, 2000). La PCR permet de détecter 50 bactéries par g de fèces (Garrido et al., 2000). Elle permet également de détecter les souches difficiles à cultiver, comme par exemple certaines souches d'origine ovine (Gwozdz et al., 1997).

Sur fèces, la spécificité est bonne (de 95 à 100%) et la sensibilité est améliorée par les variantes de la technique classique, elle varie entre 72 et 100% (Gwozdz et al., 1997 ; Grant et al., 2000 ; Fang et al., 2002). Sur tissus, la sensibilité de ce test est très variable selon l'organe prélevé (Gwozdz et al., 1997) : elle est de 72% sur un échantillon de nœud lymphatique iléo-cæcal, 90 % sur un échantillon de foie et de 100% sur un échantillon d'iléum. La spécificité est très bonne (100%). La PCR manque de sensibilité sur les prélèvements de fèces et de lait en raison de la présence de substances inhibitrices (Cousins et al., 1995 ; Grant et al., 2000 ; Dimareli-Malli et al., 2009).

Une limite à l'utilisation de cette technique pour la recherche de Map est la présence de réactions faussement positives dues à l'amplification d'ADN d'autres mycobactéries possédant IS900, comme cela a été mentionné par trois équipes différentes (Cousins et al., 1995 ; Cousins et al., 1999 ; Englund et al., 2002 ; Motiwala et al., 2004). Pour pallier cette difficulté, il est possible d'associer à la PCR IS900 une confirmation par une PCR construite sur une autre séquence (F57) en cas de résultat positif (Vansnick et al., 2004). Cette séquence de 620 paires de bases, présente sous forme d'une seule copie dans le génome, semble être spécifique de Map (Poupart et al., 1993). Elle a été utilisée dans une PCR duplex qui s'est révélée capable de différencier *Mycobacterium bovis*, Maa et Map (Coetsier et al., 2000). La spécificité de l'analyse décrite par Vansnick s'est révélée très bonne, et sa sensibilité est de 1 UFC par PCR (Vansnick et al., 2004). Cette séquence a été utilisée dans une PCR en temps réel pour analyser différents prélèvements (lait, fèces, tissus, viande) et permet de détecter 10 à 100 bactéries (Tasara et Stephan, 2005 ; Bosshard et al., 2006 ; Herthnek et Bolske, 2006 ; Schonenbrucher et al., 2008 ; Mobius et al., 2008 ; Meadus et al., 2008 ; Slana et al., 2008a ; Irengé et al., 2009 ; Slana et al., 2009). Mais la principale difficulté repose sur l'absence, pour le moment, de kits commerciaux construits avec la séquence F57.

#### V-2-4- Immunohistochimie (Haines et West, 2005)

Sur des coupes d'organes (prélevés par biopsie ou le plus souvent issus d'autopsies), il est possible de mettre en évidence les agents pathogènes grâce à des réactions immunohistochimiques. On utilise des anticorps couplés à des fluorochromes ou des enzymes produisant des réactions colorées. Si le tissu prélevé contient des antigènes, ceux-ci sont mis

en évidence, soit par une réaction fluorescente (si on utilise des fluorochromes), soit par une réaction colorée (si on utilise des enzymes telles que les peroxydases). L'immuno-histochimie est une méthode rapide qui permet de détecter des agents pathogènes non viables ou difficiles à cultiver. Dans le cas de la paratuberculose, l'immuno-histochimie est une méthode précoce car Map peut être mis en évidence avant l'apparition des lésions macroscopiques (Navarro et al., 1991).

Pour la paratuberculose, 2 tests ont été utilisés sur des caprins autopsiés : un test indirect à la peroxydase (Navarro et al., 1991) et une méthode avec le complexe avidine-biotine et IgG de lapin anti-Map (Thoresen et al., 1994 ; Corpa et al., 2000b). Ces techniques peuvent également visualiser des bactéries mortes (Thoresen et al., 1994).

La qualité de ce test est liée à la qualité des anticorps utilisés.

### V - 3 - Méthodes de détection basées sur la mise en évidence des réactions immunitaires

Il s'agit de mettre en évidence les réponses immunitaires développées par l'organisme suite à l'infection par Map.

#### V-3-1- Mise en évidence des réactions immunitaires à médiation cellulaire (RIMC)

Lors de paratuberculose, la RIMC est la première à se mettre en place. Les tests cellulaires sont donc considérés comme précoces. Ils sont intéressants pendant la phase subclinique, notamment lorsque les animaux n'excrètent pas Map dans leurs matières fécales. Mais les animaux guéris peuvent présenter des réactions positives pour ces tests.

Il s'agit de mettre en évidence la mémoire immunitaire de l'animal ayant été exposé à Map. Ces techniques ne permettent pas de prévoir si l'animal présentant une réponse positive va évoluer vers une forme clinique ou, au contraire, va maîtriser le processus infectieux.

La réaction immunitaire cellulaire déclenchée par l'infection à Map comporte un volet d'hypersensibilité retardée de type IV qui peut être révélée *in vivo* ou *in vitro* par de nombreuses techniques dont le test intradermique, le test de prolifération lymphocytaire et le dosage de l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ).

#### 1 - Test intradermique (Anonyme, 2008a)

Il s'agit d'un test pratiqué *in vivo*. La mise en évidence d'une RIMC se fait par la mesure de la réaction d'hypersensibilité retardée induite par l'injection intradermique de 0,1 ml d'antigènes mycobactériens. Elle peut être simple (injection d'un antigène) ou comparative (injection de 2 antigènes). La lecture de la réaction s'effectue dans les heures qui suivent la 72<sup>ème</sup> heure après l'injection intradermique par mesure de l'épaississement du pli cutané, traduisant une réaction inflammatoire au site d'injection.

Dans le cas de la paratuberculose, un épaississement du pli de peau de plus de 4 millimètres est considéré comme une réaction positive. L'idéal est de procéder avec de la johnine (un extrait de Map), mais à défaut, une intradermo-tuberculation comparative (IDC) peut être réalisée. Celle-ci consiste à comparer l'intensité de réaction obtenue avec la tuberculine aviaire et la tuberculine bovine, administrées simultanément en deux points distincts.

La sensibilité de ce test est voisine de 50 % (Wintz, 2006). La spécificité de ce test est conditionnée par (Kalis et al., 2003) :

- le microbisme du troupeau (spécificité variant de 57,5 à 100%),
- les antigènes utilisés (92 à 95%),
- le seuil de positivité choisi (épaississement du pli de peau : spécificité à 88,8% pour une valeur > 2mm, 93,5% pour une valeur de > 4mm).

L'IDC a une spécificité faible, une réaction importante vis-à-vis de la tuberculine aviaire confirme seulement que l'animal a été en contact avec une mycobactérie appartenant au groupe avium. Il peut exister des réactions croisées entre la tuberculine aviaire et la tuberculine bovine, chez les bovins (Kormendy, 1988) et chez les caprins (Manning et al., 2003).

La tuberculation peut induire une sensibilisation des bovins qui se traduit par une réaction sérologique positive (Varges et al., 2009). C'est pourquoi il est recommandé de ne pas tester les bovins avec un test ELISA dans les 90 jours qui suivent la tuberculation.

## 2 - Test de dosage de l'IFN $\gamma$

Il s'agit d'un test réalisé *in vitro*. L'IFN $\gamma$  est une cytokine produite par les lymphocytes. Ce test mesure la quantité d'IFN $\gamma$  produit par une culture de cellules sanguines stimulées par un antigène spécifique de Map. Dans le cas d'animaux ayant été préalablement en contact avec Map, il y aura production d'IFN $\gamma$ .

Cette réaction est réalisée à partir de sang total et comprend 2 étapes : la stimulation lymphocytaire et le dosage de l'IFN $\gamma$  libéré par les lymphocytes, grâce une méthode ELISA.

Le choix des antigènes utilisés pour la stimulation des lymphocytes est déterminant. Actuellement, on utilise des extraits protéiques purifiés (PPD) de *M. avium*, *M. bovis* ou Map (johnine). Des kits de dosage de l'IFN $\gamma$  sont commercialisés. Chez les bovins (McDonald et al., 1999) et chez les caprins (Manning et al., 2003), il peut exister des réactions croisées entre le PPD avium et le PPD bovis du fait de l'existence d'antigènes communs aux 2 espèces bactériennes.

La spécificité de la réponse cellulaire contre l'antigène p40 présent chez les représentants de l'espèce *Mycobacterium avium* contenant IS901 a été démontrée (Burrells et al., 1995). Le remplacement du PPD aviaire par p40 a augmenté de manière significative la sensibilité du test de l'IFN $\gamma$  et illustre les améliorations que l'on peut obtenir en utilisant dans les tests de diagnostic des réactifs spécifiques de la sous-espèce (Stevenson et Sharp, 1997).

Ce test nécessite un traitement rapide du prélèvement (8 à 12 heures) car, pour la stimulation, les cellules doivent être viables (Robbe-Austerman et al., 2006a). Cependant Jungersen et al., (2005) ont montré que l'ajout d'une cytokine (IL-12) au prélèvement à son arrivée au laboratoire permet de réaliser la stimulation 20 heures après le prélèvement.

Ce test a été utilisé chez les caprins (Storset et al., 2001 ; Hasvold et al., 2002 ; Manning et al., 2003 ; Storset et al., 2005 ; Stewart et al., 2006) et des réactions positives précoces ont été mises en évidence : 5 semaines après une infection expérimentale (Storset et al., 2001) et 3 à 7 semaines après l'inoculation d'un vaccin vivant (Hasvold et al., 2002).

Il n'existe pas de données concernant les qualités du test de dosage de l'IFN $\gamma$  chez les caprins. Chez les bovins, les données sont très limitées. La sensibilité est comprise entre 13 et 85 % et la spécificité est comprise entre 88 et 95 %. Le test de dosage de l'IFN $\gamma$  peut présenter des faux positifs par réaction avec les mycobactéries de l'environnement (Stewart et al., 2006).

### 3 - Test de prolifération lymphocytaire

Il s'agit de mesurer la multiplication des lymphocytes T mémoires mis au contact d'un antigène de Map. Le milieu de culture contient un nucléotide radioactif (thymidine) entrant dans la composition de l'ADN et la radioactivité de l'échantillon est mesurée avec un compteur à scintillation liquide. Le résultat obtenu est comparé avec celui d'un échantillon de contrôle, n'ayant pas été stimulé par des antigènes (Storset et al., 2001). Ce test est réalisé à partir d'un prélèvement de sang.

Ce test est exclusivement réservé à la recherche, les essais sont prometteurs (Storset et al., 2001) mais aucun kit commercial n'est disponible. De plus, l'emploi de réactifs radioactifs est très contraignant pour une utilisation de ce test en routine.

#### V-3-2- Mise en évidence des réactions immunitaires à médiation humorale (RIMH)

Il s'agit de tests sérologiques, qui permettent de détecter et de doser les anticorps dirigés contre Map. Lors d'infection par Map, la réponse immunitaire à médiation humorale se met en place plus tardivement que celle à médiation cellulaire. Il existe plusieurs méthodes pour la mettre en évidence.

Longtemps très utilisée pour le diagnostic de la paratuberculose, la fixation du complément est aujourd'hui abandonnée en France, du fait de l'arrêt de la commercialisation de l'antigène.

#### 1 - L'immuno-diffusion en gélose (IDG)

Il s'agit de mettre en évidence la ligne de précipitation formée par le contact entre l'antigène de Map et l'anticorps. L'antigène utilisé est un extrait protoplasmique brut de *M. avium* 18. L'antigène est déposé dans un puits au centre de la gélose et les sérums à tester ainsi que des contrôles positif et négatif sont placés en périphérie. La boîte est mise à incuber pendant 24 à 48 h à température ambiante dans une étuve. La lecture s'effectue à l'œil nu : une réaction positive se traduit par la présence d'une ligne continue de celle obtenue avec le contrôle positif (Figure 13). C'est une réaction qualitative.



Figure 13 : Test d'immuno-diffusion en gélose (Afssa Niort)

La sensibilité du test pour les infections cliniques est 96% et sa spécificité de 94 % (Radostits et al., 2000). Pour le diagnostic d'une infection subclinique, la sensibilité de ce test a été estimée à 26,8% (Collins, 2003). Chez les caprins, la spécificité a été évaluée à 100% (Whittington et al., 2003a ; Gumber et al., 2006).

Largement utilisée dans le passé, cette méthode est progressivement abandonnée, en raison d'un manque de sensibilité et de son caractère qualitatif.

## 2 - L'ELISA

L'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) est un test immunoenzymatique. Dans le cas de la paratuberculose, il existe une étape préalable d'adsorption par un antigène de *Mycobacterium phlei*. Cette étape permet d'éliminer certains anticorps non spécifiques dirigés contre des mycobactéries et d'autres bactéries du groupe *Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia*, telles que *Corynebacterium pseudotuberculosis*, et diminue ainsi le risque de faux-positifs dus à des réactions croisées (Yokomizo et al., 1985).

Plusieurs kits utilisables chez les caprins ont été construits avec divers antigènes : bactéries entières, inactivées par la chaleur et traitées aux ultra-sons (Milner et al., 1989 ; Molina et al., 1991), PPA-3, un antigène partiellement purifié obtenu à partir de *M. avium* (Molina et al., 1991), fractions protoplasmiques (Rajukumar et al., 2001 ; Singh et al., 2007a), protéine recombinante, P35 (Shin et al., 2004), LAM (Munjal et al., 2004 ; Kaba et al., 2008), des antigènes sécrétés (Shin et al., 2008), etc..

Plusieurs kits sont disponibles dans le commerce, mais en raison de la protection du secret industriel, la nature des antigènes utilisés dans les kits n'est pas toujours précisée. Si les antigènes utilisés pour le test ELISA sont communs avec *Corynebacterium pseudotuberculosis*, le test ELISA peut induire des réactions faussement positives pour les caprins (Manning et al., 2007). Un test ELISA utilisant l'antigène LAM a été mis en oeuvre sur du lait de chèvres de statut inconnu (Munjal et al., 2004).

Une autre approche serait d'utiliser des antigènes recombinants spécifiques de Map. Jusqu'à présent un seul de ces antigènes, le peptide a362, a été décrit et utilisé dans un test ELISA (De Kesel et al., 1993 ; Gilot et al., 1993). Bien que ce test ELISA-a362 semble prometteur puisqu'il est capable de détecter des bovins infectés par Map et qu'il donne un résultat négatif pour les bovins tuberculeux, il est nécessaire de le valider à plus large échelle (De Kesel et al., 1993 ; Gilot et al., 1993 ; Vannuffel et al., 1994). L'usage d'antigènes ainsi purifiés conduit à une meilleure spécificité mais à une plus faible sensibilité (Olsen et al., 2002). Avec l'identification et l'évaluation d'autres antigènes spécifiques de Map, les tests sérologiques utilisant un mélange de ces antigènes devraient avoir une sensibilité significativement améliorée (Stevenson et Sharp, 1997).

L'ELISA peut également être réalisé sur des échantillons de lait, individuel ou de mélange (Nielsen et al., 2000). Cette méthode a été testée chez les bovins (Sweeney et al., 1994 ; Hardin et Thorne, 1996 ; Nielsen et al., 2002b ; Klausen et al., 2003 ; Collins et al., 2005 ; Hendrick et al., 2005b ; Lombard et al., 2006a ; Nielsen et Toft, 2006 ; Geisbauer et al., 2007 ; Singh et al., 2007c), les ovins et les caprins (Munjal et al., 2004 ; Salgado et al., 2005 ; Kruze et al., 2006 ; Salgado et al., 2007 ; Kumar et al., 2008). Chez les bovins, les réponses positives augmentent avec la parité mais diminuent avec le stade de lactation (Nielsen et al., 2002b). Les concentrations en anticorps sont plus élevées en début et en fin de lactation (Nielsen et al., 2002a). La corrélation entre les 2 tests ELISA est bonne (70%) (Salgado et al.,

2005). Par ailleurs, les résultats du test ELISA sur le lait sont concordants avec ceux de la culture fécale ( $\kappa=0,57$ ).

Généralement, la concordance entre les tests ELISA sur lait ou sur sérum est modérée. Cela peut s'expliquer par la quantité et la répartition des différentes classes d'immunoglobulines (Ig), en particulier les IgG (Tableau 10). Les anticorps présents dans le lait (IgG1 et IgG2) ont une origine sérique et ont une concentration inférieure dans le lait. Dans le lait et le colostrum, il y a une majorité d'IgG1 et la concentration en IgG2 est faible, tandis que dans le sérum, les concentrations en IgG1 et en IgG2 sont équivalentes. Le test ELISA réalisé sur le lait peut donc être considéré comme un test permettant de détecter les animaux excréteurs, en particulier ceux qui sont fortement excréteurs, parce qu'ils ont des taux d'anticorps supérieurs (Salgado et al., 2007).

Tableau 10 : Concentrations en immunoglobulines chez les bovins (mg/ml) (Lascelles, 1979)

	IgG1	IgG2	IgA	IgM	total
Sérum	14	13	0,39	3,8	31,19
Colostrum	40-90	2,5	4,7	5,4	52,6-102,6
Lait	0,4	0,06	0,11	0,09	0,66

Le principal avantage du test ELISA réalisé sur des prélèvements individuels de lait est lié au fait que pour les élevages adhérents au contrôle laitier, les prélèvements sont déjà disponibles. Mais, en raison de la baisse de sensibilité de l'ELISA lait, l'utilisation de ces prélèvements ne peut être intéressante que si la différence de prix des analyses est importante (Salgado et al., 2005).

Comme pour les bovins, l'ELISA sur sérum représente le test le plus évalué, le plus souvent sur des caprins « atteints » ou « infectés » (Nielsen et Toft, 2008). Chez les caprins, le test ELISA semble plus précis que pour les bovins (Tableau 11). Ce test est très utile car il a toujours une sensibilité élevée quel que soit le statut des animaux, mais avec une sensibilité supérieure pour les animaux en phase clinique. La spécificité d'un test commercial a été évaluée en Australie sur des caprins indemnes de paratuberculose (Whittington et al., 2003a) : elle était comprise entre 99,7 et 99,8%.

Tableau 11 : Qualité du test ELISA chez les caprins (d'après Nielsen et Toft, 2008)

	atteints	infectés
Sensibilité (%)	82 – 100	63-84
Spécificité (%)		79-100

Pour le lait, la qualité du test ELISA dépend du type de prélèvement. Pour des laits individuels, la sensibilité est comprise entre 21 et 97,1 %, et la spécificité est comprise entre 80 et 99,8 %. Pour des laits de tank, la sensibilité est comprise entre 60 et 97,1 %, et la spécificité est comprise entre 83,3 et 99,3 % (Slana et al., 2008b).

Pour les caprins (tous stades confondus), par comparaison avec la culture fécale, l'ELISA lait a une sensibilité inférieure à celle de l'ELISA sur sérum (48 % versus 64 %), mais les spécificités sont identiques (100 % pour les 2 tests) (Salgado et al., 2005). Pour des chèvres chiliennes (Salgado et al., 2007), les valeurs sont légèrement différentes : les sensibilités sont de 74 % et 60 %, respectivement pour l'ELISA sur sérum et l'ELISA lait, tandis que les spécificités sont respectivement de 98,6% et 99,3 %.

Le test ELISA est le plus utilisé pour l'analyse de troupeau du fait de la réalisation aisée du prélèvement, des possibilités d'automatisation, de la rapidité de l'analyse au laboratoire et du faible coût (Anonyme, 2000).

L'ELISA est aujourd'hui la méthode ayant le meilleur rapport spécificité/sensibilité. En outre, la présence d'anticorps indique la probable incapacité de l'organisme à juguler l'infection par la réponse cellulaire et constitue la preuve de l'extension des lésions. Les animaux séropositifs ont donc un rôle épidémiologique important, et s'ils ne le sont pas déjà, deviendront excréteurs (Vialard, 2002).

#### V - 4 - Limites des tests de diagnostic

La qualité d'un test est déterminée par sa spécificité et sa sensibilité par rapport à un test de référence. Le choix du test de référence est important. Pour la paratuberculose, il n'existe pas de Gold Standard et plusieurs tests de référence ont été utilisés dans la littérature (l'expression clinique, l'excrétion fécale, la culture à partir de tissus ou l'histologie), ce qui rend difficile la comparaison des résultats obtenus. Pour évaluer la qualité des tests, il est donc important de définir l'état que l'on veut diagnostiquer et l'objectif du diagnostic (Nielsen et Toft, 2008).

Il existe des méthodes qui permettent d'estimer les qualités d'un test en l'absence de Gold Standard ; ce sont les méthodes statistiques avec « latent class », dans lesquelles le statut est considéré comme existant mais non défini. Ces méthodes sont particulièrement adaptées pour la paratuberculose (Branscum et al., 2005).

Selon Nielsen et Toft (2008), un test « idéal » d'évaluation devrait reposer sur une étude longitudinale menée pendant toute la vie des animaux étudiés. Ces animaux devraient être testés régulièrement avec une méthode directe (telle que la culture fécale), un test de détection des réactions immunitaires à médiation cellulaire (tel que le test de dosage de l'IFN $\gamma$ ) et un test de détection des anticorps (tel que l'ELISA). Finalement, une analyse post-mortem devrait être réalisée par histopathologie d'une centaine de tissus par animal, pour déterminer le statut infectieux de chaque animal. De telles études sont longues et coûteuses.

Devant les difficultés rencontrées pour évaluer la qualité d'un test, Nielsen et Toft (2009) ont défini les conditions à remplir :

- étude « observationnelle » avec une population d'étude représentative de la population cible (pour la durée d'incubation, les doses d'exposition et la distribution des âges).

- la population de référence doit être définie en fonction de l'objectif du test, à la fois pour le calcul de la sensibilité et le calcul de la spécificité (même origine géographique). Une solution alternative consiste à utiliser les méthodes sans Gold Standard (« latent class »).

- définir une taille d'échantillon qui tienne compte de la précision souhaitée.

Il est nécessaire de conduire des évaluations bien planifiées des tests de diagnostic mais cela est rendu difficile pour la paratuberculose en raison de l'évolution lente de l'infection et l'absence de tests de référence qui peuvent induire des biais. Les méthodes d'analyses sans Gold Standard, telles que les méthodes bayésiennes, constituent une alternative (Branscum et al., 2005).

Les limites des tests de diagnostic tiennent aux tests et à la physiopathologie de l'infection (Anonyme, 2009a) :

- difficultés d'évaluation des performances intrinsèques des tests

Les outils actuellement disponibles pour le dépistage et le diagnostic de la paratuberculose sont souvent peu sensibles et certains sont parfois peu spécifiques.

- conséquences de la physiopathologie sur le diagnostic

Il est essentiel de comprendre que les tests directs et indirects utilisables pour la paratuberculose n'explorent pas des événements synchrones. L'intermittence de la présence de Map dans les fèces et les fluctuations des taux d'anticorps couplées aux limites intrinsèques des tests contribuent à créer une multiplicité de situations, tant à l'échelle individuelle que collective, souvent assimilées à tort à des incohérences entre les méthodes d'analyses.

Ainsi, une réponse négative à un test ne signifie pas que l'animal est indemne d'infection mais que l'échantillon collecté ne contient pas l'analyte recherché (bactérie ou anticorps selon les cas) (Manning et Collins, 2001).

#### V - 5 - Utilisation des différents tests

Les tests présentent des défaillances au niveau individuel. Mais l'association de plusieurs tests reposant sur des principes différents (tests directs et indirects) permet d'améliorer leurs performances (Manning et al., 2003 ; Ellis et al., 1998). De même, la détection des troupeaux infectés est plus facile car elle repose sur la détection d'au moins 1 animal avec une réponse positive.

Il est très difficile d'apporter la preuve de l'absence d'infection dans un troupeau à cause de la longueur de la période d'incubation et de la phase sub-clinique et à cause de la faible sensibilité des tests de diagnostic, en particulier pour les animaux au stade sub-clinique (Ellis et al., 1998). La détermination de l'absence d'infection repose sur l'absence de signes cliniques pendant plusieurs années, une surveillance des mouvements et des tests répétés (Ellis et al., 1998).

Le choix d'un test dépend de l'état que l'on veut identifier. Il dépend aussi des qualités du test et de facteurs tels que son coût ou la rapidité d'obtention du résultat (Tableau 12). Ainsi, dans le cadre de l'élimination des animaux infectés, un test précis mais long (comme par exemple la culture fécale) pourra être moins intéressant que l'ELISA qui est rapide et peu coûteux, malgré l'imprécision de ce dernier.

Tableau 12 : Caractéristiques des principales techniques de diagnostic de la paratuberculose (d'après Anonyme, 2009a)

	Scopie (ZN)	culture	PCR	IDC	IFN	ELISA
Principe	Mise en évidence de la bactérie par coloration	Mise en évidence de la bactérie par culture	Mise en évidence du génome	Mise en évidence in vivo de RIMC	Mise en évidence in vitro de RIMC	Mise en évidence des anticorps
Spécificité	+ /+++	+++	+++	+/-	+/-	+++
Sensibilité	+	++	++	+	+/-	++
Prélèvements	Fèces, tissus	Fèces, tissus, lait, environnement	Fèces, tissus, lait, environnement		Sang	Sérum, lait
Coût	+	+++	+++	++	+++	++
Temps	24 h	8-12 semaines	48 h	72 h	48 h	24 h
Influence de la vaccination	Oui potentielle (réduction de l'excrétion)	Oui potentielle (réduction de l'excrétion)	Oui potentielle (réduction de l'excrétion)	Oui (réactions croisées)	Oui (réactions croisées)	Oui (réactions croisées)
Statut	Atteints, infectieux, infectés	Atteints, infectieux, infectés	Atteints, infectieux, infectés	Atteints, infectieux, infectés, exposés	Atteints, infectieux, infectés, exposés	Atteints, infectieux, infectés
Stade d'infection détecté	tous	tous	tous	début	début	milieu, fin
Diagnostic	oui	oui	oui	non	non	oui
Dépistage	non	oui	oui	non	non	oui
Certification	oui	oui	oui	non	non	oui

## **VI - Mesures de maîtrise de l'infection**

La mise en œuvre d'un programme de lutte s'appuie sur la détection des animaux infectés auxquels différentes mesures de maîtrise de l'infection peuvent être appliquées, en fonction des objectifs et des moyens consacrés. Les mesures de maîtrise peuvent être de deux ordres : médicales et sanitaires.

### **VI - 1 - Mesures médicales de maîtrise**

Même si le traitement de la paratuberculose est théoriquement possible par l'utilisation d'antibiotiques, il n'est jamais mis en œuvre car il constitue un non-sens économique (Anonyme, 2000).

Les mesures médicales de maîtrise de l'infection reposent sur la vaccination. Il s'agit en réalité d'une immunité de prémunition (infection latente, pendant laquelle aucune réinfection ne peut se produire) : l'inoculation de Map par voie sous-cutanée, provoque la constitution d'un foyer réactionnel primaire, capable de stimuler l'immunité (Vialard, 2000).

#### **VI-1-1- Différents vaccins (Thorel et Delcroix, 2002)**

Les vaccins sont constitués par des cultures bactériennes. Les antigènes responsables de l'immunité ne sont pas clairement définis. Pour l'avenir, on peut espérer le développement de vaccins basés sur des antigènes immunodominants et protecteurs (Rosseels et Huygen, 2008). L'immunisation des animaux avec des protéines recombinantes ou avec des vaccins à ADN codant pour des antigènes immunogènes serait une méthode idéale pour limiter les effets des vaccins constitués de bactéries entières. Des travaux sont en cours pour étudier des antigènes d'intérêt (Rosseels et Huygen, 2008 ; Kathaperumal et al., 2009).

Il existe deux types de vaccins, des vaccins inactivés et des vaccins vivants (Tableau 13 et Tableau 14), qui diffèrent, d'une part, par la taille et la structure des antigènes vaccinaux, d'autre part, par la présentation de ces antigènes au système immunitaire. Le traitement par la chaleur utilisé dans les vaccins inactivés dégrade les antigènes protéiques et libère des antigènes de haut poids moléculaire. D'autre part, dans les vaccins vivants, les bacilles ont la capacité d'infecter les macrophages et d'induire des réactions immunitaires différentes de celles induites par des antigènes provenant de l'extérieur de la cellule. En revanche, dans les vaccins tués, les bacilles ne risquent pas de redevenir virulents. Un vaccin contenant Map avec des parois altérées a été testé chez les caprins (Hines et al., 2007a) avec des résultats comparables à ceux obtenus avec des vaccins avec des bactéries entières.

Tableau 13 : Description des principaux vaccins inactivés

Nom déposé	Mycopar	ID-Lelystad	Gudair	Silirum
Laboratoire producteur (Pays)	Fort Dodge Animal Health (Etats-Unis)	ID-Lelystad (Pays-bas)	CZ Veterinaria (Espagne)	CZ Veterinaria (Espagne)
Mode d'inactivation		chaleur	chaleur	chaleur
Souches utilisées	M. avium Strain 18	Strain IDLelystad	Map 316F	Map 316F
Charge antigénique			2,5 mg de micro-organismes/ml	2,5 mg de micro-organismes/ml
Nature de l'adjuvant	Huile minérale	Emulsion eau-huile	Huile minérale	Huile minérale hautement raffinée
Espèces concernées	Bovins	Bovins	Ovins et caprins	Bovins
Schéma posologique	Moins de 30 j 0,5 ml en SC		2-3 semaines à 6 mois 1 ml en SC	1 semaine 1 ml en SC

Tableau 14 : Description des principaux vaccins vivants

Nom déposé	Neo Parasec	AquaVax	Paratuberculose vaksine	Weybridge
Laboratoire producteur (Pays)	Mérial (France)	Disease Research Laboratory (Nouvelle – Zélande)	National Veterinary Institute (Norvège)	Weybridge VLA (Royaume Uni)
Souches utilisées	Map 316F	Map 316F	Map 2E et Map 316F	Map 2E
Charge antigénique	3 x 10 <sup>9</sup> unités viables/ml	1 x 10 <sup>8</sup> UFC/ml		
Nature de l'adjuvant	Huile minérale	Suspension aqueuse	Huile d'olive, paraffine, poudre de pierre ponce	Paraffine et poudre de pierre ponce
Espèces concernées	Bovins, Ovins, Caprins	Ovins		Bovins, Ovins, Caprins
Schéma posologique	Avant 1 mois Bovins : 2 ml Ovins et caprins : 1 ml en SC	1 ml en SC Rappel 1 mois après	Caprins 1 ml en SC	Bovins : 1,5 ml Ovins et caprins : 0,75 ml en SC

Depuis l'arrêt de la commercialisation du vaccin Neo Parasec en 2001 et du vaccin Weybridge en 2005, seuls 2 vaccins sont utilisés dans le monde : le vaccin Mycopar pour les bovins et le vaccin Gudair pour les petits ruminants. Le vaccin Silirum est testé chez les bovins en Australie. Actuellement, aucun vaccin anti-paratuberculeux n'est commercialisé en

France. Néanmoins, des autorisations d'importation du vaccin espagnol (Gudair) sont accordées pour les petits ruminants depuis mars 2009 par l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire.

#### VI-1-2- Protocole vaccinal

La vaccination est utilisée dans les troupeaux infectés (Chiodini, 1996). A l'exception du vaccin Aquavax, une injection unique du vaccin est préconisée. La vaccination est généralement pratiquée chez les caprins pendant les premières semaines de vie (Saxegaard et Fodstad, 1985). La vaccination a également été pratiquée sur des brebis et des chèvres adultes avec des résultats comparables (Sigurdsson, 1960 ; Crowther et al., 1976 ; Corpa et al., 2000c). Pour le vaccin Gudair, la vaccination peut également être pratiquée sur les adultes.

En France, la réglementation relative à la tuberculose bovine et caprine, limite l'usage de la vaccination anti-paratuberculeuse aux animaux de moins de 1 mois (Arrêté ministériel du 15 septembre 2003, article 37).

L'influence de l'âge à la vaccination a été étudiée (Corpa et al., 2000a) chez les caprins avec le vaccin Gudair. Il a été démontré que la vaccination des animaux de 5 mois induisait une meilleure réponse immunitaire (cellulaire et humorale) que la vaccination des animaux de 15 jours.

#### VI-1-3- Conséquences de la vaccination

Garcia-Marin et al. (1999) ont montré que les réactions immunitaires obtenues suite à la vaccination par un vaccin vivant (Neo Parasec) ou un vaccin inactivé (Gudair) étaient identiques chez les caprins : la production d'anticorps est maximale entre 60 et 120 jours après la vaccination, et la production d'IFN $\gamma$  a tendance à augmenter au cours du temps.

##### 1 – Avantages

Un consensus existe sur plusieurs points (Thorel et Delcroix, 2002). Quelle que soit la nature du vaccin (vivant ou inactivé), la vaccination :

- réduit le nombre de caprins exprimant cliniquement la maladie (Saxegaard et Fodstad, 1985 ; Marly et al., 1988 ; Leslie et al., 1988), et réduit la mortalité des caprins (Singh et al., 2007b).

- diminue le nombre de caprins excréteurs et le niveau de l'excrétion (Saxegaard et Fodstad, 1985 ; Marly et al., 1988 ; Leslie et al., 1988 ; Singh et al., 2007b). Les effets sont visibles au bout de plusieurs années, mais la vaccination d'animaux adultes permet d'obtenir plus rapidement des résultats (Crowther et al., 1976, pour les ovins ; Benedictus et al., 1988, pour les bovins ; Corpa et al., 2000c, pour les caprins).

- modifie l'évolution des lésions, avec une prédominance des lésions tuberculoïdes paucibacillaires. Ce phénomène a été observé chez les ovins (Juste et al., 1994) et chez les caprins (Singh et al., 2007b).

##### 2 – Inconvénients

Quel que soit le type de vaccin, différents inconvénients sont observés.

#### Interférences avec le dépistage des animaux infectés

La vaccination n'empêche pas l'infection mais réduit l'excrétion chez les caprins (Djonne, 2003) et diminue le nombre de caprins infectés (Saxegaard et Fodstad, 1985 ; Marly et al.,

1988 ; Leslie et al., 1988). L'excrétion devient donc plus difficile à mettre en évidence, tout comme la détection des animaux excréteurs. Les animaux vaccinés ne doivent pas être considérés comme indemnes de paratuberculose et les troupeaux vaccinés doivent être considérés comme des troupeaux infectés (Anonyme, 2000). La vaccination n'a pas d'effet sur l'excrétion de Map dans le lait (Djonne et al., 2003) : Map a été détecté par PCR dans des prélèvements individuels de lait chez 7 % des caprins vaccinés et chez 7,5% des caprins non vaccinés. Chez les chèvres vaccinées, la plupart des résultats positifs sont observés chez des animaux de plus de 4 ans.

Les animaux vaccinés présentent des réactions immunitaires, tant cellulaires qu'humorales, et répondent donc positivement aux tests de diagnostic de la paratuberculose chez les ovins (Kormendy, 1994 ; Spangler et al., 1991 ; Corpa et al., 2000a) et chez les caprins (Corpa et al., 2000a ; Hasvold et al., 2002 ; Singh et al., 2007b).

Les cinétiques des réponses sont variables selon les auteurs. Garcia-Marin et al. (1999) ont observé une production d'IFN $\gamma$  croissante tandis que Corpa et al. (2000a) ont observé une production maximale 30 jours après la vaccination puis une production décroissante. Pour Singh et al. (2007b), avec un vaccin inactivé, les réactions immunitaires à médiation cellulaire sont présentes entre 30 et 275 jours après la vaccination.

Les réponses sérologiques présentent un pic. Celui-ci se situe 30 jours après la vaccination (Corpa et al., 2000a) ou entre 60 et 120 jours (Garcia-Marin et al., 1999). Certains caprins vaccinés avec un vaccin tué présentent une forte réponse IFN $\gamma$  à l'âge de 6-8 ans (Storset et al., 2005) alors que la vaccination avec un vaccin vivant induit des réponses plus rapides (6 mois) (Hasvold et al., 2002 ; Valheim et al., 2002b). Pour Singh et al. (2007b), tous les caprins vaccinés produisent des anticorps à partir de 60 jours après la vaccination.

La production d'anticorps des chevreaux vaccinés reste supérieure à celle des chevreaux non vaccinés (Corpa et al., 2000a ; Singh et al., 2007b). Avec un vaccin vivant, les réponses sérologiques persistent plus longtemps (Garcia-Marin et al., 1999).

#### Interférences avec le dépistage de la tuberculose

La vaccination affecte également le dépistage de la tuberculose par intra-dermoréaction car elle sensibilise les animaux à la tuberculine bovine et à la tuberculine aviaire (Larsen et al., 1978), mais les réactions au PPD bovin sont plus faibles que les réactions au PPD avium (Garcia-Marin et al., 1999). Cela limite l'utilisation de la vaccination dans les régions non indemnes de tuberculose (Anonyme, 2000).

#### Tolérance au point d'injection

La vaccination entraîne le développement d'un nodule fibrocaséux persistant au point d'inoculation. Il apparaît entre 15 et 30 jours après l'injection chez 100% des animaux (ovins et caprins) avec un vaccin tué et persiste jusqu'à 1,5 ans après la vaccination (Garcia-Marin et al., 1999 ; Corpa et al., 2000a). L'ulcération est possible. La taille du nodule est considérée comme un témoin de l'efficacité de la vaccination (Garcia-Marin et al., 1999).

L'injection accidentelle à l'homme provoque le même type de réaction (Kennedy et Tetlow, 2008). Les vaccins doivent donc être manipulés avec précaution.

Un vaccin contenant une protéine recombinante de Map (Hsp70) a été récemment testé chez les bovins (Koets et al., 2006 ; Santema et al., 2009) : ce vaccin réduit significativement l'excrétion fécale de Map et n'interfère pas avec le diagnostic de la tuberculose. De plus, il est possible de distinguer les animaux vaccinés des animaux non-vaccinés lors du dépistage sérologique de la paratuberculose.

L'efficacité de la vaccination est parfois discutée mais elle semble être le meilleur moyen de contrôler l'infection et de limiter les pertes économiques (Anonyme, 2000).

En résumé, elle paraît être un outil intéressant pour la maîtrise de l'infection par Map chez les caprins, notamment dans les cheptels à forte prévalence, mais elle ne doit pas être considérée comme la solution unique au problème des troupeaux touchés par cette affection (Anonyme, 2009a), et des mesures sanitaires doivent lui être associées.

## VI - 2 - Mesures sanitaires de maîtrise

Pour les troupeaux présumés indemnes, la paratuberculose étant considérée comme une « maladie qui s'achète », il faut éviter d'introduire des animaux. Les tests de diagnostic individuels ne sont pas assez précis pour garantir le caractère indemne d'un animal (Anonyme, 2000). La faible sensibilité des tests rend nécessaire la répétition des tests, en particulier pour dépister les animaux ou les troupeaux indemnes (Anonyme, 2000).

Pour les troupeaux atteints, les plans de lutte cherchent d'abord à maîtriser l'infection en faisant disparaître les signes cliniques et en diminuant l'excrétion (Anonyme, 2000). L'éradication de la maladie est un objectif à plus long terme.

La prévention repose principalement sur le contrôle de la transmission oro-fécale et s'appuie sur 2 piliers : diminuer la contamination du milieu et protéger les jeunes animaux (Stehman, 1996).

### VI-2-1- Diminution de la contamination du milieu

#### 1 – Action sur les animaux

Plusieurs actions doivent être mises en place :

- éliminer le plus rapidement possible les animaux atteints de paratuberculose clinique (excrétion massive de Map),

- détecter et isoler les animaux infectés. La répétition des tests individuels peut s'avérer coûteuse dans les grands troupeaux et peut constituer un obstacle pour une surveillance régulière de l'infection. Par ailleurs, cette pratique peut être limitée par la faible valeur individuelle des chèvres (Salgado et al., 2005 ; Salgado et al., 2007) et par la faible valeur des chèvres de réforme (Anonyme, 2000).

#### 2 – Action sur les locaux et le matériel

Les locaux et le matériel destinés aux jeunes doivent être nettoyés et désinfectés régulièrement avec des produits tuberculocides, comme par exemple l'eau de Javel à 1° chlorométrique. Par ailleurs, sont réputés efficaces le formol à 5%, le crésyl à 10% et le sulfate de cuivre à 5%. Ces données déjà anciennes mériteraient de faire l'objet d'une vérification à l'aide des techniques actuellement disponibles (Anonyme, 2009a).

Les auges et les abreuvoirs doivent être disposés de façon à éviter la contamination par les fèces.

#### 3 - Action sur les fumiers

Le fumier doit être stocké en dehors des zones de pâturage et des points d'eau. Une stérilisation du fumier peut être obtenue en le laissant en tas sans manipulation pendant 1 an

(Vialard, 2000). Le compostage semble être une méthode efficace pour détruire Map (Grewal et al., 2006).

#### 4 - Action sur les pâtures

Après passage d'animaux infectés par Map, les pâtures doivent être considérées comme une source d'infection pendant au moins 1 an (Manning et Collins, 2001). Pour limiter la contamination des pâtures, il faut diminuer la charge et procéder à des rotations fréquentes (Stehman, 1996). Un chaulage des terres acides (pH <6) peut être pratiqué pour limiter la durée de survie du bacille. Certaines pratiques agronomiques ont été recommandées pour assainir les pâtures, telles que l'utilisation de cyanamide calcique ou de sulfate de fer neige (Vialard, 2000) mais leur impact sur la survie de Map n'a pas toujours été validé (Anonyme, 2009a).

#### VI-2-2- Protection des jeunes

Plusieurs recommandations ont été édictées :

- séparer les jeunes et les mères, dès la naissance. Cependant, la transmission *in utero* est possible et les chevreaux peuvent être contaminés avant la naissance.
- éviter le contact avec des aliments ou du matériel (bottes, fourches, ...) souillés par des matières fécales. Généralement, les chevrettes de renouvellement sont nourries avec du lait artificiel. Mais, la distribution de colostrum constitue un point critique. En effet, dans les troupeaux caprins intensifs, le colostrum de mélange, constitué à partir du colostrum de plusieurs chèvres, est fréquemment utilisé. Cette pratique augmente le risque d'exposition des jeunes bovins (Streeter et al., 1995 ; Nielsen et al., 2008) et peut contaminer l'ensemble des animaux de renouvellement. Cette pratique est d'autant plus risquée que les traitements thermiques réalisés à la ferme (congélation, thermisation 56°C-60 min) ne permettent pas de détruire Map (Vialard, 2000 ; Lambeth et al., 2004).

Dans le cas de la maîtrise de la paratuberculose, la distribution d'un colostrum de mélange, même traité thermiquement, doit être abandonnée. Il faut préférer une distribution individuelle (Casamitjana et Vialard, 2002 ; Nielsen et al., 2008), en empêchant le chevreau de téter directement sa mère, car les trayons peuvent être souillés par des matières fécales. La distribution individuelle est donc réalisée au biberon en trayant les chèvres (de préférence séro-négatives) après nettoyage de la mamelle (Casamitjana et Vialard, 2002), mais cette dernière solution peut être très contraignante, en particulier dans les grands troupeaux. Une solution alternative peut reposer sur l'utilisation de colostrum artificiel. Ainsi, une étude réalisée dans 12 troupeaux bovins naturellement infectés par Map (Pithua et al., 2009) a montré que les veaux nourris à la naissance avec un substitut de colostrum avaient moins de risque d'être infectés par Map, que des veaux nourris avec le colostrum maternel. L'inconvénient principal des substituts de colostrum est que les immunoglobulines apportées au jeune risquent de ne pas être adaptées au microbisme de l'élevage.

Pour tenir compte du risque de transmission *in utero* et par le colostrum, il ne faudrait pas conserver pour le renouvellement les jeunes issus de mères malades ou infectées.

Gezon et al (1988) ont montré qu'au bout de 7 ans, il était possible d'éliminer l'infection par Map dans un troupeau caprin grâce un programme strict. Le plan de lutte doit être adapté à chaque élevage. Pour qu'il soit efficace, il faut s'assurer qu'il soit applicable. Rossiter et Burhans (1996) ont proposé un plan en 7 points :

- recensement des informations concernant l'exploitation (productions, pratiques d'élevage, ressources, autres pathologies),
- recensement de l'historique et de la prévalence de la maladie (mortalité, morbidité, résultats aux tests, description des cas, contrôles de performances, achats, ...),
- identification des facteurs de risque de transmission spécifiques à l'exploitation (passés et présents),
- analyse des possibilités de contrôle de ces facteurs de risque (en fonction de leur impact, des ressources disponibles et de leur efficacité),
- définition des objectifs du contrôle et des délais,
- définition de l'intensité du contrôle (en fonction de la situation initiale, des objectifs et des délais),
- planification, exécution (partenariat vétérinaire-éleveur) et évaluation (faisabilité, efficacité) à intervalles réguliers du plan.

### VI - 3 - Organisation collective de la lutte

Pour des raisons pragmatiques, dans la pratique de la lutte contre la paratuberculose au plan d'une collectivité (département ou région) ou d'une filière, trois types de troupeaux sont distingués (Anonyme, 2009a) :

- les troupeaux cliniquement atteints, c'est-à-dire des troupeaux dans lesquels des animaux atteints sont recensés avec une fréquence variable dans le temps,
- les troupeaux apparemment sains, c'est-à-dire des troupeaux dans lesquels l'infection n'a pas été mise en évidence compte-tenu des outils de dépistages utilisés,
- tous les autres troupeaux se situant entre les deux extrêmes précédemment décrits, pour lesquels aucune mesure de lutte organisée n'est proposée en l'absence d'investigations spécifiques vis-à-vis de la paratuberculose.

Au niveau d'une région ou d'un pays, le plan de contrôle de l'infection par Map (Nielsen et Toft, 2009) se traduit par :

- une protection et une surveillance des troupeaux indemnes (stratégie défensive),
- une éradication pour les troupeaux faiblement infectés, avec application uniquement de mesures sanitaires,
- une maîtrise de l'infection pour les troupeaux fortement infectés, avec application de mesures médicales et sanitaires, avec comme premier objectif de faire disparaître les signes cliniques.

La mise en place de plans de lutte contre la paratuberculose clinique apparaît pleinement justifiée et l'expérience acquise depuis de nombreuses années, tant en France qu'à l'étranger, apporte de multiples preuves de l'efficacité de cette démarche dans les troupeaux bovins laitiers, reposant principalement sur des mesures sanitaires. Mais les résultats sont généralement acquis au bout de plusieurs années.

La vaccination reste un outil complémentaire intéressant pour la plupart des troupeaux ovins et caprins qui sont dans l'impossibilité technique ou économique de mettre en place une prophylaxie exclusivement sanitaire (Anonyme, 2000 ; Anonyme, 2009a).

## **D - POTENTIEL ZOONOTIQUE**

Depuis une vingtaine d'années, l'agent étiologique de la paratuberculose des ruminants, Map, est régulièrement mis en cause - ainsi que d'autres agents - dans le développement de la maladie de Crohn (MC) chez l'homme.

### **I - Description de la maladie de Crohn**

La maladie de Crohn (MC) fait partie des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI). Elle est caractérisée par l'alternance de phases de rémission qui peuvent être très longues, pendant laquelle la maladie est inactive, et de rechutes plus ou moins sévères, nécessitant une ou plusieurs interventions chirurgicales chez une grande proportion de patients (Klein, 2006). C'est donc une maladie socialement très invalidante. Elle affecte surtout les jeunes adultes (entre 15 et 24 ans) (Anonyme, 2000).

L'étiologie de la maladie de Crohn est inconnue, même si l'on admet généralement qu'elle est complexe et multifactorielle. L'hypothèse consensuelle actuelle est que des bactéries intestinales (agents infectieux persistants ou flore digestive normale) interagissent avec des facteurs endogènes, chez des individus génétiquement prédisposés (mutation du gène CARD15/NOD2), pour causer une réponse immunitaire excessive au niveau des muqueuses à l'origine des lésions inflammatoires et/ou des défauts de l'intégrité de la barrière intestinale (Klein, 2006).

La nature de ces bactéries reste toutefois sujette à débat. Pour beaucoup d'auteurs, la flore normale endogène (présente chez tout individu) serait seule responsable de la maladie et les lésions seraient induites par un déséquilibre de cette flore sous l'effet de facteurs exogènes (par exemple certains traitements), les changements de régime alimentaire induits par les nouveaux modes d'alimentation ou la disparition des parasites intraluminaux.

Pour d'autres auteurs, des bactéries relativement spécifiques et rencontrées de façon occasionnelle par un hôte prédisposé, auraient un rôle essentiel dans l'initialisation des lésions. Parmi ces bactéries, les candidates les plus étudiées sont *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* adhérent et invasif (souche LF402), *Yersinia* entéropathogènes et Map. Pour chacune de ces bactéries, leur rôle est suspecté sur des faisceaux d'arguments associant de façon variée des données épidémiologiques, cliniques, bactériologiques et immunogénétiques. Pour aucune de ces bactéries un lien de causalité n'a pu être formellement établi (Anonyme, 2009a).

### **II - Relation avec Map**

Depuis sa description, des similitudes anatomo-cliniques frappantes ont été notées entre la MC et les infections à mycobactéries (Chiodini, 1989 ; Greenstein, 2003). L'hypothèse d'une infection à *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map) à l'origine de la MC a été réactivée en 1984 quand Chiodini et al. ont réussi à cultiver chez trois patients atteints de MC des bactéries identiques en apparence à Map (Chiodini et al., 1984b). De plus, certains essais thérapeutiques testant les antibiotiques anti-mycobactéries pour le traitement de la MC ont donné des résultats positifs, ce qui a renforcé cette hypothèse (Autschbach et al., 2005). Cependant, cette hypothèse a été fortement contestée ultérieurement. En effet, Map a été détecté par PCR IS900 chez environ 30% des patients atteints de MC, mais aussi chez des individus sains (Anonyme, 2000).

Les données épidémiologiques concernant les 2 maladies sont insuffisantes pour comparer l'incidence et la prévalence ainsi que pour déterminer une relation épidémiologique (Anonyme, 2000). Une étude épidémiologique sur la relation entre le milieu agricole et la

maladie de Crohn confirme l'impression générale d'une prévalence de la maladie de Crohn plus importante en milieu urbain qu'en milieu rural (Cucino et Sonnenberg, 2001). Ce fait n'est pas en faveur d'une cause mycobactérienne de la maladie de Crohn, à moins que l'exposition précoce à Map ne joue un rôle protecteur vis-à-vis du développement ultérieur de la maladie.

Enfin, une étude qualitative systématique de la littérature réalisée récemment (Waddell et al., 2008) n'a pas permis d'établir des preuves concluantes du potentiel zoonotique de Map.

En conclusion, malgré les similitudes anatomo-cliniques existantes entre paratuberculose et MC et les associations rapportées entre Map et MC, le lien de causalité formelle entre Map et MC demeure à ce jour non démontré. L'ensemble des connaissances disponibles permettent d'écarter un lien de causalité de type pasteurien, où Map serait la condition nécessaire et suffisante pour entraîner la MC, celle-ci paraissant être le résultat de la conjonction de différents facteurs, les uns propres à l'homme, les autres à son environnement.

### **III - Exposition de l'Homme**

Il s'agit d'examiner comment l'homme peut être infecté par Map (Anonyme, 2000).

#### **III - 1 - Sources de Map pour l'homme**

Théoriquement, les humains pourraient entrer en contact avec la bactérie par contact direct avec d'autres humains ou des animaux, ou indirectement, par la nourriture.

##### **III-1-1- Sources non alimentaires**

La principale source de contamination pourrait être les fèces d'animaux atteints de paratuberculose. Les niveaux d'excrétion de la bactérie peuvent atteindre jusqu'à  $10^8$  bactéries par gramme de fèces (Chiodini et al., 1984a). Les professionnels en contact avec des animaux atteints sont donc exposés à une grande quantité de bacilles. Cependant, bien que l'on manque d'études épidémiologiques à grande échelle, une incidence élevée de la MC n'a pas été rapportée dans ces professions (Anonyme, 2000).

##### **III-1-2- Sources alimentaires**

Les fèces d'animaux peuvent contaminer l'environnement, en particulier l'eau et les cultures, d'autant que la bactérie est considérée comme très résistante dans le milieu extérieur.

Différentes études ont montré la présence de Map dans de l'eau potable ou dans de l'eau destinée à la consommation (Pickup et al., 2005 ; Grant, 2005). Une étude conduite en République Tchèque a montré que Map pouvait être présent dans les tiges, les feuilles et les fruits de tomates, radis et salades ayant poussé sur un sol contaminé par l'utilisation de fumier (Pavlik et al., 2002).

Les denrées alimentaires d'origine animales (lait, viande) peuvent également contenir Map (Eltholth et al., 2009).

Il a été montré que le lait de femelles infectées (bovins, ovins et caprins) pouvait contenir Map (cf partie épidémiologie), mais le lait de tank peut également être contaminé par les fèces d'animaux excréteurs. Le lait de tank issu de petits ruminants semble moins fréquemment contaminé que le lait de vache, en raison probablement de la consistance des matières fécales (Grant, 2003). Des études menées en Grande-Bretagne et en Suisse ont identifié la présence

de Map par PCR dans respectivement 1% et 23 % des laits de tank caprins (Grant et al., 2001 ; Muehlherr et al., 2003). En Norvège, à partir de prélèvements de laits individuels, Map a été identifié par PCR dans 7 % des troupeaux caprins, sans que la bactérie ne puisse être cultivée (Djonne et al., 2003).

La viande peut également être une source de Map, soit par diffusion de la bactérie dans différents tissus ou nœuds lymphatiques lors des phases disséminées (Nelli et al., 2008), soit suite à la contamination fécale des carcasses (Meadus et al., 2008 ; Alonso-Hearn et al., 2009 ; Eltholth et al., 2009).

Au regard des quantités d'aliment consommées et de la charge bactérienne respective supposée du lait et de la viande, le niveau d'exposition entraîné par la viande semble moins important que celui dû aux produits laitiers (Meadus et al., 2008).

### III - 2 - Influence des traitements

#### III-2-1- Traitements de l'eau

Map est relativement résistant à la chloration et les données sur l'effet des autres traitements manquent (Whan et al., 2001).

#### III-2-2- Traitements du lait

Plusieurs équipes ont recherché la présence de Map dans du lait pasteurisé vendu chez les détaillants (Cerf et Griffiths, 2000 ; Grant, 2003). Map a été cultivé dans environ 2% des échantillons. Cependant, la présence de Map dans le lait pasteurisé ne doit pas obligatoirement être considérée comme une preuve de sa résistance à la pasteurisation. Des échecs de la pasteurisation commerciale sont possibles, du fait de procédés non appropriés comme une durée de traitement insuffisante, ou d'une contamination post-pasteurisation. Pour statuer sur la capacité de survie de Map, il convient au préalable de démontrer que ces deux points peuvent être exclus (Klein, 2006).

Les études consistant à rechercher la présence de Map dans du lait infecté naturellement et pasteurisé dans les conditions industrielles (Grant et al., 2002) sont plus intéressantes que les études de contamination expérimentale du lait suivie d'un traitement thermique avec des équipements à l'échelle du laboratoire, car elles reproduisent les conditions réelles. Dans ces conditions, il a été démontré que Map était capable de survivre à la pasteurisation commerciale, si elle est présente en quantité suffisante dans le lait cru (Grant et al., 2002). La pasteurisation HTST (72°C pendant 15 s) a pour effet de diminuer la quantité de bacilles de 4 à 7 log (Eltholth et al., 2009). Le taux d'inactivation dépend donc de la concentration initiale de Map dans le lait cru. Une explication possible de la résistance de Map aux traitements thermiques est sa tendance à former des amas du fait de son hydrophobie (Grant et al., 1996 ; Sung et Collins, 1998). Cependant, le rapport Afssa (2009a) considère que le lait pasteurisé ne constitue pas une source d'exposition humaine significative.

Les traitements à haute pression peuvent réduire le nombre de bactéries viables (Lopez-Pedemonte et al., 2006), mais même en association avec la pasteurisation, Map peut persister (Donaghy et al., 2007). Le traitement du lait par les UV ne permet pas de détruire Map (Donaghy et al., 2009).

Map peut persister dans les fromages, en particulier s'ils sont fabriqués avec du lait cru (Cirone et al., 2006 ; Eltholth et al., 2009). En France, tous les fromages fermiers et la plupart des fromages AOP (fermiers ou industriels) sont produits avec du lait cru, ce qui rend possible la contamination humaine à partir de ce type de fromages. Map a également été retrouvé dans du lait en poudre destiné à l'alimentation infantile (Hruska et al., 2005).

Etant donnée la grande résistance de la bactérie dans l'environnement et l'importance de l'excrétion fécale, la lutte contre la contamination de l'environnement est primordiale et passe par la maîtrise de la paratuberculose animale et la gestion des effluents (Klein, 2006)

#### **IV - Conclusion**

Ces dernières années, différents groupes de travail ont été constitués pour étudier la relation zoonotique entre la paratuberculose et la maladie de Crohn (Anonyme, 2000 ; Nacy et Buckley, 2008 ; Anonyme, 2009a). Ceux-ci ont mis en évidence un manque de connaissances concernant ces 2 maladies. Plus précisément, le rapport de l'Afssa publié en mars 2009 souligne les lacunes concernant l'épidémiologie de la paratuberculose, en particulier pour les petits ruminants, et les outils de diagnostic, ainsi que la quasi-absence de plan de lutte chez les petits ruminants. De plus, l'inscription de la paratuberculose sur la liste des maladies à déclaration obligatoire, a été jugée comme prématurée par le comité d'experts spécialisés de l'Afssa chargé de la santé animale (2004), en raison de l'inefficacité des outils de dépistage et de contrôle.

Dans le domaine de l'épidémiologie, les données descriptives sont quasiment absentes pour les petits ruminants ; la prévalence et l'incidence restent inconnues. Dans le domaine de l'épidémiologie analytique, les connaissances sont également limitées et un certain nombre d'entre elles relèvent plus de l'on-dit que de la démonstration scientifique. Certaines données sont anciennes et reposent sur des travaux dont la méthodologie est parfois discutable.

Dans le domaine du diagnostic, l'identification des animaux infectés asymptomatiques, excréteurs ou non, s'avère délicate, notamment pour les stades précoces. Les principaux problèmes identifiés sont :

- une méconnaissance des performances réelles des techniques de laboratoire, tant au niveau de l'animal que du troupeau,
- l'absence de prise en compte des particularités de l'infection paratuberculeuse, qui conduit à comparer des tests explorant des phénomènes non synchrones dans l'évolution de l'infection, avec à la clé des difficultés d'interprétation,
- la nécessité de préciser au niveau du troupeau les performances (sensibilité, spécificité et valeurs prédictives) des différentes techniques de dépistage disponibles. La réflexion devra tenir compte de l'adéquation entre, d'une part, les objectifs poursuivis dans le dépistage (par exemple, acquisition et maintien de qualification, disparition des signes cliniques) et, d'autre part, le choix et l'utilisation combinée ou séquentielle des différents outils.

En conséquence, les besoins de recherche identifiés par les différents groupes de travail portent :

- sur l'amélioration des outils de diagnostic (en particulier précoces) : comparaison et harmonisation des méthodes utilisées par les différents laboratoires, possibilité de distinguer les animaux vaccinés des animaux infectés, caractérisation d'outils adaptés pour le contrôle,
- sur la détermination de la prévalence de Map chez les animaux domestiques et sauvages, pour construire des plans de lutte et permettre des comparaisons avec la maladie de Crohn,
- sur la détermination de la répartition et de la quantification de Map chez les animaux infectés,
- sur le développement de vaccins efficaces,
- sur les effets de différents barèmes de pasteurisation,
- sur la survie de Map dans l'environnement et dans l'eau.

Ainsi, compte-tenu de l'importance de la paratuberculose chez les ruminants domestiques et du risque zoonotique potentiel de Map, il paraît tout à fait indiqué de promouvoir la lutte contre la maladie animale, qui permettrait de diminuer significativement le niveau de contamination par Map de l'environnement des élevages et des produits qui en sont issus.

Compte-tenu des lacunes de connaissances et des besoins d'étude présentés ci-dessus, l'objectif de la thèse est de produire des connaissances épidémiologiques pour la conception ultérieure de plans de maîtrise de l'infection par Map chez les caprins. Les résultats attendus sont de disposer de connaissances sur :

- la prévalence de l'infection par Map dans les troupeaux caprins français,
- les performances des outils de diagnostic pour la détection de l'infection par Map, en tenant compte des particularités de l'infection.

## Chapitre 3. Etude expérimentale

La contamination des animaux par Map se fait essentiellement (à l'exception de la contamination intra-utérine et par le colostrum) à partir d'un environnement contaminé. La source de cette contamination de l'environnement est constituée des animaux infectés et excréteurs de Map par leur fèces. Pour limiter la contamination du milieu, l'excrétion de la bactérie doit être réduite, en limitant la quantité de bactéries excrétées et en limitant le nombre d'animaux excréteurs. Cet objectif justifie la mise en œuvre de plans de maîtrise de la paratuberculose.

La conception d'un plan de lutte collective doit suivre plusieurs étapes (Toma et al., 2001) :

- décision sur l'opportunité de la lutte : évaluation des risques de la maladie pour la collectivité, bilan des besoins à satisfaire ;

- définition des objectifs généraux (résultat attendu) et détaillés (quantifiables et mesurables). Différents objectifs (classés par ordre décroissant d'ambition) peuvent être définis : l'éradication de la maladie, la maîtrise des foyers cliniquement exprimés, l'assainissement des troupeaux infectés, la protection des troupeaux indemnes, l'épidémiosurveillance de la maladie.

- élaboration des différentes stratégies possibles (qui dépendent de la prévalence) et des moyens correspondants ;

- choix d'une action parmi les différents scénarios. L'action choisie doit être suivie et évaluée pour juger de son efficacité.

La prévalence au niveau des troupeaux et intra-troupeaux détermine les différentes stratégies d'actions possibles :

- une protection et une surveillance pour les cheptels indemnes (stratégie défensive),
- une éradication pour les cheptels faiblement infectés, avec application uniquement de mesures sanitaires,

- une maîtrise pour les cheptels fortement infectés, avec application de mesures médicales et sanitaires.

Pour orienter les stratégies d'actions d'un plan de lutte, la connaissance de la prévalence est un paramètre indispensable. Par ailleurs, pour la conception d'un programme de lutte, la stratégie de dépistage des animaux infectés est importante (Rossiter et Burhans, 1996). Cette stratégie repose sur le choix des tests, leurs performances (sensibilité, spécificité et valeurs prédictives, précocité), leur coût, leur interprétation (statut identifié), leur utilisation (fréquence, proportions d'animaux testés, 1 ou plusieurs tests associés), et les actions induites. Ainsi, pour concevoir un plan de maîtrise de la paratuberculose caprine, il est nécessaire de disposer des données scientifiques concernant :

- la prévalence de l'infection par Map, au niveau des troupeaux et intra-troupeau,
- les performances des outils de diagnostic au cours du processus infectieux.

### **A - DISTRIBUTION DE LA PREVALENCE DE L'INFECTION PAR MAP DANS LES TROUPEAUX CAPRINS**

Une revue de la littérature (Nielsen et Toft, 2009) a montré qu'il n'existait aucune donnée sur la prévalence vraie individuelle des chèvres en Europe, bien que Map soit isolée dans la plupart des études. Au niveau troupeau, les estimations de la prévalence vraie ne sont pas interprétables dans la plupart des études, sauf les estimations réalisées en Espagne et en Suisse qui fournissent des valeurs supérieures à 20 %.

Toft et Nielsen (2009) ont défini un guide pour déterminer la prévalence de la paratuberculose. Celui-ci comprend 8 étapes :

- établir l'objectif de l'étude, définir et caractériser la population cible,
- choisir la cible la plus adaptée à l'objectif de l'étude : animaux infectés, infectieux ou atteints,
- choisir le test approprié,
- disposer des performances (Se et Sp) du test,
- collecter les données dans la population cible, avec un échantillonnage aléatoire,
- calculer la prévalence apparente et estimer la prévalence vraie avec l'estimateur de Rogan-Gladen,
- interpréter les résultats et vérifier les hypothèses,
- publier les résultats.

Selon les recommandations de Toft et Nielsen (2009), avant de déterminer la prévalence de l'infection par Map dans les troupeaux caprins français, il faut déterminer les qualités des tests de diagnostic utilisables.

### **I - Détermination de la qualité de deux tests de diagnostic de l'infection par Map chez les caprins par utilisation de techniques bayésiennes**

La qualité d'un test est définie par sa sensibilité (aptitude du test à fournir une réponse positive chez un individu infecté) et sa spécificité (aptitude du test à fournir une réponse négative chez un individu indemne). Un test parfait (encore appelé Gold Standard) a une sensibilité et une spécificité égales à 100%. La sensibilité (Se) et la spécificité (Sp) peuvent être estimées par différentes méthodes. Quand un test de référence parfait existe, la sensibilité et la spécificité du test peuvent être calculées directement par comparaison avec les résultats du test de référence. Cependant, pour de nombreuses maladies, dont la paratuberculose, il n'existe pas de Gold Standard et, dans ce cas, les méthodes « latent class » sont particulièrement adaptées pour l'estimation de la sensibilité et de la spécificité des tests (Branscum et al., 2005). « Latent class » définit le statut de l'animal comme « latent » c'est-à-dire qu'il existe mais qu'il ne peut pas être déterminé par les différents tests (Toft et al., 2005). Les premières méthodes « latent class » développées reposent sur le modèle de Hui et Walter (1980) qui envisage le dépistage d'individus issus de 2 populations avec 2 tests indépendants, aucun des 2 n'étant un Gold Standard. Avec de telles données, les 6 paramètres d'intérêt (la sensibilité et la spécificité des 2 tests et la prévalence dans les 2 populations) peuvent être estimés puisqu'il y a 6 degrés de liberté disponibles. Trois conditions doivent donc être vérifiées dans le paradigme de Hui et Walter :

- utilisation de deux tests indépendants, donc mesurant des phénomènes biologiques différents (Gardner et al., 2000),
- deux populations avec des prévalences différentes,
- caractéristiques des tests (sensibilité et spécificité) identiques dans les deux populations.

Le calcul des différentes probabilités est lourd et le développement des méthodes « latent class » a été rendu possible par la mise au point de logiciels de calcul en libre accès.

L'objectif de ce chapitre est d'estimer les sensibilités et les spécificités des 2 tests de diagnostic de l'infection par Map, en l'absence de Gold Standard.

Cette étude a été publiée dans *Epidémiologie et santé animale* (2007, 51, 57-64) et a fait l'objet d'un erratum (2009, 56, 255-256) (annexes 1 et 1bis).

## I - 1 - Matériel et méthodes

### I-1-1- Tests de diagnostic

Deux tests de diagnostic ont été utilisés : un test direct, reposant sur la mise en évidence de la bactérie (culture fécale) et un test indirect, reposant sur la mise en évidence des anticorps sériques avec un test ELISA commercial (ELISA Paratuberculose anticorps bicupule®, Institut Pourquier, Montpellier).

La culture fécale (CF) a été réalisée selon la norme en vigueur (NF U47-103). Les analyses sérologiques ont été effectuées conformément aux indications du producteur ; le seuil de positivité a été fixé à 60%.

### I-1-2- Animaux/population

L'étude a été réalisée dans des troupeaux caprins de la région Poitou-Charentes. Deux populations ont été identifiées : une population de troupeaux caprins sans signes cliniques évocateurs de la paratuberculose (population 1) et une population de troupeaux caprins avec des signes cliniques (population 2). Dans chaque population, un échantillonnage a été réalisé dans respectivement neuf et six troupeaux. Dans chaque troupeau, les prélèvements de sang et de fèces ont été effectués sur 40 animaux sans signes cliniques et appartenant à différentes classes d'âge, soit au total 600 caprins.

### I-1-3- Logiciels de calcul

Les modèles « latent class » peuvent être séparés en deux approches :

- une approche fréquentielle : estimation du maximum de vraisemblance (Maximum Likelihood ou ML),
- une approche bayésienne qui permet d'obtenir une estimation du paramètre recherché en combinant les données récoltées sur le terrain et des informations d'experts (Enoe et al., 2000).

Deux logiciels correspondant à chacune des deux approches ont été utilisés.

#### 1 – Logiciel TAGS (Test in Absence of a Gold-Standard)

Il s'agit d'un logiciel développé par Pouillot et al. (2002) sous R ([www.afssa.fr/interne/tags.htm](http://www.afssa.fr/interne/tags.htm)) et qui permet d'estimer le maximum de vraisemblance. Ce modèle peut produire les valeurs les plus probables des paramètres qui auraient mené aux données observées. Le paramètre estimé est obtenu en maximisant la vraisemblance par des algorithmes. Deux algorithmes sont utilisés successivement : l'algorithme de Newton-Raphson (NR) et l'algorithme EM (Expectation-Maximisation).

#### 2 – Logiciel WinBUGS

Il s'agit d'un logiciel développé par Spiegelhalter et al. (1996) pour faciliter l'utilisation de l'approche bayésienne (<http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/bugs/winbugs/contents.shtml>). BUGS correspond à « Bayesian inference Using Gibbs Sampling ». Ce logiciel utilise la méthode de l'échantillonneur de Gibbs (Gibbs sampling) avec des algorithmes Monte Carlo par Chaîne de Markov (MCMC). Cet algorithme (MCMC) est un algorithme d'échantillonnage à partir d'une distribution de probabilités afin de construire une ou plusieurs chaînes d'itérations, celles-ci étant le résultat de chaque étape de la simulation. WinBUGS amorce une valeur

arbitraire pour chaque chaîne et simule les différents paramètres à partir de cette valeur. Ceux-ci sont alors utilisés dans l'itération suivante comme valeur de départ (Praet et al., 2006). En réalisant un grand nombre d'itérations, on peut obtenir une bonne estimation de la loi *a posteriori* (Enoe et al., 2000).

Dans cette approche, les paramètres à évaluer sont des variables aléatoires dont il faut préciser la distribution. L'estimation de la valeur est la probabilité *a posteriori* (ou « Posterior »), qui est déterminée à partir d'informations fournies par des experts (ou « Priors ») et les données récoltées sur le terrain (vraisemblance) (Branscum et al., 2005).

Les informations *a priori* ont été considérées comme des variables binomiales dont la distribution suit une loi bêta de paramètres  $a$  et  $b$ , dans l'intervalle  $[0,1]$  et notée  $Be(a/b)$  (Johnson et al., 2001). Pour construire les lois bêta (logiciel *betabuster* : <http://www.epi.ucdavis.edu/diagnostictests/betabuster.html>), les experts doivent fournir pour chaque paramètre la valeur la plus probable (ou la meilleure estimation) et une valeur limite (Enoe et al., 2000).

Le logiciel WinBUGS permet d'estimer chaque paramètre à partir de la moyenne, de la médiane ou du mode de la distribution du « posterior » et de déterminer un intervalle de probabilité à 95% (2,5 et 97,5 percentiles) (Branscum et al., 2005).

Différents « priors » ont été définis à partir des données bibliographiques pour la sensibilité et la spécificité des deux tests et à partir de l'expérience des auteurs pour les prévalences. Quatre modèles correspondant à différents « priors » ont été testés (Tableau 15).

Dans le modèle I, les priors ont été estimés à partir des données de la littérature pour les sensibilités et les spécificités des 2 tests. Pour la culture fécale, la meilleure estimation de la sensibilité est 33%, et on estime, à 95 %, que la sensibilité est supérieure à 30%, à partir des estimations réalisées chez les bovins (Whitlock et al., 2000). De même, la meilleure estimation de la spécificité est 100%, et on estime, à 95 %, que la spécificité est supérieure à 99%. Pour le test ELISA, la meilleure estimation de la sensibilité est 48%, et on estime, à 95 %, que la sensibilité est supérieure à 28%, à partir des estimations réalisées chez les bovins (Whitlock et al., 2000) et chez les ovins (Robbe-Austerman et al., 2006b). De même, la meilleure estimation de la spécificité est 99%, et on estime, à 95 %, que la spécificité est supérieure à 94%, à partir d'estimation réalisées chez les ovins (Robbe-Austerman et al., 2006b) ou chez les caprins (Wintz, 2006). Pour la prévalence dans la population 1, la valeur la plus probable a été fixée à 5% et la valeur limite inférieure à 10%, tandis que pour la population 2, la valeur la plus probable a été fixée à 15% et la valeur limite supérieure à 10%. Le modèle II est une adaptation du modèle I tenant compte d'une étude réalisée sur des caprins et utilisant le même test ELISA (Gumber et al., 2006). L'estimation de la sensibilité du test ELISA a été augmentée (78%) avec une valeur limite supérieure à 56%.

Le modèle III reprend les « priors » utilisés par Kostoulas et al. (2006b). Ils ont considéré que les spécificités des deux tests étaient proches de 100% mais qu'ils ne disposaient pas d'informations concernant les sensibilités. Les lois  $Be(1,1)$  correspondant à une distribution uniforme du « prior » ont donc été utilisées pour les sensibilités des 2 tests.

Dans le modèle IV les « priors » correspondant aux sensibilités et aux spécificités ont une distribution uniforme. De plus, pour les prévalences, les lois  $Be(0,1/0,9)$  et  $(0,9/0,1)$  ont été utilisées (Enoe et al., 2000). On parle alors de modèle non informatif (NI).

Tableau 15 : Paramètres a et b des différentes lois bêta (Be (a/b)) utilisées comme valeurs a priori dans les quatre modèles

Paramètres	I	II	III	IV (NI)
SeCF	Be(207,6/420,5) a	Be (207,6/420,5)	Be (1/1) e	Be (1/1)
SpCF	Be (298,1/1) a	Be (298,1/1)	Be (100/2) e	Be (1/1)
SeELISA	Be (7,4/7,9) a,b	Be (12,44/4,2) d	Be (1/1) e	Be (1/1)
SpELISA	Be (58,7/1,4) b,c	Be (58,7/1,4)	Be (100/5,5) e	Be (1/1)
p1	Be (6,2/99,7)	Be (6,2/99,7)	Be (6,2/99,7)	Be (0,1/0,9)
p2	Be (14,5/77,7)	Be (14,5/77,7)	Be (14,5/77,7)	Be (0,9/0,1)

a : Whitlock et al., 2000 ; b : Robbe-Austerman et al., 2006b ; c : Wintz, 2006 ;

d : Gumber et al., 2006 ; e : Kostoulas et al., 2006b

## I - 2 - Résultats

Sur les prélèvements des 600 chèvres, les résultats du test ELISA et de la culture fécale ont été obtenus pour 532 animaux (Tableau 16), 320 caprins dans la sous-population 1 et 212 caprins dans la sous-population 2.

Tableau 16 : Résultats croisés de la culture fécale et du test ELISA dans les deux sous-populations

		Sous-population 1 Culture fécale			Sous-population 2 Culture fécale				
		+	-	Total	ELISA	+	-	Total	
ELISA	+	2	1	3	ELISA	+	13	13	26
	-	6	311	317		-	15	171	186
Total		8	312	320	Total		28	184	212

### I-2-1- Méthode fréquentielle

L'application du logiciel TAGS aux données récoltées permet d'estimer la sensibilité et la spécificité des deux tests, ainsi que la prévalence dans les deux populations (Tableau 17).

Tableau 17 : Estimation des différents paramètres à partir du logiciel TAGS (IC à 95%) en pourcentages

Paramètres	ML* (IC à 95%)
Sensibilité de la culture fécale	SeCF 52 (34-69)
Spécificité de la culture fécale	SpCF 99 (95-100)
Sensibilité du test ELISA	SeELISA 51 (21-72)
Spécificité du test ELISA	SpELISA 100 (ND-100)
Prévalence dans la sous-population 1	p1 2 (0,5-6)
Prévalence dans la sous-population 2	p2 24 (16-34)

\* ML : Maximum Likelihood (maximum de vraisemblance)

Pour la culture fécale, la sensibilité et la spécificité ont été estimées à respectivement 52 et 99%, alors que pour le test ELISA, la sensibilité et la spécificité ont été estimées à 51 et

100%. Les prévalences dans les deux populations ont également été estimées à 2% pour la sous-population 1 (faible prévalence) et 24% pour la sous-population 2 (forte prévalence). L'intervalle de confiance (IC) à 95% n'a pas pu être défini pour la spécificité du test ELISA, en raison de la taille de l'échantillon.

L'étendue de l'IC à 95% détermine la précision de l'estimation : plus l'intervalle de confiance est large, moins l'estimation est précise. L'estimation de la spécificité de la culture fécale est plus précise que l'estimation de la sensibilité de la culture fécale, elle-même plus précise que la sensibilité du test ELISA. L'estimation de la prévalence dans la sous-population 1 est plus précise que l'estimation de la prévalence dans la sous-population 2.

## I-2-2- Méthode bayésienne

En fonction du choix des « priors », différentes estimations ont été obtenues pour la sensibilité et la spécificité des deux tests ainsi que pour la prévalence dans les deux populations (Tableau 18).

Les différents modèles ont permis de mettre en évidence l'influence du choix des « priors » sur les estimations des différents paramètres (« posteriors »).

Les prévalences estimées sont de l'ordre de 3% pour la sous-population 1 et de 20% pour la sous-population 2 et sont faiblement influencées par le choix du modèle sauf peut-être pour le modèle NI. La précision des estimations est la même, quel que soit le modèle, et la précision de l'estimation dans la sous-population 1 est meilleure que la précision de l'estimation dans la sous-population 2.

Les estimations de la spécificité des deux tests sont comparables, quel que soit le modèle, et sont proches de 100%. La précision des estimations est la même, quel que soit le modèle.

En revanche, les estimations de la sensibilité varient selon le modèle utilisé. Ainsi, l'estimation de la sensibilité de la culture fécale est comprise entre 34 à 61%. L'estimation de la sensibilité du test ELISA est comprise entre 42 et 53%. L'augmentation du prior de la sensibilité du test ELISA dans le modèle II a pour effet d'augmenter l'estimation a posteriori de la sensibilité du test ELISA. L'utilisation de priors non informatifs a pour conséquence d'augmenter l'imprécision des estimations pour la sensibilité de l'ELISA.

Dans les modèles I et II, la sensibilité du test ELISA est supérieure à celle de la culture fécale. Dans le modèle III, la sensibilité de la culture fécale devient supérieure à celle du test ELISA. En revanche, dans le modèle IV, les estimations de la sensibilité de la culture fécale et du test ELISA sont comparables.

Tableau 18 : Valeurs a posteriori des différents paramètres pour les quatre modèles utilisés avec le logiciel WinBUGS : médiane (intervalle de probabilité à 95%) en pourcentages

Paramètres	I	II	III	IV (NI)
SeCF	34 (31-38)	34 (31-38)	61 (42-83)	53 (34-72)
SpCF	99 (98-100)	99 (98-100)	99 (97-100)	98 (96-100)
SeELISA	42 (30-57)	53 (38-70)	50 (33-70)	53 (33-78)
SpELISA	100 (99-100)	100 (99-100)	98 (97-99)	99 (98-100)
p1	4 (2-7)	3 (1-6)	3 (1-5)	1 (0-4)
p2	23 (17-30)	22 (16-28)	19 (13-25)	23 (14-34)

## I - 3 - Discussion

### I-3-1- Vérification du paradigme de Hui et Walter

#### 1 – Indépendance des tests

Les deux tests utilisés reposent sur des bases biologiques différentes (antigène pour l'un, anticorps pour l'autre) et peuvent donc être considérés comme indépendants (Branscum et al., 2005). De plus, différents auteurs (Kostoulas et al., 2006b ; Van Schaik et al., 2007b) ont testé l'hypothèse d'une dépendance entre les deux tests et ont démontré que cette hypothèse ne pouvait pas être retenue.

Il existe cependant des méthodes (Vacek, 1985 ; Georgiadis et al., 2003 ; Dendukuri et al., 2009) permettant d'appliquer l'approche bayésienne quand les tests sont dépendants.

#### 2 – Différence de prévalence entre les 2 populations

La constitution des deux sous-populations (sur la base des manifestations cliniques) a été réalisée indépendamment des résultats des tests et indépendamment de critères biologiques (âge, sexe). Les données récoltées montrent que les prévalences sont différentes. Cette hypothèse est donc vérifiée.

Il n'est pas nécessaire que la différence de prévalence entre les deux populations soit importante (Enoe et al., 2000).

Cependant, selon différents auteurs (Nielsen et al., 2002c ; Toft et al., 2005), il vaudrait mieux utiliser des critères géographiques pour constituer les deux sous-populations.

#### 3 – Constance des paramètres

C'est l'hypothèse la plus difficile à vérifier. En effet, selon van Schaik et al. (2007b), les sensibilités sont différentes dans les deux populations car l'excrétion est moins intense dans les troupeaux sans signes cliniques. La sensibilité et la spécificité peuvent également varier en fonction de la prévalence (Brenner et Gefeller, 1997).

### I-3-2- Choix des priors

Les « priors » doivent être définis indépendamment des données de l'étude (Branscum et al., 2005). Idéalement, ils devraient être définis à partir d'études comparables (Enoe et al., 2000). Or il existe très peu d'études concernant les caprins. Les estimations *a priori* ont donc été faites sur la base de résultats obtenus pour d'autres espèces, principalement les bovins. Par ailleurs, différents tests ELISA sont commercialisés pour le diagnostic de la paratuberculose et leurs évaluations ont été réalisées par rapport à différents tests (culture fécale, lésions histologiques, signes cliniques,...). Il est donc très difficile de proposer des valeurs *a priori* pour les différents paramètres.

Le fait de tester différents « priors » permet de vérifier la stabilité de l'analyse bayésienne (Enoe et al., 2000).

### I-3-3- Choix d'une approche

Les méthodes probabilistes sont particulièrement adaptées aux maladies chroniques ou à infection persistante telles que la paratuberculose car les antigènes et les anticorps sont détectables pendant l'essentiel du processus infectieux (Branscum et al., 2005).

Les estimations obtenues avec le modèle bayésien non informatif (modèle IV) sont très proches de celles obtenues avec l'approche fréquentielle. L'avantage de l'approche bayésienne, est de pouvoir traiter des échantillons de petite taille, avec des valeurs nulles dans les tableaux de contingence, contrairement à l'approche fréquentielle (Enoe et al., 2000). Un intervalle de probabilité peut être défini dans tous les cas. Le choix de priors uniformes ou non informatifs traduit l'ignorance sur les performances des tests. Dans ces conditions, les estimations *a posteriori* sont plus fortement dépendantes des données observées.

La précision de l'estimation est déterminée par l'amplitude de l'intervalle de probabilité : plus l'intervalle est réduit, meilleure est la précision (Branscum et al., 2005). Par ailleurs, la taille de l'intervalle de probabilité dépend de la différence de prévalence entre les deux populations (Enoe et al., 2000) : un écart faible entre les deux prévalences induit un intervalle de probabilité large et donc augmente l'imprécision. Les modèles I et II sont les modèles les plus précis.

A notre connaissance, seules 2 études ont estimé les performances du test ELISA et de la culture fécale à partir des méthodes "latent class", une chez les bovins (Nielsen et al., 2002c) et une chez les caprins (Kostoulas et al., 2006b). Dans ces conditions, la sensibilité de la culture fécale a été estimée à 20-25% chez les bovins et à 7% chez les caprins, tandis que la spécificité de la culture fécale a été estimée à 98% chez les bovins et à 97% chez les caprins. Il n'existe pas d'estimation pour le test ELISA chez les bovins. En revanche, chez les caprins, la sensibilité du test ELISA a été estimée à 49% et la spécificité du test ELISA a été estimée à 94%. Les résultats de notre étude sont comparables à ceux des études précédentes pour la sensibilité et la spécificité du test ELISA, ainsi que pour la spécificité de la culture fécale. En revanche, l'estimation de la sensibilité de la culture fécale est meilleure que dans l'étude de Kostoulas et al. (2006b). Les tests de dépistage de la paratuberculose sont généralement considérés comme très spécifiques mais peu sensibles.

#### I - 4 - Conclusion de cette étude

En raison du choix des valeurs *a priori* et de la précision des estimations, c'est le modèle II qui a été retenu. La sensibilité de la culture fécale est inférieure à celle du test ELISA (34 % contre 53%). En revanche, les spécificités des deux tests sont comparables. L'approche bayésienne permet donc d'estimer les caractéristiques de deux tests pour le diagnostic de l'infection par Map et rend donc possible l'estimation d'une prévalence réelle au moyen d'un de ces 2 tests. La sensibilité et la spécificité de la culture fécale ont été estimées à respectivement 34 et 99%, tandis que la sensibilité et la spécificité du test ELISA ont été estimées respectivement à 53 et 100%.

## **II - Estimation de la prévalence de l'infection par Map dans les troupeaux caprins français**

Bien que la paratuberculose soit considérée comme largement présente dans les troupeaux caprins français, la prévalence de l'infection par Map y est inconnue. Une enquête a été menée auprès de tous les Groupements de Défense Sanitaire départementaux (Petit, 2006) mais les résultats sont peu exploitables car différents outils de diagnostic ont été utilisés et l'échantillonnage n'a pas été établi sur une base statistique.

Pourtant, le choix et les modalités d'un programme de lutte contre de la paratuberculose caprine dépendent étroitement de la prévalence de cette maladie. L'objectif de cette étude était donc d'estimer la prévalence de l'infection par Map dans les troupeaux caprins français. L'objet de l'étude est l'infection par Map c'est-à-dire la présence de Map dans le cytoplasme

des macrophages intestinaux. Ceci induit des réactions immunitaires, cellulaires puis humorales. L'infection peut être détectée par la mise en évidence des anticorps. La prévalence réelle de l'infection peut être estimée car les qualités (sensibilité et spécificité) du test ELISA ont été définies dans la population étudiée.

Cette étude a été publiée dans la revue Veterinary Record le 11 septembre 2010 (annexe 2).

## II - 1 - Matériel et méthodes

L'estimation de la prévalence se fait à partir de la mesure de la séroprévalence obtenue par un test ELISA. Le test ELISA a été choisi en raison de sa capacité à détecter les animaux infectés.

### II-1-1- Sélection des troupeaux

La population cible est constituée par les troupeaux caprins de France métropolitaine possédant des animaux de plus de 6 mois. La taille de l'échantillon (nombre de troupeaux sélectionnés) a été définie sur la base d'une prévalence attendue d'au moins 50% et d'une précision relative de 20% avec un intervalle de confiance de 95 %, selon les indications de Thrusfield (2005). Dans ces conditions, le nombre maximal de troupeaux est égal à 97. L'objectif a donc été de recruter environ 100 troupeaux.

En 2007, 10 437 exploitations professionnelles avec des chèvres ont été enregistrées dans les 14 régions caprines de métropole (Agreste, 2009). Les régions caprines sont des régions dans lesquelles au moins 5 000 femelles ont été enregistrées. Au sein de ces régions caprines, cinq régions peuvent être individualisées car elles possèdent un cheptel caprin supérieur à 70 000 femelles ; il s'agit de Rhône-Alpes, Poitou-Charentes, Pays-de-Loire, Centre et Midi-Pyrénées, qui représentent respectivement 20%, 14%, 9%, 8%, 8 % des troupeaux. Les 9 autres régions (Aquitaine, Auvergne, Basse-Normandie, Bourgogne, Bretagne, Corse, Languedoc-Roussillon, Limousin et Provence-Alpes-Côte d'Azur) sont regroupées dans une région appelée « autres » et représentent 41 % des troupeaux.

Les troupeaux (n =105) ont été sélectionnés aléatoirement dans les 6 régions définies précédemment selon la méthode du sondage en grappe (Bouyer et al., 1995). Dans chaque région, le nombre de troupeaux sélectionnés est proportionnel au nombre d'exploitations caprines. Ainsi, la population d'étude est constituée de 19% de troupeaux issus de Rhône-Alpes, 19% de troupeaux issus de Poitou-Charentes, 12% de troupeaux issus de Pays-de-Loire, 10% de troupeaux issus de la région Centre, 5% de troupeaux issus de Midi-Pyrénées et 35% troupeaux issus des autres régions caprines. Les troupeaux ont été sélectionnés aléatoirement parmi la population soumise à la prophylaxie obligatoire contre la brucellose. Dans chaque troupeau, tous les animaux de plus de 6 mois (n = 11 847) ont fait l'objet d'un prélèvement de sang.

### II-1-2- Test ELISA

Les sérums ont été testés avec un kit du commerce et selon les instructions fournies par le producteur (ELISA Paratuberculose anticorps bicupule®, Institut Pourquier, Montpellier, France). Ce kit mesure les anticorps dirigés contre Map et comprend une étape d'adsorption avec *M. phlei*, qui permet de supprimer les anticorps non spécifiques, comme recommandé par Yokomizo et al. (1985). Sur des plaques de 96 puits, 46 échantillons de sérums ont été testés. Les contrôles positif et négatif fournis par le producteur sont disposés sur chaque

plaque. Les plaques sont lues (à 450 nm) avec un lecteur de plaques automatique relié à un ordinateur. Pour chaque sérum, le pourcentage E/P a été calculé selon la formule suivante :

$$\% E/P = \frac{\text{DO de l'échantillon à tester} - \text{DO moyenné du contrôle négatif}}{\text{DO moyenné du contrôle positif} - \text{DO moyenné du contrôle négatif}} \times 100$$

Un échantillon est considéré comme positif si le pourcentage E/P est supérieur à 60 %. Avec ce seuil, le test ELISA possède une sensibilité (Se) de 53 % (IC à 95% : 38-70) et une spécificité (Sp) de 100 % (IC à 95% : 99-100), comme cela a été déterminé dans le chapitre précédent.

Un troupeau a été considéré comme positif si au moins un animal était séropositif.

### II-1-3- Analyse des données

Comme tous les animaux ont été testés dans chaque troupeau, il est possible de calculer la prévalence individuelle et la prévalence intra-troupeau, en plus de la prévalence des troupeaux.

La prévalence apparente au niveau individuel (PA) est calculée comme le rapport du nombre de chèvres séropositives sur le nombre de chèvres testées. Au niveau du troupeau (PAT), elle est calculée comme le rapport du nombre de troupeaux positifs sur le nombre de troupeaux testés.

Au niveau individuel, la prévalence vraie (PV) est estimée à partir de la prévalence apparente en utilisant la correction de Rogan-Gladen (Rogan et Gladen, 1978) selon la formule suivante :

$$PA = Se \times PV + (1 - Sp) \times (1 - PV) \leftrightarrow PV = \frac{PA + Sp - 1}{Sp + Se - 1}$$

Une autre estimation de la prévalence vraie au niveau individuel a été obtenue par la moyenne pondérée de la prévalence vraie dans chaque région. Le poids de chaque strate est la proportion de chèvres dans chaque région dans la population cible.

Au niveau troupeau, les équivalents de Se, Sp et PV sont dénommés TSe, TSp et PVT, respectivement. Comme au niveau individuel pour la conversion de PA en PV, la conversion de PAT en PVT implique que TSe et TSp soient connues. Comme un test imparfait au niveau individuel a été utilisé pour caractériser les troupeaux, des estimations de TSe et TSp ont été réalisées selon les indications de Martin et al. (1992). TSe est calculée de la façon suivante :  $TSe = 1 - (1-P)^n$ , où P est la prévalence apparente dans un troupeau positif, et n est le nombre d'animaux testés dans ce troupeau. TSp est calculée de la façon suivante :  $TSp = 1 - (1 - Sp)^n$ .

Au niveau du troupeau, la sensibilité et la spécificité du test varient donc en fonction de la taille du troupeau (n). Dans cette étude la taille des troupeaux varie beaucoup (14 - 840, premier quartile : 50 ; médiane : 89 ; troisième quartile : 145). La prévalence vraie des troupeaux a donc été estimée comme indiqué par Muskens et al. (2000), par la moyenne pondérée de la prévalence vraie dans les différentes catégories. Les différentes catégories sont définies en fonction de la taille du troupeau, et le poids dans chaque catégorie est égal au nombre de troupeaux dans chaque catégorie divisé par le nombre total de troupeaux. Les calculs détaillés figurent en annexe 2bis.

La prévalence intra-troupeau a été calculée uniquement pour les troupeaux positifs (n = 58). Elle a été définie comme le nombre d'animaux testés positifs divisé par le nombre d'animaux testés dans ces troupeaux. L'estimateur de Rogan-Gladen a été utilisé pour obtenir la prévalence intra-troupeau vraie à partir de la prévalence intra-troupeau apparente.

## II - 2 - Résultats

Les nombres de troupeaux et d'animaux positifs sont décrits dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Distribution des résultats

Régions	Troupeaux		Animaux	
	testés	positifs	testés	positifs
Rhône-Alpes	20	11	1 512	43
Poitou-Charentes	20	14	1 838	89
Pays-de-Loire	13	9	3 251	103
Centre	10	6	986	26
Midi-Pyrénées	5	3	915	26
Autres	37	15	3 345	60
Total	105	58	11 847	347

### II-2-1- Prévalence troupeau

Le nombre de troupeaux positifs est de 58. Au niveau troupeau, la prévalence apparente (PAT) est de 55 % (IC 95% [45-65]), et l'estimation de la prévalence vraie (PVT) est de 63% (IC 95% [41-84]).

### II-2-2- Prévalence individuelle

Le nombre de chèvres positives est de 347. Au niveau individuel, la prévalence apparente (PA) est de 2,9 % (IC 95% CI [2,6-3,2]). En utilisant l'estimateur de Rogan-Gladen, l'estimation de la prévalence vraie (PV) est de 5,5% (IC 95% [5,1-5,9]). En utilisant la moyenne pondérée, l'estimation de la prévalence vraie est supérieure (6,6 %, IC 95% [6,1-7,0]).

### II-2-3- Prévalence intra-troupeau

Pour les troupeaux séro-positifs, la prévalence intra-troupeau apparente moyenne est de 5,9% (de 0,7% à 17,6%, premier quartile : 2,2 ; médiane : 4,8 ; troisième quartile : 9,3) (Figure 14). L'estimation de la prévalence intra-troupeau vraie moyenne est de 11,1% (de 1,1% à 33,1%, premier quartile : 4,1 ; médiane : 9,0 ; troisième quartile : 17,6).

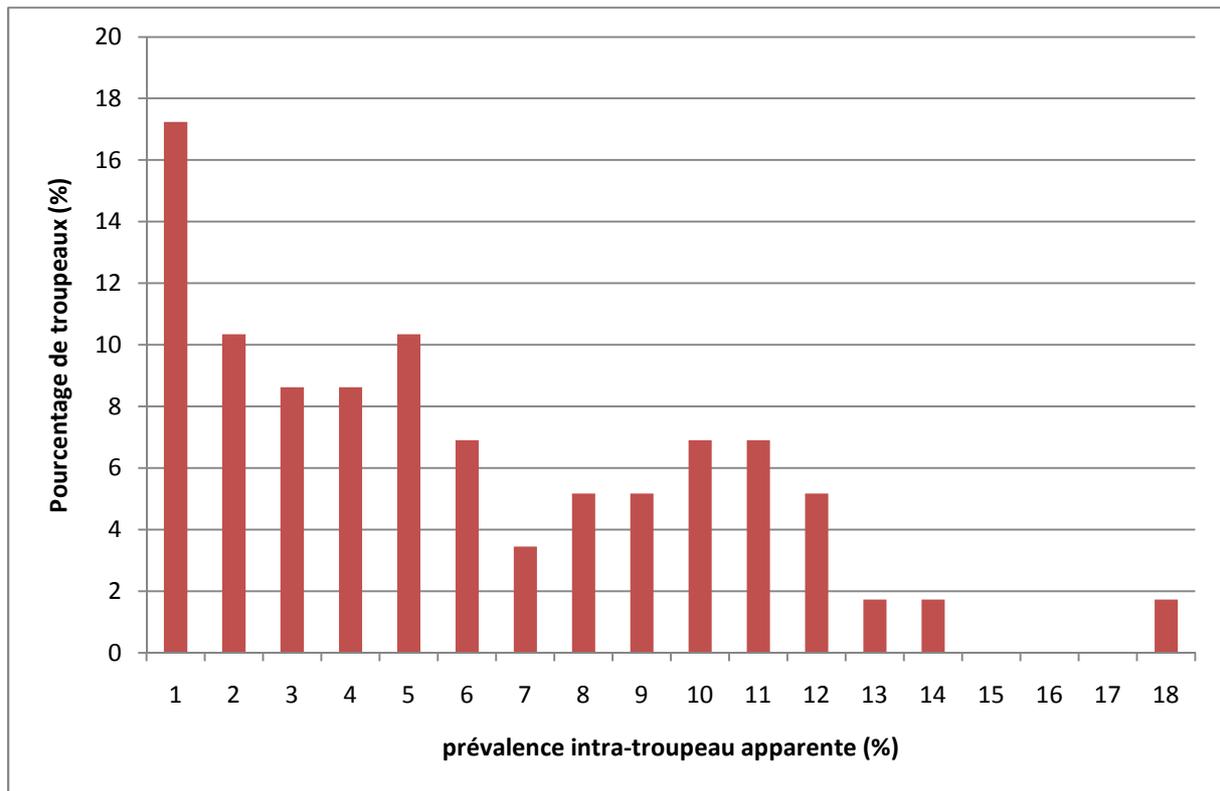


Figure 14 : Distribution de la prévalence intra-troupeau apparente dans les troupeaux séro-positifs (n = 58)

### II - 3 - Discussion

Cette étude confirme que l'infection par Map est largement répandue dans les troupeaux caprins français (prévalence vraie au niveau troupeau estimée à 63 %). La taille de l'échantillon a été déterminée sur la base d'une prévalence attendue d'au moins 50% et d'une précision relative de 20% avec un intervalle de confiance de 95 %. Une prévalence apparente de 55,2% a été obtenue avec 105 troupeaux, ce qui fournit une précision relative ( $=2\sigma/PAT$ ) de 18%, meilleure que la précision souhaitée. Dans cette étude, les troupeaux ont été prélevés au hasard dans les différentes régions caprines, en respectant l'importance relative des différentes régions, de façon à avoir un échantillon représentatif, mais le nombre de troupeaux dans chaque région est trop faible pour pouvoir faire des comparaisons entre régions. Cette étude est la première étude permettant d'estimer la prévalence de l'infection par Map dans les troupeaux caprins français et a été conduite selon les recommandations de Nielsen et Toft (2009).

Pour estimer la prévalence vraie nous avons utilisé la correction de Rogan-Gladen. L'approche Bayésienne, utilisant une approche itérative telle que l'échantillonneur de Gibbs, aurait pu constituer une méthode alternative. Cependant la correction de Rogan-Gladen présente l'avantage d'être largement reconnue et d'être recommandée par Nielsen et Toft (2009) pour estimer la prévalence vraie quand la précision du test est connue.

En dépit de sa faible sensibilité, ce test a été retenu en raison de la disponibilité des prélèvements, de sa rapidité et de son coût relativement faible. De plus, ce test est capable de détecter les caprins infectés par Map. Ses performances (sensibilité et spécificité) avaient été évaluées précédemment chez des caprins français à respectivement 53 et 100 % (Mercier et al., 2007 ; Mercier et al., 2009) et sont compatibles avec les données de la littérature (Nielsen et Toft, 2008). Selon Martin et al. (1992), l'estimation de la prévalence vraie au niveau troupeau ne dépend que de la spécificité du test. Une spécificité de 100 % pourrait être remise

en cause puisque Nielsen et Toft (2008) font état d'une spécificité comprise entre 93 et 100%. Dans le contexte de notre étude, une spécificité égale à 93% fournirait une estimation de la prévalence vraie égale à 44,8 % au lieu de 62,9%. Cependant, cette valeur (44,8%) est incluse dans l'IC à 95 % de la prévalence vraie telle qu'elle a été estimée.

Dans chaque troupeau, tous les caprins de plus de 6 mois ont été testés, ce qui permet de calculer la prévalence individuelle et la prévalence intra-troupeau pour des tailles de troupeau variables, rendant ainsi l'estimation de la prévalence vraie plus pertinente. Cependant, en raison du regroupement des cas au niveau des troupeaux, l'estimation de la prévalence au niveau individuel est moins informative que l'estimation de la prévalence au niveau troupeau ou intra-troupeau.

Ainsi, au niveau individuel, la prévalence vraie a été estimée à 6,6%, plus faible que la prévalence vraie au niveau troupeau. L'estimation moyenne de la prévalence intra-troupeau vraie a été calculée à 11,1%. Cependant, l'estimation de la prévalence intra-troupeau vraie est très variable (1,1 à 33,1 %) et 25 % des troupeaux ont une prévalence intra-troupeau vraie supérieure à 18%. La prévalence intra-troupeau de l'infection par Map varie donc beaucoup selon les troupeaux.

La prévalence intra-troupeau a été calculée dans les troupeaux séropositifs. Comme la sensibilité du test est faible, certains troupeaux séronégatifs pourraient être des faux-négatifs. Cependant, dans ces troupeaux faux-négatifs, les prévalences intra-troupeau sont probablement faibles et n'influencent pas de façon importante l'estimation moyenne de la vraie prévalence intra-troupeau.

L'étendue de l'intervalle de confiance détermine la précision de l'estimation. La précision de l'estimation de la prévalence vraie est meilleure au niveau individuel qu'au niveau troupeau, parce que la taille de l'échantillon est plus élevée au niveau individuel ( $n = 11\,847$ ) qu'au niveau troupeau ( $n = 105$ ).

Il est difficile de comparer les résultats obtenus dans cette étude avec ceux d'autres études, en raison de la diversité des tests utilisés et des différences dans la taille de l'échantillon et des populations étudiées. Avec un test IDG, une prévalence apparente troupeau de 52 % a été trouvée dans une étude espagnole testant 23 troupeaux caprins sélectionnés au hasard (Reviriego et al., 2000), mais les chèvres étudiées étaient plus âgées que dans notre étude (chèvres de plus de 18 mois versus chèvres de plus de 6 mois). Au niveau individuel, aucune prévalence apparente n'a été calculée. Comme la précision du test n'avait pas été estimée au préalable, la prévalence vraie n'a pas pu être déterminée. La prévalence apparente déterminée par Mendes et al. (2004) a été obtenue avec un échantillonnage de 10% des chèvres (âgées de plus de 2 ans). Idéalement, les comparaisons entre études devraient être réalisées uniquement avec les prévalences vraies. En effet, les prévalences vraies correspondent à des estimations corrigées par les performances des tests, alors que les prévalences apparentes dépendent de ces performances et des seuils d'interprétation utilisés.

La présente étude avait comme finalité de documenter la prévalence de l'infection par Map dans les troupeaux caprins français, afin de choisir, concevoir et budgéter un programme de lutte contre l'infection par Map dans les troupeaux caprins français. Comme suggéré par Nielsen et Toft (2009), les programmes de lutte sont influencés par la prévalence au niveau troupeau et au niveau individuel. En France, l'infection par Map est largement répandue dans les troupeaux caprins et plusieurs mesures sont nécessaires pour réduire le pourcentage de troupeaux et d'animaux infectés. Pour les troupeaux avec une prévalence intra-troupeau élevée, on peut envisager la maîtrise des signes cliniques, grâce à la vaccination et à la mise

en place de mesures sanitaires. Pour les troupeaux avec une prévalence intra-troupeau moyenne, l'application de mesures sanitaires peut être envisagée, tandis que pour les troupeaux considérés comme non-infectés (prévalence apparente nulle), la surveillance peut être envisagée. Ainsi, il est nécessaire de connaître les pourcentages de troupeaux et d'animaux séropositifs, de même que leurs variations régionales, et l'estimation de la prévalence vraie de l'infection par Map (Muskens et al., 2000 ; Nielsen et Toft, 2009). En France, nos estimations de la prévalence troupeau pourront être utilisées par les autorités sanitaires régionales comme des références afin d'éclairer leur prise de décision concernant la mise en œuvre de stratégies de lutte. Au niveau des troupeaux, la distribution de la prévalence intra-troupeau peut également fournir la valeur minimale de prévalence à retenir pour sélectionner les troupeaux les plus fortement infectés.

#### II - 4 - Conclusion

La prévalence de l'infection par Map, estimée grâce à une enquête sérologique, est de 63 % pour les troupeaux et de 7% au niveau individuel, avec une grande variabilité de la prévalence intra-troupeau (1 à 33%).

Il paraissait important de produire rapidement des données nécessaires à la mise en place de plans de lutte. Cependant, l'infection par Map est un processus complexe au cours duquel différentes réactions immunitaires interviennent. Dans un troupeau, les animaux infectés par Map peuvent donc exprimer différents statuts. Différents outils permettent donc de détecter l'infection par Map et leurs performances varient en fonction du statut mis en évidence. Les stratégies de dépistage des animaux infectés et l'évaluation des plans de lutte sont déterminées par la qualité des outils utilisés.

### **B - DESCRIPTION DES PERFORMANCES DES OUTILS DE DIAGNOSTIC POUR LA DETECTION DES DIFFERENTS STATUTS**

Les animaux excréteurs ont un rôle épidémiologique important et représentent la cible principale des plans de maîtrise de l'infection par Map : en excréant la bactérie, ils sont susceptibles d'assurer sa diffusion dans l'environnement (Nielsen et Toft, 2008). Ils diffusent l'infection au sein du troupeau ou à d'autres troupeaux. Ce sont donc les animaux excréteurs qui doivent être éliminés. Cependant, la détection de l'excrétion fait appel à des méthodes longues (culture) ou coûteuses (PCR), et très souvent, les plans de maîtrise cherchent à détecter et éliminer les animaux infectés (séropositifs) car ces animaux sont détectés plus rapidement et à moindre coût.

L'objectif de cette partie est de décrire la variabilité des outils de diagnostic de l'infection par Map dans les troupeaux caprins. En effet, la capacité des tests à détecter les animaux infectés évolue en fonction de l'âge des animaux puisque les marqueurs évoluent au cours du temps (Salgado et al., 2005 ; Nielsen et Toft, 2008). C'est pourquoi un premier objectif a été d'estimer les qualités des tests pour la détection des animaux infectés par Map en fonction de l'âge des animaux.

Cependant, pour la maîtrise de l'infection, à défaut de détecter systématiquement les animaux infectés, il est important de pouvoir détecter les animaux excréteurs, et un deuxième objectif a été d'estimer les qualités des tests pour la détection des animaux excréteurs.

## **I - Comparaison de la qualité des tests en fonction de l'âge des animaux**

Si le diagnostic d'une forme clinique peut être considéré comme relativement aisé, le diagnostic ante-mortem d'une forme sub-clinique est beaucoup plus difficile. Différents marqueurs immunologiques ou bactériologiques peuvent être utilisés en fonction de l'évolution de l'infection. Les tests basés sur la réponse immunitaire à médiation cellulaire sont considérés comme précoces tandis que la détection des anticorps ou de la bactérie sont considérés comme des tests plus tardifs. Des tests directs, comme l'examen microscopique, la culture ou la PCR, et des tests indirects tels que l'IDG ou l'ELISA sont utilisés pour dépister l'infection sub-clinique (Geisbauer et al., 2007).

Pour contrôler l'infection par Map, il semble préférable, pour des raisons pratiques et économiques, d'utiliser un seul test plutôt qu'une association de tests. L'objectif de ce chapitre est de comparer les performances de 6 tests de diagnostic, pour différents âges :

- en estimant la sensibilité et la spécificité de chaque test,
- en calculant la concordance entre les tests.

Cette étude a été publiée dans la revue Small Ruminant Research (2009, 87, 50-56, annexe 3).

### **I - 1 - Matériel et méthodes**

#### **I-1-1- Population et prélèvements**

Cette étude a été conduite sur 480 caprins appartenant à 12 troupeaux laitiers (nommés A à L) situés en Poitou-Charentes. Les troupeaux ont été sélectionnés sur la base du volontariat de l'éleveur, à partir d'une population de statut inconnu vis-à-vis de l'infection par Map. La taille moyenne des troupeaux étudiés est de 286 chèvres (de 88 à 650).

Dans chaque troupeau, des caprins sans signes cliniques ont été sélectionnés au hasard dans 4 classes d'âge : des animaux de moins de 1 an, des animaux entre 1 et 2 ans, des animaux entre 2 et 3 ans, des animaux de plus de 3 ans, correspondant respectivement aux classes d'âge 1, 2, 3 et 4.

Du sang et des matières fécales ont été prélevés une fois et en même temps sur chaque animal pour réaliser 6 tests différents, 2 tests sur fèces pour la détection de Map (culture fécale et examen microscopique) et 4 tests sérologiques (IDG et 3 tests ELISA commerciaux). Les prélèvements fécaux individuels ont été collectés directement dans le rectum en changeant de gant pour chaque animal et environ 10 g de matières fécales ont été déposés dans 2 flacons stériles. Les prélèvements de sang (20 ml) ont été réalisés à la veine jugulaire. Tous les prélèvements (fèces et sang) ont été conservés au froid et transportés directement au laboratoire. Après coagulation et centrifugation, les sérums ont été collectés et répartis en 4 aliquots. Les prélèvements sériques et fécaux ont été congelés à -20°C avant d'être testés.

#### **I-1-2- Analyses de laboratoire**

##### **1 – Détection de Map**

###### **Examen microscopique (scopie)**

Les fèces ont été étalées sur une lame et colorées par la méthode de Ziehl-Neelsen. Puis les lames ont été observées au microscope par la même personne et pendant la même durée pour tous les prélèvements (15 minutes), comme recommandé par Martinson et al. (2008). Le prélèvement a été considéré comme positif si des BAAR regroupés en amas ont été observés (O.I.E., 2008).

## Culture

La culture a été réalisée selon la méthode de Dreier et al. (2006). Les prélèvements ont été décontaminés avec HPC etensemencés dans 4 tubes contenant du milieu de Herrold avec du jaune d'œuf, dont 3 supplémentés en mycobactine. L'incubation a été réalisée à 37 °C pendant 5 mois. La lecture des tubes a commencé 1 mois après l'ensemencement et a été réalisée tous les mois. Les colonies visibles sur le tube contenant de la mycobactine ont été confirmées par une coloration de Ziehl-Neelsen et par une PCR ciblant la séquence IS900 adapté de la procédure de Moss et al. (1992). Seules les cultures positives en PCR ont été considérées comme positives. Les différents résultats sont « positif », « négatif » ou « contaminé ». Tous les animaux avec une culture fécale considérée comme « contaminée » ont été exclus de l'analyse.

## 2 – Tests sérologiques

### Immuno-diffusion en gélose (IDG)

Pour le test d'immuno-diffusion en gélose (IDG), les gels d'agarose ont été préparés selon la méthode de Sherman et al. (1984), en utilisant comme antigène un extrait protoplasmique brut de Map (souche M. avium 18). Les boîtes ont été lues après 24 et 48 heures d'incubation à température ambiante, et le résultat a été considéré comme positif si une ligne de précipitation continue avec celle obtenue avec le contrôle positif a été observée. Un résultat a été considéré comme négatif si aucune ligne de précipitation ou si des lignes de précipitation non-spécifiques ont été observées.

### Tests ELISA

Les sérums ont été analysés avec 3 kits ELISA commerciaux : ELISA A (ELISA Paratuberculose anticorps bicupule®, Institut Pourquier, Montpellier, France), ELISA B (Herdchek M.pt®, Idexx, Cergy-Pontoise, France) et ELISA C (Kit LSI paratuberculose confirmation serum ruminants®, LSI, Lissieu, France). Tous les tests ont été réalisés selon les indications du producteur, en incluant les contrôles positif et négatif fournis dans les kits. Les 3 kits sont indiqués pour les caprins et comprennent une étape préalable d'adsorption avec *Mycobacterium phlei*, pour éliminer les réactions croisées (Yokomizo et al., 1985). Les résultats « douteux » ont été considérés comme « positifs ».

Tous les tests ont été interprétés sans connaître le résultat des autres tests.

### I-1-3- Stratégie d'analyse

La proportion (en pourcentage) de réponses positives pour chaque test a été calculée en divisant le nombre de réponses positives pour ce test par le nombre total d'animaux testés dans la population. Pour chacun des 6 tests, le test du  $\chi^2$  a été utilisé pour comparer la proportion de réponses positives selon le troupeau d'origine (A-L) et selon l'âge des animaux. Pour chaque classe d'âge, la sensibilité et la spécificité des 6 tests a été estimée par des méthodes bayésiennes avec une dépendance conditionnelle entre les tests, selon la méthode décrite par Dendukuri et al. (2009). En effet, les tests sérologiques sont dépendants car ils mesurent le même phénomène biologique (la production d'anticorps). Pour la même raison, les tests fécaux, qui mesurent l'excrétion fécale de Map, sont également dépendants. Deux variables latentes ont été définies : la variable « AC » (anti-corps) et la variable « EF » (excrétion fécale). Les tests IDG et ELISA sont considérés comme dépendants de « AC » et la culture fécale et la scopie sont considérées comme dépendantes de « EF ». Des priors non informatifs ont été utilisés et les estimations ont été calculées avec le programme BLCM

version 1.3 (BayesLatentClassModels), <http://www.medicine.mcgill.ca/epidemiology/Dendukuri>.

La concordance entre les résultats obtenus par les différentes paires de tests a été mesurée par le coefficient kappa ( $\kappa$ ). L'interprétation des valeurs du coefficient kappa a été réalisée comme décrit par Landis et Koch (1977) : la concordance est considérée comme « très mauvaise » si  $\kappa < 0,00$ , « mauvaise » si  $0,00 < \kappa < 0,20$ , « médiocre » si  $0,21 < \kappa < 0,40$ , « modérée » si  $0,41 < \kappa < 0,60$ , « bonne » si  $0,61 < \kappa < 0,80$  et « excellente » si  $0,81 < \kappa < 1,00$ . La concordance a été considérée comme « bonne » si le coefficient kappa est supérieur à 0,60 et « faible » dans les autres cas.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec Winepiscope 2.0 pour la détermination du coefficient kappa (Thrusfield et al., 2001) et avec Systat (version 9.01, SPSS Inc., 1998) pour le calcul du chi-deux ( $\chi^2$ ), en utilisant la correction de Yates pour les cases avec des fréquences faibles. Les différences ont été considérées comme significatives pour  $p < 0,05$ .

## I - 2 - Résultats

Parmi les 480 caprins prélevés, seuls ont été inclus dans l'analyse les caprins pour lesquels les résultats de tous les tests étaient disponibles ( $n = 412$ ).

### I-2-1- Résultats aux tests selon le troupeau

La distribution des réponses positives dans les différents troupeaux est représentée dans le Tableau 20. La proportion de réponses positives à au moins 1 test est de 19%. La prévalence apparente, estimée par la proportion de caprins avec au moins 1 test positif, varie de 0 à 50 %, selon les troupeaux, (entre 0 et 28 % pour 1 test).

A l'exception de l'IDG, la proportion de réponses positives diffère significativement entre les troupeaux.

### I-2-2- Résultats aux tests selon l'âge

La distribution des réponses positives en fonction de la classe d'âge est représentée dans le Tableau 21, ainsi que la répartition des caprins.

Dans la classe d'âge 1, seuls la scopie, la culture fécale et l'ELISA B ont donné des réponses positives (avec respectivement, 4 % (4/104), 8 % (8/104) et 2 % (2/104)) tandis que tous les tests ont donné des réponses positives pour les classes d'âge 2, 3 et 4.

Globalement, la distribution des réponses positives à chaque test a été significativement différente selon la classe d'âge pour les tests sérologiques (IDG, ELISA A, ELISA B et ELISA C), avec des proportions plus élevées pour les classes 2 et 3 et des proportions plus faibles pour la classe 1. Les proportions de réponses positives pour l'IDG ont été inférieures à celles des tests ELISA. La distribution des réponses positives à la culture fécale a également été significativement différente selon les classes d'âge, avec des proportions plus élevées pour les classes 2 et 3, et une proportion plus faible pour la classe 4. Pour la scopie, les proportions de réponses positives dans chaque classe ont été inférieures à celles de la culture fécale et non significativement différentes entre classes.

La proportion de caprins avec au moins une réponse positive n'a pas été significativement différente entre les classes d'âge 1, 2, 3 et 4 (respectivement, 11,5%, 25,0%, 21,8%, 18,4%).

Tableau 20 : Fréquence et proportion de réponses positives pour chaque test de diagnostic de l'infection par Map dans les échantillons de 12 troupeaux caprins

Troupeaux		Nombre de réponses positives						Au moins 1 test positif
Identification	n <sup>a</sup>	IDG <sup>b</sup>	ELISA A	ELISA B	ELISA C	Scopie	CF <sup>c</sup>	
A	21	0	0	2	0	3	0	4 (19,0 %)
B	40	1	2	2	2	0	5	6 (15,0 %)
C	22	0	0	0	0	0	0	0 (0,0 %)
D	36	1	1	2	1	0	2	3 (8,3 %)
E	40	0	0	0	0	0	0	0 (0,0 %)
F	40	1	7	8	10	1	11	20 (50,0 %)
G	40	0	0	2	0	0	0	2 (5,0 %)
H	30	0	0	1	2	2	0	4 (13,3 %)
I	40	4	6	11	8	1	3	12 (30,0 %)
J	40	2	6	6	7	6	6	12 (30,0 %)
K	40	3	7	9	8	0	8	13 (32,5 %)
L	23	0	0	0	0	3	1	3 (13,0 %)
Total	412	12 (2,9 %)	29 (7,0 %)	43 (10,4 %)	38 (9,2 %)	16 (3,8 %)	36 (8,7 %)	79 (19,2 %)
Différences entre troupeaux <sup>d</sup>		NS	S	S	S	S	S	

a : nombre de chèvres avec des résultats complets pour les 6 tests

b : Immuno-Diffusion en Gélose

c : culture fécale

d : NS = non significatif, S = Significatif à p <0,05

Tableau 21 : Fréquence et proportion de réponses positives pour chaque test de diagnostic de l'infection par Map chez 412 chèvres selon leur classe d'âge

Age	n <sup>a</sup>	Nombre de réponses positives						Au moins 1 test positif
		IDG <sup>b</sup>	ELISA A	ELISA B	ELISA C	Scopie	CF <sup>c</sup>	
< 1 an	104	0	0	2	0	4	8	12 (11,5 %)
1 – 2 ans	104	5	10	14	13	3	13	26 (25,0 %)
2 – 3 ans	101	6	14	13	16	6	12	22 (21,8 %)
> 3 ans	103	1	5	14	9	3	3	19 (18,4 %)
Total	412	12 (2,9 %)	29 (7,0 %)	43 (10,4 %)	38 (9,2 %)	16 (3,8 %)	36 (8,7 %)	79 (19,2 %)
Différences <sup>d</sup> (p <0,05)		S	S	S	S	NS	S	NS

a : nombre de chèvres avec des résultats complets pour les 6 tests

b : Immuno-Diffusion en Gélose

c : culture fécale

d : NS = non significatif, S = Significatif

### I-2-3- Sensibilité et spécificité des 6 tests dans chaque classe d'âge

Les sensibilités et les spécificités des 6 tests ont été très différentes pour les différentes classes d'âge (Tableau 22). Les spécificités sont supérieures aux sensibilités.

Les valeurs de sensibilité les plus élevées ont été obtenues dans la classe 3, avec la meilleure valeur pour l'ELISA C (76,6%, IC à 95% = 46,1-96,1%). Pour les autres classes, les sensibilités des 6 tests ont été très faibles : elles ont toutes été inférieures à 10 %, sauf la sensibilité de l'ELISA B pour la classe 4. Pour la classe 1, la sensibilité la plus élevée a été obtenue pour la culture fécale, alors que pour les classes 2 et 4, la sensibilité la plus élevée a été obtenue pour l'ELISA B. A l'exception de la classe 4, la sensibilité de la culture fécale a été supérieure à celle de la scopie.

Pour les classes 1, 3 et 4, la spécificité la plus élevée a été obtenue pour l'IDG, alors que pour la classe 2, la spécificité la plus élevée a été obtenue pour la scopie. Les valeurs de spécificités les plus élevées pour l'IDG, l'ELISA A et l'ELISA C ont été obtenues dans la classe 1, alors que les valeurs de spécificités les plus élevées pour l'ELISA B, la scopie et la culture fécale ont été obtenues pour la classe 3.

### I-2-4- Concordance entre les tests

Le Tableau 23 récapitule la concordance entre les paires de tests pour chaque classe.

Pour la classe 1, à cause du très faible nombre de réponses positives, la concordance entre certaines paires de tests est égale à 0 ou n'a pas pu être déterminée (indiquée comme ND dans le Tableau 23).

La concordance entre l'IDG et les 3 tests ELISA est « faible » pour les classes 2, 3 et 4.

La concordance entre les 3 tests ELISA est « bonne » pour les classes 2 et 3. Les meilleures concordances ont été observées entre l'ELISA A et l'ELISA B pour la classe 3, et entre l'ELISA A et l'ELISA C pour la classe 2. Pour la classe 4, la concordance est « bonne » entre l'ELISA A et l'ELISA C, mais pas entre l'ELISA B et l'ELISA A, ni entre l'ELISA B et l'ELISA C.

La concordance entre la scopie et la culture fécale est « faible », quel que soit l'âge des caprins. Les concordances entre les tests indirects et les tests directs sont « faibles », pour les classes 2 et 4. Pour la classe 3, l'ELISA A, l'ELISA B, l'ELISA C et la culture fécale ont une concordance « bonne » ou presque « bonne ».

Tableau 22 : Sensibilités et spécificités de chaque test de diagnostic de l'infection par Map dans les différentes classes d'âge (IC 95%) chez 412 chèvres

Test	Se/Sp <sup>a</sup>	Age			
		< 1 an	1 - 2 ans	2 - 3 ans	> 3 ans
		(n=104)	(n=104)	(n=101)	(n=103)
IDG <sup>b</sup>	Se	1,5 (0,1;21,7)	3,4 (0,7;35,2)	34,3 (15,3;59,3)	2,7 (0,3;29,9)
ELISA A	Se	1,6 (0,2;21,8)	4,3 (0,6;70,4)	75,5 (44,5;96,2)	5,5 (0,8;68,8)
ELISA B	Se	3,4 (0,8;31,6)	9,3 (3,8;65,3)	70,0 (40,7;92,3)	14,7 (6,2;83,4)
ELISA C	Se	1,5 (0,2;21,6)	6,5 (1,3;79,9)	76,6 (46,1;96,1)	9,4 (2,2;83,3)
Scopie	Se	4,3 (0,2;80,1)	2,2 (0,1;30,6)	16,7 (3,3;43,2)	4,4 (0,5;51,6)
CF <sup>c</sup>	Se	7,9 (0,6;81,3)	7,8 (0,8;69,4)	71,2 (39,9;97,1)	2,9 (0,1;85,1)
IDG	Sp	97,8 (67,4;99,8)	78,9 (49,0;98,1)	97,6 (93,3;99,5)	95,0 (64,6;99,6)
ELISA A	Sp	97,6 (66,0;99,8)	51,5 (12,7;98,2)	95,9 (88,8;99,4)	79,3 (22,6;98,9)
ELISA B	Sp	95,4 (55,7;99,1)	54,2 (18,4;93,6)	96,1 (89,6;99,5)	67,1 (11,9;93,4)
ELISA C	Sp	97,6 (67,6;99,8)	44,6 (7,1;96,9)	93,6 (86,2;98,1)	70,3 (11,6;97,4)
Scopie	Sp	88,2 (8,0 ; 99,6)	85,1 (45,9;99,6)	94,7 (88,5;98,3)	94,1 (38,7;99,7)
CF	Sp	82,3 (9,4;99,4)	53,3 (12,0;96,4)	97,3 (91,3;99,9)	82,1 (9,4;99,8)

a : Se : sensibilité et Sp : spécificité  
b : IDG : Immuno-Diffusion en Gélose  
c : CF : Culture Fécale

Tableau 23 : Concordance entre les paires de tests pour le diagnostic de l'infection par Map selon la classe d'âge chez 412 chèvres : coefficient Kappa (IC 95%)

Tests comparés	Age			
	< 1 an	1 - 2 ans	2 - 3 ans	> 3 ans
	(n=104)	(n=104)	(n=101)	(n=103)
IDG <sup>a</sup> vs ELISA A	ND <sup>c</sup>	0,50 (0,32;0,68)	0,56 (0,39;0,74)	0,32 (0,18;0,46)
IDG vs ELISA B	0,00 (-1,00;1,00)	0,38 (0,21;0,54)	0,60 (0,42;0,78)	0,12 (0,03;0,21)
IDG vs ELISA C	ND	0,40 (0,23;0,57)	0,50 (0,34;0,67)	0,19 (0,07;0,30)
ELISA A vs ELISA B	0,00 (-1,00;1,00)	<b>0,62<sup>d</sup></b> (0,44;0,81)	<b>0,96</b> (0,77;1,00)	0,49 (0,33;0,66)
ELISA A vs ELISA C	ND	<b>0,85</b> (0,66;1,00)	<b>0,92</b> (0,73;1,00)	<b>0,69</b> (0,51;0,88)
ELISA B vs ELISA C	0,00 (-1,00;1,00)	<b>0,62</b> (0,43;0,81)	<b>0,88</b> (0,69;1,00)	0,56 (0,38;0,75)
Scopie vs CF <sup>b</sup>	0,12 (-0,06;0,30)	-0,05 (-0,19;0,10)	0,04 (-0,14;0,22)	-0,03 (-0,22;0,16)
Scopie vs IDG	0,00 (-0,96;0,96)	-0,04 (-0,22;0,15)	0,12 (-0,08;0,31)	-0,01 (-0,18;0,15)
Scopie vs ELISA A	0,00 (-0,96;0,96)	0,28 (0,12;0,43)	0,13 (-0,04;0,30)	-0,04 (-0,22;0,15)
Scopie vs ELISA B	0,32 (0,14;0,50)	0,07 (-0,07;0,22)	0,14 (-0,03;0,32)	-0,05 (-0,19;0,09)
Scopie vs ELISA C	0,00 (-0,96;0,96)	0,21 (0,07;0,36)	0,21 (0,04;0,37)	0,13 (-0,04;0,29)
CF vs IDG	0,00 (-0,67;0,67)	0,52 (0,35;0,69)	0,40 (0,22;0,58)	0,49 (0,33;0,66)
CF vs ELISA A	0,00 (-0,67;0,67)	0,27 (0,08;0,46)	<b>0,65</b> (0,46;0,84)	0,48 (0,30;0,67)
CF vs ELISA B	-0,03 (-0,18;0,12)	0,28 (0,09;0,47)	0,59 (0,40;0,78)	0,20 (0,06;0,34)
CF vs ELISA C	0,00 (-0,67;0,67)	0,38 (0,19;0,58)	0,59 (0,40;0,78)	0,30 (0,14;0,47)

a: IDG : Immuno-Diffusion en Gélose

b : CF : Culture Fécale

c :ND: Non déterminé

d: en gras : bon agrément (kappa > 0,60)

### I - 3 - Discussion

L'objectif de cette étude était de décrire les performances de 6 tests, en l'absence de Gold Standard, pour la détection de l'infection par Map, en fonction de l'âge, ainsi que la concordance entre ces différents tests. A notre connaissance, il s'agit de la première étude qui compare les réponses aux tests sérologiques et fécaux en fonction de l'âge des animaux, sur un grand effectif de caprins (n = 412) sans signes cliniques de paratuberculose. La sensibilité et la spécificité des différents tests, ainsi que leurs concordances, n'ont pas été estimées sur l'ensemble de la population prélevée parce que l'échantillonnage a été réalisé de façon à avoir un nombre équivalent de caprins dans chaque classe d'âge, et donc l'échantillon global n'est pas représentatif de la population. Comme estimées par les réponses aux tests, les variations entre troupeaux sont importantes (de 0 à 50 % de réponses positives).

A l'exception de la classe 3, les sensibilités des 6 tests sont faibles, ce qui indique que les tests ne sont pas capables de détecter tous les caprins infectés par Map. Pour la classe 3, le classement des tests selon leur sensibilité est le suivant : ELISA C, ELISA A, culture fécale, ELISA B, IDG et scopie avec respectivement 76,6%, 75,5%, 71,2%, 70,0%, 34,3% et 16,7%. Mais, étant donné l'amplitude de l'intervalle de confiance à 95%, ces estimations ne sont pas très précises. Les estimations des spécificités sont plus précises. Comme décrit précédemment par Lilenbaum et al. (2007), la présente étude confirme que l'IDG et la scopie ne sont pas des méthodes très sensibles. Pour les tests ELISA, les sensibilités sont élevées et la concordance entre les tests est « excellente » dans cette classe d'âge.

Les sensibilités et les spécificités ont été estimées par des méthodes bayésiennes, aucun test n'étant considéré comme la référence. Les sensibilités et les spécificités ont été estimées par comparaison avec un statut latent. Les modèles « latent class » ont été initialement développés par Hui et Walter (1980) pour 2 tests indépendants. Les tests peuvent être considérés comme conditionnellement indépendants s'ils ne mesurent pas le même phénomène biologique (Gardner et al., 2000). Ces dernières années, des modèles bayésiens avec des dépendances conditionnelles ont été développés pour des tests qui mesurent le même phénomène biologique. Dans cette étude, les 4 tests sérologiques sont conditionnellement dépendants et mesurent le niveau des anticorps. Les 2 tests fécaux sont aussi conditionnellement dépendants et mesurent l'excrétion fécale de Map. Le modèle développé par Dendukuri et al. (2009) a été adapté à ces 2 variables latentes. Pour les méthodes bayésiennes, les informations *a priori* (priors) peuvent être utilisées. Elles peuvent être informatives (c'est-à-dire basées sur des études antérieures ou sur l'opinion d'experts) ou non-informatives (ou uniformes). L'utilisation de priors non-informatifs traduit notre ignorance des performances des tests selon l'âge et induit un intervalle de confiance plus large.

Les études utilisant les méthodes « latent-class » pour déterminer la sensibilité et la spécificité des tests sont peu nombreuses. Dans une étude précédente (cf chapitre A-I), nous avons estimé les qualités pour le diagnostic de l'infection par Map chez des caprins de tous âges de 2 tests : la culture fécale et un test ELISA du commerce (ELISA Paratuberculose anticorps bicupule®, Institut Pourquier, Montpellier, France). Ainsi, pour la culture fécale, la sensibilité et la spécificité ont été estimées à respectivement 34 et 99%, tandis que pour le test ELISA, la sensibilité et la spécificité ont été estimées à respectivement 53 et 100%. Dans la présente étude, réalisée pour évaluer les capacités des tests à détecter l'infection par Map, sur des animaux âgés de 2 à 3 ans la culture fécale et le même test ELISA ont fourni de meilleures estimations pour les sensibilités (avec 71% pour la culture fécale et 75% pour le test ELISA) et des estimations du même ordre de grandeur pour les spécificités (avec 97% pour la culture fécale et 96 % pour le test ELISA). L'infection par Map peut être détectée de façon plus fiable chez les caprins âgés de 2 à 3 ans.

Nos résultats montrent que la culture fécale peut être positive chez des caprins de moins de 1 an (classe 1), et donc que l'excrétion de Map peut avoir lieu dès la première année. Par conséquent, les caprins de moins de 1 an sont capables de transmettre la bactérie. L'excrétion fécale de Map par des caprins entre 8 et 12 mois avait déjà été rapportée pour des caprins infectés expérimentalement (Munjal et al., 2007 ; Storset et al., 2001 ; Stewart et al., 2006) ainsi que pour des veaux de moins de 1 an infectés expérimentalement (McDonald et al., 1999). L'excrétion fécale de Map a également été détectée chez des veaux naturellement infectés de moins de 1 an (Antognoli et al., 2007 ; Van Roermund et al., 2007). Cependant, ces tests ne peuvent pas faire la différence entre la présence de Map dans les fèces suite à un passage à travers l'intestin (transfert passif) et une excrétion active liée à l'infection (Antognoli et al., 2007 ; Van Roermund et al., 2007).

L'ELISA B a également donné des résultats positifs chez les caprins de moins de 1 an mais la proportion de réponses positives a été très faible. Sur des caprins infectés expérimentalement, des études ont obtenu des réponses positives aux tests ELISA sur des caprins de 8 à 12 mois (Sigurdardottir et al., 1999 ; Storset et al., 2001 ; Munjal et al., 2007). Pour des veaux naturellement infectés, Antognoli et al. (2007) ont montré que certains veaux pouvaient avoir des réponses positives en ELISA avant l'âge de 8 mois. Comme l'ELISA B a présenté une concordance faible avec la culture fécale, il n'est pas possible d'établir si l'excrétion fécale mise en évidence par la scopie et la culture fécale correspond à une excrétion passive ou active. Pour les caprins de moins de 1 an, la détection des réactions immunitaires à médiation cellulaire par le test intra-dermique ou par le test de dosage de l'IFN $\gamma$  semble plus indiquée car elle est considérée comme plus précoce.

Les concordances entre les 3 tests ELISA sont « bonnes » pour la classe 3. Nos résultats sont conformes à la plupart de ceux obtenus chez les bovins (Collins et al., 1991 ; Collins et al., 2005 ; Clark et al., 2008) : la concordance entre les tests ELISA est bonne à excellente (kappa compris entre 0,77 et 0,85). Cependant, McKenna et al. (2006) ont trouvé une concordance mauvaise à médiocre entre 3 tests ELISA commerciaux, avec un manque de concordance essentiellement sur les échantillons positifs. Nos résultats montrent que la détection des chèvres infectées par Map dans la classe 3 peut être réalisée indifféremment par 1 des 3 tests ELISA.

Pour les caprins de plus de 3 ans (classe 4), les proportions de réponses positives ont été plus faibles que celles obtenues pour les autres classes pour tous les tests sauf pour l'ELISA B. Dans cette classe d'âge, les chèvres infectées ont une probabilité plus grande d'être mortes ou d'avoir été réformées puisque les signes cliniques de la paratuberculose apparaissent principalement sur des caprins de plus de 2 ans. Par conséquent, les chèvres de plus de 3 ans présentes dans les troupeaux, ont une probabilité plus grande de ne pas être infectées, et donc de donner des réponses négatives aux tests.

Les tests utilisés dans cette étude ont une plus grande probabilité de détecter l'infection à un stade tardif. Pour détecter les stades précoces, les tests basés sur les réponses immunitaires à médiation cellulaire (test intra-dermique, test de dosage de l'interféron) sembleraient être plus appropriés, mais ils ne sont pas encore utilisables en routine. Toutefois, il serait intéressant dans une prochaine étude, de mesurer les réponses immunitaires à médiation cellulaire en fonction de l'âge des caprins.

#### I - 4 - Conclusion

Grâce à des valeurs élevées de sensibilité et de spécificité, l'ELISA permet la détection de l'infection par Map sur les chèvres âgées de 2 à 3 ans. Pour les autres classes, aucun test n'est suffisamment sensible pour détecter les caprins infectés par Map. Dans un programme de lutte contre l'infection par Map, des tests ELISA, réalisés de préférence sur des caprins entre 2 et 3

ans, peuvent être utilisés au niveau troupeau pour définir le statut ou estimer la prévalence, mais, en raison de leur faible sensibilité, ils ne peuvent pas être utilisés au niveau individuel pour détecter les chèvres infectées. En effet, une élimination des seules chèvres positives ne permet pas d'éliminer toutes les chèvres infectées.

## **II - Qualité des tests pour la détection de l'excrétion**

L'étude précédente a montré qu'un test ELISA réalisé sur des caprins entre 2 et 3 ans pouvait détecter l'infection par Map avec une sensibilité comprise entre 70 et 77 % et une spécificité comprise entre 94 et 96 % (Mercier et al., 2009). La détection des animaux infectés par Map permet ainsi de déterminer la prévalence de l'infection au niveau des troupeaux, d'une région ou d'un pays. En revanche, au niveau individuel, la sensibilité du test ELISA est trop faible pour détecter avec certitude tous les animaux infectés : le test ELISA n'est donc pas suffisamment fiable pour sélectionner les animaux devant être éliminés dans le but d'assainir les élevages infectés. Cependant, pour la maîtrise de l'infection, à défaut de détecter systématiquement les animaux infectés, il est important de pouvoir détecter les animaux excréteurs, qui sont la principale source de contamination de l'environnement, et qui doivent être éliminés en priorité (Spangler et al., 1992). L'essentiel de cette excrétion est effectuée dans les matières fécales.

Au sein d'un troupeau confronté à la paratuberculose, Nielsen et Toft (2008) ont défini 3 statuts d'animaux :

- des animaux infectés : ce sont ceux qui présentent des réactions immunitaires,
- des animaux infectieux : ce sont ceux qui excrètent la bactérie, principalement par voie fécale. A l'exception des animaux présentant une excrétion passive (Sweeney et al., 1992c), ce sont aussi des animaux infectés.
- des animaux atteints : ce sont ceux qui présentent les signes cliniques de la paratuberculose. Ce sont également des animaux infectieux et des infectés.

On observe en effet que l'excrétion fécale est possible avant l'apparition des signes cliniques (Clarke, 1997). Même si l'excrétion de la bactérie peut intervenir à n'importe quel stade de l'infection, elle devient permanente et importante avec l'extension des lésions d'infection (Chiodini, 1996). Les quantités de bacilles excrétées en début d'infection sont faibles et l'excrétion est intermittente, en particulier chez les animaux faiblement excréteurs. L'excrétion intermittente peut également être liée à une détection intermittente par la culture (Ris et al., 1988) due à une distribution hétérogène de Map dans les fèces. Du fait de cette distribution hétérogène, les bactéries peuvent être absentes dans la prise d'essai, ce qui conduit à l'obtention d'un résultat faussement négatif.

La détection de l'excrétion sur animaux vivants fait appel à 2 principales méthodes, la culture et la PCR, réalisés sur des prélèvements fécaux.

La culture est considérée comme peu sensible mais très spécifique. Par ailleurs, c'est une méthode longue (lecture au bout de 6 à 12 semaines).

La PCR, qui repose sur la détection de la séquence IS900, est une méthode rapide et elle permet de détecter des souches de Map difficiles à cultiver (Gwozdz et al., 1997). Bien que aussi coûteuse que la culture, la PCR est considérée comme plus sensible (Gwozdz et al., 1997 ; Grant et al., 2000 ; Fang et al., 2002), mais les réserves concernant la prise d'essai s'appliquent également. Par ailleurs, les fèces peuvent contenir des inhibiteurs de la PCR (Cousins et al., 1995 ; Dimareli-Malli et al., 2009). La spécificité est considérée comme bonne mais la séquence IS900 a cependant été identifiée chez *Mycobacterium cookii* (Cousins et al., 1995 ; Lilenbaum et al., 2007), ce qui pourrait altérer la spécificité de la PCR.

En raison de l'excrétion intermittente de la bactérie dans les prélèvements fécaux et de la faible sensibilité du test PCR et de la culture fécale, le statut infectieux des animaux a été défini par la répétition des tests, comme recommandé par Nielsen et Toft (2006).

D'autres tests sont utilisés pour le diagnostic ante-mortem des différents statuts liés à l'infection par Map (Nielsen et Toft, 2008). Il s'agit de 2 tests immunologiques : le test ELISA et le test de dosage de l'Interféron gamma (IFN $\gamma$ ).

Le test ELISA met en évidence des réactions humorales (production d'anticorps). Ses performances pour la détection des animaux infectieux, telles qu'elles ressortent de la littérature chez la chèvre (Nielsen et Toft, 2008) sont : une sensibilité variant entre 54 et 92 %, tandis que la spécificité est de l'ordre de 95 %.

Le test de dosage de l'IFN $\gamma$  est un test qui détecte les réactions immunitaires à médiation cellulaire. Celles-ci sont les premières à se mettre en place après l'infection et sont les seules capables de détruire Map, en raison de la position intra-cellulaire de cette bactérie (Chiodini, 1996). Une production importante d'IFN $\gamma$  en début d'évolution pourrait donc éliminer la bactérie et provoquer une guérison ; dans ce cas, la production d'IFN $\gamma$  n'est pas suivie d'excrétion, ni de production d'anticorps. La production d'IFN $\gamma$ , qui traduit l'exposition de l'individu à Map, pourrait donc être détectée chez des individus guéris, induisant ainsi des réactions faussement positives vis-à-vis de l'infectiosité, mais les données de la littérature montrent que ce test peut être utilisé pour détecter des animaux excréteurs (Nielsen et Toft, 2008). Ses performances n'ont pas été évaluées chez les caprins. Chez les bovins, pour les animaux excréteurs, la sensibilité a été estimée à 13 % et la spécificité a été estimée à 88 % avec le PPDa (issu de *Mycobacterium avium*). L'estimation de la sensibilité est plus élevée quand la stimulation est réalisée avec le PPDj (issu de Map) (Nielsen et Toft, 2008).

Ces deux tests qui reposent sur des bases biologiques différentes (le test ELISA et le test de dosage de l'IFN $\gamma$ ) peuvent donc être utilisés pour détecter les animaux excréteurs.

L'objectif de l'étude est donc d'évaluer l'intérêt de l'utilisation des tests immunologiques moins coûteux (dosage de l'IFN $\gamma$  et dosage des anticorps par ELISA) pour la détection des animaux excréteurs, par comparaison aux résultats obtenus par la répétition des tests PCR, ce test ayant été choisi, après comparaison avec la culture fécale dans cette étude, en raison de sa plus grande sensibilité. Cette évaluation a été menée au cours d'un suivi de 2,5 ans ; des analyses répétées dans le temps ont été effectuées pour tenir compte de la faible sensibilité des tests immunologiques. Nous avons choisi de réaliser l'étude dans un troupeau caprin naturellement infecté, afin d'obtenir des données correspondant à l'évolution naturelle de l'infection et donc correspondant aux situations susceptibles d'être observées dans les élevages.

## II - 1 - Matériel et méthodes

### II-1-1- Animaux

Un suivi de cohorte de 2,5 ans a été mis en place dans 1 troupeau caprin (n = 350) naturellement infecté par Map et situé dans l'ouest de la France. Les animaux ont été intégrés dans le suivi à leur naissance et ont été prélevés 4 fois (C1, C2, C3 et C4) : les premiers prélèvements ont été effectués entre 250 et 300 jours, les deuxièmes prélèvements ont été effectués entre 430 et 480 jours, les troisièmes prélèvements ont été effectués entre 650 et 700 jours et les quatrièmes prélèvements ont été effectués entre 890 et 940 jours.

A chacune des visites, les prélèvements suivants ont été effectués :

- fèces : des prélèvements d'environ 5 g ont été récoltés directement dans le rectum, en changeant de gant pour chaque chèvre, et ont été placés dans des pots stériles. Puis les échantillons ont été congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant plusieurs mois.

- sang : 5 ml ont été prélevés sur tube sec et 5 ml ont été prélevés dans un tube contenant un anticoagulant (héparine). Après coagulation et centrifugation, les sérums ont été récoltés à partir des prélèvements de sang et ont été conservés au congélateur à -20°C. Les prélèvements de sang ont été analysés dès leur arrivée au laboratoire (environ 4 heures après le prélèvement).

## II-1-2- Analyses

### 1 – Culture

La culture a été réalisée sur les prélèvements fécaux en suivant la norme NF U47-103. En bref, la décontamination a été réalisée à l'aide de chlorure d'hexacétylpyridinium (HPC) à 0,75% pendant 18 heures à température ambiante sur un échantillon de 2 grammes de fèces. Puis la suspension obtenue a étéensemencée sur le milieu de Herrold, avec du jaune d'œuf et de l'amphotéricine B et de la mycobactine. Quatre tubes (dont un sans mycobactine) ont étéensemencés et mis à incuber à 37°C pendant 5 mois. La lecture a été réalisée à 4, 8, 12 et 18 semaines. Les colonies visibles dans les tubes avec mycobactine ont été confirmées par coloration de Ziehl-Neelsen et par PCR. Seules les cultures positives en PCR ont été considérées comme positives.

### 2 - PCR

L'extraction de l'ADN a été effectuée sur un autre échantillon de 1 g de fèces du même prélèvement, avec le kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). L'amplification par PCR en temps réel a été effectuée avec le kit TaqVet M.paratuberculosis (Laboratoire Service International, Lissieu, France) conçu pour détecter la séquence d'insertion IS900. Les résultats ont été interprétés en fonction du Ct (Threshold Cycle) obtenu pour chaque échantillon : si le Ct > 45, l'échantillon a été considéré comme négatif, si le Ct < 45, l'échantillon a été considéré comme positif.

### 3 – Sérologie ELISA

Les sérums ont été testés avec un kit du commerce et selon les instructions fournies par le producteur (ELISA Paratuberculose anticorps bicupule®, Institut Pourquier, Montpellier, France). Ce kit mesure les anticorps dirigés contre Map et comprend une étape d'adsorption avec *M. phlei*, qui permet de supprimer les anticorps non spécifiques, comme recommandé par Yokomizo et al. (1985). Sur des plaques de 96 puits, 46 échantillons de sérums ont été testés (test bicupule). Les contrôles positif et négatif fournis par le producteur ont été disposés sur chaque plaque. Les plaques ont été lues (à 450 nm) avec un lecteur de plaques automatique relié à un ordinateur. Pour chaque sérum, le pourcentage E/P a été calculé selon la formule suivante :

$$\% E/P = \frac{\text{DO de l'échantillon à tester} - \text{DO moyenned du contrôle négatif}}{\text{DO moyenned du contrôle positif} - \text{DO moyenned du contrôle négatif}} \times 100$$

Un échantillon a été considéré comme positif si le pourcentage E/P est supérieur à 60 %.

#### 4– Test de l’interféron gamma (IFN $\gamma$ )

Il s’agit d’un test qui exploite la mémoire immunitaire des lymphocytes : après un contact avec un antigène, les lymphocytes produisent de l’IFN $\gamma$  lors d’un nouveau contact avec l’antigène.

Ce test comprend 2 étapes : une étape de stimulation des lymphocytes qui induit le cas échéant la production d’IFN $\gamma$ , puis une étape de dosage de l’IFN $\gamma$ .

##### Stimulation des lymphocytes

La stimulation des lymphocytes a été effectuée dans les 4 heures qui ont suivi le prélèvement. Chaque échantillon de sang a été stimulé avec 2 antigènes différents, selon le protocole fourni par le producteur :

- N : PBS stérile (antigène neutre),
- A : Tuberculine aviaire PPDa issue de *M. avium* (Bovigam, AES, Bruz, France) à la concentration de 0,3 mg/ml.

Chaque échantillon de sang a été réparti dans 2 puits à raison de 1,5 ml par puits, puis les antigènes (100  $\mu$ l/puits) ont été déposés dans les différents puits comme indiqué par le plan de plaque (Tableau 24).

Puis les plaques ont été mises à incuber dans une étuve à 37°C pendant une nuit (18h environ) sous atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub>. A l’issue de l’incubation, les plaques ont été centrifugées à 500g pendant 10 minutes environ à température ambiante (22°C +/- 5°C). Ensuite 500  $\mu$ l de plasma ont été récupérés dans chaque puits et stockés à -20°C dans des plaques de 96 puits.

Tableau 24 : Plan de la plaque de stimulation (24 puits)

Ag	N	A	N	A	N	A
	1	2	3	4	5	6
A	Ech 1	Ech 1	Ech 5	Ech 5	Ech 9	Ech 9
B	Ech 2	Ech 2	Ech 6	Ech 6	Ech 10	Ech 10
C	Ech 3	Ech 3	Ech 7	Ech 7	Ech 11	Ech 11
D	Ech 4	Ech 4	Ech 8	Ech 8	Ech 12	Ech 12

Ech 1 = animal à tester n°1      ....

Si les lymphocytes avaient été préalablement au contact de l’antigène, la stimulation a induit la libération par les lymphocytes d’IFN $\gamma$  qui va se retrouver dans le plasma.

##### Dosage de l’interféron-gamma (IFN $\gamma$ )

Le dosage de l’IFN $\gamma$  présent dans le plasma a été réalisé avec un test ELISA (« BioSource bovine IFN $\gamma$  EASIA ® », Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Chaque plasma a été testé 2 fois. Des témoins positifs (pur et dilué au 1/2) et négatifs testés en double ont été inclus dans la plaque (Tableau 25). Les DO des différents puits de la plaque ELISA ont été lues avec un spectrophotomètre à 450 nm.

La réponse obtenue suite à la stimulation a été comparée avec celle obtenue avec l’antigène neutre. Pour chaque plasma à tester le ratio suivant a été calculé (Storset et al., 2005) :

$$\Delta DO = \frac{\text{moyenne DO}_{\text{puits stimulés par PPD}} - \text{moyenne DO}_{\text{puits PBS}}}{\text{moyenne DO}_{\text{puits contrôle positif}} - \text{moyenne DO}_{\text{puits contrôle négatif}}}$$

Tout échantillon dont  $\Delta DO$  est supérieure ou égale à 0,2 a été considéré comme positif ; tout échantillon dont  $\Delta DO$  est inférieure à 0,2 a été considéré comme négatif (Storset et al., 2005).

Tableau 25 : Plan de la plaque pour le dosage de l'IFN gamma (96 puits)

A	P	P	P/2	P/2	N	N	22	22	30	30	38	38
B	1	1	8	8	15	15	23	23	31	31	39	39
C	2	2	9	9	16	16	24	24	32	32	40	40
D	3	3	10	10	17	17	25	25	33	33	41	41
E	4	4	11	11	18	18	26	26	34	34	42	42
F	5	5	12	12	19	19	27	27	35	35	43	43
G	6	6	13	13	20	20	28	28	36	36	44	44
H	7	7	14	14	21	21	29	29	37	37	45	45
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Plasmas stimulés avec :

antigène N
  antigène A

P = contrôle positif    P/2 = contrôle positif dilué au demi    N = contrôle négatif  
 1 = plasma animal n°1    2 = plasma animal n°2    3 = .....

## 5 – Autopsies

Les animaux morts ou réformés au cours du suivi ont été autopsiés. Avant l'autopsie, les animaux de réforme ont été euthanasiés par injection intra-veineuse de 1,82 g de pentobarbital sodique (Doléthal, Vétoquinol, Lure, France). Les prélèvements suivants ont été réalisés sur chaque animal : jéjunum, iléum, caecum, colon, rectum, nœud lymphatique mésentérique. Les prélèvements ont été fixés dans une solution de formol à 10%, inclus dans la paraffine puis découpés en fines sections (5  $\mu$ m). Les lames ont été colorées par la méthode de Ziehl-Neelsen (ZN) pour mettre en évidence des bacilles acido-alccolo-résistants (BAAR). La lecture a été effectuée au microscope à immersion (objectif 100) : une lame a été considérée comme positive si des BAAR regroupés en amas ont été observés (O.I.E., 2008).

### II-1-3- Définition des statuts

Dans une première étape, nous avons considéré comparativement les résultats des cultures fécales et des PCR aux différents contrôles, pour finalement retenir le test PCR comme test de référence.

Dans une seconde étape, un animal a été considéré comme excréteur si, au cours du suivi, il a présenté au moins un résultat positif en PCR. Plusieurs catégories d'animaux excréteurs ont été définies (Nielsen, 2008) (Tableau 26) :

- Non excréteurs : tous les résultats PCR négatifs,
- Excréteurs transitoires : résultat PCR positif 1 seule fois (p1, p2, p3 ou p4),
- Excréteurs intermittents : 2 résultats PCR positifs sur 4,
- Excréteurs « continus » (persistants) : au moins 3 résultats PCR positifs ou les 2 derniers.

Tableau 26 : Les différentes catégories d'excréteurs

Catégories d'excréteurs	Résultats PCR	
Non excréteurs	0000	N
Excréteurs transitoires	0001	P4
	0010	P3
	0100	P2
	1000	P1
Excréteurs intermittents	0101	P2,4
	0110	P2,3
	1001	P1,4
	1010	P1,3
	1100	P1,2
Excréteurs continus	0011	P3,4
	0111	P2,3,4
	1011	P1,3,4
	1101	P1,2,4
	1110	P1,2,3
	1111	P1,2,3,4

## II-1-4- Traitement des données

Pour la détermination du statut excréteur, seules les valeurs manquantes de la PCR ont été considérées comme valeurs manquantes, indépendamment des valeurs manquantes obtenues pour les 2 autres tests.

En revanche, pour l'analyse des résultats des tests ELISA et IFN $\gamma$ , on a considéré que si un animal possède une valeur manquante sur une des analyses, alors les 3 analyses pour ce point ont des valeurs manquantes.

Les performances de l'ELISA et de l'IFN $\gamma$  ont été évaluées pour leur capacité à détecter les animaux excréteurs, le test PCR sur fèces étant considéré comme le test de référence. La sensibilité des tests immunologiques a été déterminée sur la population d'animaux excréteurs et la spécificité a été déterminée sur la population d'animaux non-excréteurs.

Pour les analyses de « profil », les valeurs manquantes ont été considérées comme des réponses négatives au test, (ce qui revient à une sous-estimation des positifs).

## II - 2 - Résultats

### II-2-1- Résultats généraux

Sur l'ensemble des animaux suivis, 49 ont été conservés pour l'analyse. Il s'agit des animaux dont les données étaient disponibles sur l'ensemble du suivi (n = 23), des animaux avec au plus 1 valeur manquante (n = 24) et 2 animaux morts entre le troisième et le quatrième prélèvement.

Au cours du suivi, 12 animaux ont été autopsiés et parmi ceux-ci, 7 ont présenté au cours de l'autopsie des lésions macroscopiques évocatrices de paratuberculose (épaississement de la muqueuse du jéjunum ou de l'iléon, hypertrophie des nœuds lymphatiques mésentériques) ou une réaction positive à la coloration de Ziehl-Neelsen (ZN).

Les caractéristiques du suivi figurent dans le Tableau 27. Les animaux ont été suivis entre la naissance et l'âge de 940 jours. Les intervalles entre les contrôles ne sont pas identiques : les contrôles ont été espacés de respectivement 180, 220 et 240 jours. En revanche, à chaque contrôle, l'âge des animaux était homogène comme l'indiquent les différences entre l'âge maximum et l'âge minimum à chaque contrôle (46 jours) et les écarts-types.

Tableau 27 : Description du suivi (âge en jours)

	C1	C2	C3	C4
	(n =49)	(n=49)	(n=49)	(n=47)
Critère d'inclusion	250 - 300	430 - 480	650 - 700	890 - 940
Minimum-Maximum	252-298	432-478	651-697	894-940
Moyenne	277	457	676	919
Ecart-type	17	17	17	18
Médiane	269	449	668	911
Mode	294	474	693	936

## II-2-2- Détection des animaux excréteurs

Pour les animaux chez lesquels les 2 résultats ont été disponibles, la comparaison des résultats de la culture fécale et de la PCR (Tableau 28), montre que le nombre d'animaux positifs en PCR a été plus important que le nombre d'animaux positifs en culture, quel que soit le contrôle. Au premier contrôle, 5 animaux ont été détectés positifs en PCR et aucun en culture. Au deuxième contrôle, 15 animaux ont été détectés positifs en PCR et 3 ont été détectés positifs en culture. Au troisième contrôle, 26 animaux ont été détectés positifs en PCR et 6 ont été détectés positifs en culture. Parmi les 6 animaux détectés positifs en culture fécale, 1 animal a été détecté négatif en PCR. Au quatrième contrôle, 20 animaux ont été détectés positifs en PCR et 11 ont été détectés positifs en culture. Parmi les 11 animaux détectés positifs en culture fécale, 4 animaux ont été détectés négatifs en PCR. Globalement, la PCR a détecté 40 animaux positifs alors que la culture fécale n'en a détecté que 13. Deux animaux qui ont présenté des résultats positifs en culture, ont présenté des résultats négatifs en PCR à tous les contrôles sauf au premier contrôle pour lequel la donnée a été manquante.

Pour les animaux autopsiés, tous ont été détectés positifs en PCR alors que la culture fécale n'a détecté que 5/7 animaux avec lésions.

Ces résultats ont été conformes aux données de la littérature qui considèrent que la PCR est plus sensible que la culture. En raison de cette qualité, pour la suite de l'étude, seuls les résultats de la PCR ont été utilisés.

Tableau 28 : Résultats comparés de la PCR et de la culture fécale au cours du suivi

Résultats PCR	Résultats CF	C1	C2	C3	C4	Statut global*
+	+	0	3	5	7	11
+	-	5	12	21	13	29
-	+	0	0	1	4	2
-	-	24	33	21	17	7
	Total	29	48	48	41	49

\* + : au moins 1 résultat positif, - : tous les résultats négatifs

Les animaux excréteurs ont été définis comme les animaux qui ont obtenu au moins une réponse positive au test PCR (n = 40). Le test PCR a présenté 8 valeurs manquantes au premier contrôle, 0 au deuxième contrôle, 1 valeur manquante au troisième contrôle et 4 valeurs manquantes au quatrième contrôle (Tableau 29).

Tableau 29 : Nombre d'animaux positifs en PCR au cours du suivi

test	C1 (n =41)	C2 (n=49)	C3 (n=48)	C4 (n=43)	Global (positif à au moins 1 contrôle)
PCR	6	16	26	22	40

Le nombre d'animaux positifs en PCR a augmenté au cours du temps, passant de 6 animaux positifs au premier contrôle à 26 animaux positifs au troisième contrôle.

Au quatrième contrôle, le nombre d'animaux positifs en PCR a diminué, tout comme le nombre total d'animaux en suivi : parmi les animaux positifs en C3, 1 est mort et 3 avaient des valeurs manquantes à C4. De plus, 8 animaux positifs en C3 ont obtenu des résultats négatifs en C4, mais, 8 animaux négatifs en C3, sont devenus positifs en C4. La baisse du nombre d'animaux positifs en PCR à C4 a donc été liée aux valeurs manquantes et à un animal mort.

La caractérisation de l'excrétion des animaux n'a pas pu être faite pour les animaux présentant une valeur manquante pour le test PCR à 1 des contrôles (n= 13). Ces animaux avec des valeurs manquantes ont été classés comme « supposés non excréteurs » (3 résultats négatifs et 1 valeur manquante) ou « indéterminables » (au moins 1 résultat positif associé à 1 valeur manquante). Cependant, un animal avec une valeur manquante mais positif en PCR aux 2 derniers contrôles a été classé dans les excréteurs continus. Pour les 2 animaux morts entre C3 et C4, les prélèvements réalisés à l'autopsie ont présenté une réaction positive à la coloration de ZN et ces 2 animaux ont été considérés comme positifs en C4, ce qui a permis de les classer, un comme « excréteur intermittent » et un comme « excréteur continu ». Les résultats des différentes catégories d'excréteurs sont présentés dans le Tableau 30.

Tableau 30 : Caractérisation de l'excrétion (nombre d'animaux dans chaque catégorie)

Statut		nombre
N	Non excréteurs	4
SN	Supposés non excréteurs	5
T	Excréteurs transitoires	13
I	Excréteurs intermittents	5
C	Excréteurs continus	15
ND	Indéterminables	7

Parmi les animaux dont le statut excréteur a pu être établi (37), la plupart étaient des « excréteurs continus », suivis par des « excréteurs transitoires ».

Parmi les 7 animaux présentant des lésions à l'autopsie ou une réaction positive à la coloration de ZN, tous ont été détectés comme excréteurs au moins 2 fois, dont plus de la moitié ont été définis comme « excréteurs continus ».

### II-2-3- Evolution des réponses aux tests dans le temps

Les résultats des trois tests aux différents contrôles figurent dans le Tableau 31 et le Tableau 32.

Tableau 31 : Nombre d'animaux positifs en IFN et en ELISA au cours du suivi

	C1 (n =30)	C2 (n=49)	C3 (n=48)	C4 (n=43)	Global (positif à au moins 1 contrôle)
IFN $\gamma$	0	10	13	12	23
ELISA	0	3	9	9	13

Tableau 32 : Distribution des profils de réponses aux différents contrôles pour chaque test

Profil des réponses pour chaque test	Nombre d'animaux		
	PCR	IFN $\gamma$	ELISA
0000	9	26	36
+000	1	0	0
0+00	3	4	0
00+0	10	4	3
000+	4	4	4
++00	1	0	0
+0+0	0	0	0
+00+	1	0	0
0++0	1	3	1
0+0+	4	2	0
00++	6	5	3
+++0	0	0	0
++0+	0	0	0
+0++	2	0	0
0+++	6	1	2
+++	1	0	0

0 : réponse négative au test ou valeur manquante

La PCR a été le test le plus précoce car dès le premier contrôle des réponses positives ont été observées, contrairement aux tests IFN $\gamma$  et ELISA (Tableau 29). La première réponse positive en PCR a été obtenue en moyenne un contrôle avant la première réponse positive au test de l'IFN $\gamma$  et en moyenne 1,6 contrôle avant la première réponse positive en ELISA (résultats non

illustrés). Les tests IFN $\gamma$  et ELISA ont présenté des réponses positives à partir du deuxième contrôle.

Parmi les 6 animaux qui ont présenté une réaction PCR positive en C1, une excrétion passive peut être suspectée sur 1 animal, car il n'a présenté par la suite aucune réponse positive en PCR, ni en IFN $\gamma$ , ni en ELISA.

La PCR a été le test qui a présenté le plus de réactions positives, suivie par le test de l'IFN $\gamma$  puis le test ELISA. Au total, sur l'ensemble du suivi, 4 animaux n'ont présenté aucune réaction positive aux 3 tests.

La majorité des animaux a présenté 1 seule réaction positive au cours du suivi, avec respectivement 18, 12 et 7 animaux positifs en PCR, IFN $\gamma$  et ELISA. Le nombre d'animaux avec 2 réponses positives aux tests au cours du suivi a été inférieur, avec respectivement 13, 10 et 4 animaux en PCR, IFN $\gamma$  et ELISA. Le nombre d'animaux avec 3 réponses positives au cours du suivi a été encore plus faible, avec respectivement 8, 1 et 2 animaux positifs en PCR, IFN $\gamma$  et ELISA. Enfin, 1 seul animal a été trouvé positif aux 4 contrôles en PCR.

#### II-2-4- Répétition des tests

Le nombre d'animaux détectés positifs aux différents contrôles sont présentés dans le Tableau 33.

Quand les animaux ont été testés une fois, le plus grand nombre d'animaux positifs, quel que soit le test, a été obtenu au troisième contrôle, pour un âge moyen de 676 jours, avec respectivement 26, 13 et 9 animaux positifs en PCR, IFN $\gamma$  et ELISA.

Quand les animaux ont été testés 2 fois, pour détecter le maximum d'animaux, quel que soit le test, les résultats au quatrième contrôle ont permis de détecter en plus 9, 6 et 4 animaux positifs respectivement en PCR, IFN $\gamma$  et ELISA.

Quand les animaux ont été testés 3 fois, pour détecter le maximum d'animaux, les résultats des animaux vers l'âge de 457 jours (C2) ont permis de détecter en plus 4 animaux positifs en PCR et IFN $\gamma$ .

Quand les animaux ont été testés 4 fois, les résultats de la PCR vers 277 jours (C1) ont permis de détecter 1 animal supplémentaire.

La maximisation du nombre de positifs pour un contrôle est donc obtenue à C3, puis à C4 si un deuxième contrôle est pris en compte, puis à C2 si un troisième contrôle est pris en compte, et ceci, quel que soit le type de test envisagé.

Tableau 33 : Résultats aux tests en fonction de la répartition des contrôles

Répartition des contrôles		n	Nombre de positifs à au moins 1 des contrôles considérés		
			PCR	IFN $\gamma$	ELISA
1 contrôle	C1	30	6	0	0
	C2	49	16	10	3
	C3	48	26	13	9
	C4	43	24	12	9
2 contrôles	C1 et C2	49	20	10	3
	C1 et C3	48	29	13	9
	C1 et C4	43	26	12	9
	C2 et C3	49	34	19	9
	C2 et C4	49	29	19	10
	C3 et C4	48	35	19	13
3 contrôles	C1 et C2 et C3	49	36	19	9
	C1 et C2 et C4	49	29	19	10
	C1 et C3 et C4	48	37	19	13
	C2 et C3 et C4	49	39	23	13
4 contrôles	C1 et C2 et C3 et C4	49	40	23	13

#### II-2-5- Qualités des tests immunologiques pour la détection des excréteurs

La sensibilité et la spécificité des tests pour la détection des excréteurs ont été évaluées respectivement sur 40 animaux infectieux et 4 animaux non infectieux (Tableau 34). Les qualités des tests ont été déterminées pour les différents contrôles du suivi.

Tableau 34 : Qualités des tests immunologiques pour la détection des excréteurs

Contrôles	IFN $\gamma$		ELISA		IFN $\gamma$ + ELISA	
	Se	Sp	Se	Sp	Se	Sp
C1	0	100	0	100	0	100
C2	20	100	5	100	23	100
C3	33	100	21	100	36	100
C4	28	100	25	100	28	100
C1 et C2	20	100	5	100	23	100
C1 et C3	33	100	21	100	36	100
C1 et C4	28	100	25	100	28	100
C2 et C3	44	100	21	100	44	100
C2 et C4	39	100	25	100	36	100
C3 et C4	44	100	29	100	37	100
C1 et C2 et C3	44	100	21	100	44	100
C1 et C2 et C4	39	100	25	100	36	100
C1 et C3 et C4	44	100	29	100	37	100
C2 et C3 et C4	49	100	29	100	43	100
C1 et C2 et C3 et C4	49	100	29	100	43	100

La spécificité des tests a toujours été de 100%. La sensibilité du test de dosage de l'IFN $\gamma$  a été supérieure à celle du test ELISA ; la sensibilité du test de dosage de l'IFN $\gamma$  a varié entre 0 et 49 % tandis que celle du test ELISA a varié entre 0 et 29 %.

La réalisation du test de l'IFN $\gamma$  à un âge moyen de 676 jours (C3) a permis de détecter les animaux excréteurs avec une sensibilité de 33 %. Quand un test supplémentaire a été réalisé, avant (C2) ou après (C4), la sensibilité du test a été améliorée de 11 %. La réalisation de 3 ou 4 tests a permis d'améliorer la sensibilité de 5%. La meilleure qualité de l'IFN $\gamma$  a été obtenue avec 3 tests (à C2, C3 et C4).

La réalisation du test ELISA à un âge moyen de 919 jours (C4) a permis de détecter les animaux excréteurs avec une sensibilité de 25 %. La sensibilité du test ELISA a pu être améliorée de 4 % quand un test ELISA supplémentaire a été réalisé à un âge moyen de 676 jours (C3). La réalisation de 3 ou 4 tests n'a pas changé les qualités du test. La meilleure qualité de l'ELISA a été obtenue avec 2 tests (à C3 et C4).

A C3, la combinaison des 2 tests a permis d'améliorer la sensibilité de la détection des animaux excréteurs.

## II - 3 - Discussion

La PCR a détecté plus d'animaux positifs que la culture. Cela peut indiquer un manque de spécificité de la PCR (faux-positifs), ce qui reviendrait à considérer que la séquence IS900 n'est pas adaptée. Or cette séquence est largement utilisée. Mais le matériel génétique détecté par la PCR peut avoir été libéré par des bactéries mortes, et qui n'ont dans ce cas, pas de rôle dans la diffusion de l'infection. Cela peut également s'expliquer par une meilleure sensibilité de la PCR (vrais-positifs) car elle est capable de détecter des bactéries difficiles à cultiver sur le milieu utilisé, ou des bactéries présentes en faible quantité. Cependant, sur certains prélèvements (1 en C3 et 4 en C4), la PCR a détecté moins de positifs que la culture. Cela peut s'expliquer par la présence d'inhibiteurs de la PCR dans le prélèvement ou par l'absence de bactérie dans la prise d'essai. Les données de la littérature (Gwozdz et al., 1997 ; Grant et al., 2000 ; Fang et al., 2002) considèrent que, outre le fait qu'elle soit plus rapide, la PCR est plus sensible que la culture.

La PCR a été interprétée de façon qualitative et n'a donc pas permis d'apprécier la quantité de bactéries excrétées. Il n'a donc pas été possible de différencier les animaux en fonction de ce paramètre. Néanmoins, certains auteurs (Salgado et al., 2007) ont rapporté que parmi les animaux excréteurs on pouvait distinguer des animaux fortement excréteurs, qui contribuent massivement à la contamination du milieu, et des animaux faiblement excréteurs.

La PCR a été le test le plus précoce, suivi par le test de dosage de l'IFN $\gamma$  et le test ELISA. Chez les animaux âgés en moyenne de 277 jours, les 2 tests immunologiques ont été incapables de détecter des animaux excréteurs, alors que 6/40 animaux (15%) ont été détectés par la PCR sur fèces. Les quatre animaux négatifs en PCR étaient également négatifs pour le test de dosage de l'IFN $\gamma$  et le test ELISA, et peuvent donc être considérés comme des vrais-négatifs.

La PCR a détecté plus d'animaux positifs que l'IFN $\gamma$  ou l'ELISA, avec respectivement 40, 23 et 13 animaux détectés au cours du suivi. En raison des valeurs manquantes, le nombre d'animaux positifs a peut-être été sous-estimé. Huda et al. (2004) ont observé sur des bovins naturellement infectés, que le test IFN $\gamma$  donnait plus de réponses positives que le test ELISA.

Au total, la PCR a permis de détecter 40 animaux excréteurs sur un total de 49 animaux suivis, ce qui confirme que le troupeau peut être considéré comme fortement infecté. La répétition des tests PCR a permis d'améliorer la détection des animaux positifs comme indiqué par Huda et Jensen (2003) pour la culture fécale.

Pour la détection des animaux excréteurs, la spécificité du test de dosage de l'IFN $\gamma$  et du test ELISA a été estimée à 100 %, quel que soit le contrôle. Mais comme le nombre d'animaux non excréteurs était faible (n=4), ces chiffres doivent être interprétés avec prudence.

La répétition des tests avec des intervalles d'environ 7 mois a permis d'améliorer leur sensibilité, sans dégrader leur spécificité. La sensibilité du test de dosage de l'interféron a été supérieure à celle du test ELISA (valeur maximale de respectivement 49% et 29%). L'ELISA est donc un test trop peu sensible et trop tardif pour pouvoir être utilisé pour la détection des animaux excréteurs. Dans ce contexte, la sensibilité du test ELISA pour la détection des animaux excréteurs est inférieure à sa sensibilité pour la détection des animaux infectés (cf chapitres précédents). La détection des animaux excréteurs par ELISA est donc moins fiable que la détection des animaux infectés. La sensibilité du test de dosage de l'IFN $\gamma$  pour la détection des animaux excréteurs est également inférieure à la sensibilité du test ELISA pour la détection des animaux infectés.

Entre 650 et 700 jours, la combinaison des 2 tests immunologiques a permis d'améliorer la sensibilité de la détection des animaux excréteurs, car les 2 tests n'ont pas détecté les mêmes

animaux. La répétition des tests a permis d'améliorer la sensibilité de la détection, à partir d'un âge moyen de 457 jours.

Le test de dosage de l'IFN $\gamma$  a été réalisé avec un antigène non spécifique (PPDa au lieu du PPDj). Nielsen et Toft (2008) ont rapporté des sensibilités supérieures du test de dosage de l'IFN $\gamma$  avec l'utilisation du PPDj pour la détection des bovins excréteurs. Nous n'avons pas mis en évidence un défaut de spécificité. Pourtant, l'utilisation du PPD, qui correspond à un mélange complexe d'antigènes, peut être à l'origine de réactions croisées avec d'autres Mycobactéries (Harris et Barletta, 2001). Il y a donc une nécessité de développer et de valider des antigènes spécifiques (Antognoli et al., 2007).

Le test de dosage de l'IFN $\gamma$  est un test qui explore la mémoire immunitaire des lymphocytes. Il permet de mettre en évidence l'exposition des animaux aux antigènes de Map. En raison du processus pathogénique, des réactions positives en IFN $\gamma$  pourraient être observées précocement chez des animaux non excréteurs, ce qui traduirait un état de guérison. L'importance de ce phénomène dans les conditions naturelles d'infection n'a, à notre connaissance, pas été évaluée. Dans notre suivi, 1 animal pourrait être considéré comme guéri ; il s'agit d'un animal qui a présenté une réaction positive au test de dosage de l'IFN $\gamma$  et qui n'a pas présenté par la suite, de réactions positives en PCR, ni en ELISA. Ces tests n'étant pas très sensibles, il se peut toutefois qu'il s'agisse de réactions faussement négatives et que l'excrétion et la production d'anticorps existent mais n'aient pas pu être mises en évidence, malgré la répétition des tests. Il existe des valeurs manquantes pour 3 autres animaux, pour lesquels il n'est donc pas possible de se prononcer sur une éventuelle guérison.

Malgré le risque potentiel d'obtenir des réactions positives en IFN $\gamma$  chez des animaux non excréteurs, le test de dosage de l'IFN $\gamma$  est statistiquement associé à la détection de l'excrétion comme cela a été rapporté par Nielsen et Toft (2008).

La définition du statut excréteur a reposé sur la répétition des PCR. Cette stratégie de répétition des tests pour la détermination des qualités d'un test ELISA avait été recommandée par Nielsen et Toft (2006), qui l'avaient utilisée pour leur part avec la culture fécale. L'utilisation de la PCR pour la détection de l'excrétion fécale a été retenue en raison d'une meilleure sensibilité que la culture fécale.

Nos résultats ne confirment pas la précocité du test de dosage de l'IFN $\gamma$ , puisque les premières réponses positives apparaissent à un âge moyen de plus d'1 an (457 jours) et après les premières réponses positives en PCR. Les réponses aux tests ELISA apparaissent en même temps ou après les réponses en IFN $\gamma$  et après l'excrétion. Certains animaux ont présenté simultanément des réponses positives en IFN $\gamma$  et en ELISA, comme décrit précédemment chez les bovins (Holstad et al., 2005). Par ailleurs, une grande variabilité des réponses aux tests a été observée, comme Storset et al. (2001) sur des caprins infectés expérimentalement et Manning et al. (2003) sur des caprins naturellement infectés. En revanche, nos résultats sont différents de ceux obtenus par Stewart et al. (2006) qui, sur des caprins infectés expérimentalement, avaient observé des réponses en IFN $\gamma$  qui précédaient l'excrétion, persistaient pendant 12 à 16 mois, en association avec une excrétion persistante, puis déclinaient avec l'apparition des signes cliniques. L'excrétion a précédé la réponse ELISA, comme observé précédemment par Stewart et al. (2006).

En fonction du schéma pathogénique, on pouvait s'attendre à ce que certains tests IFN $\gamma$  deviennent négatifs parallèlement à une augmentation de la production d'anticorps, ce qui indiquerait une progression de l'infection. Mais, dans les conditions naturelles, l'infection ne se produit pas nécessairement pendant les premiers mois de vie, même si elle est plus fréquente à cette période. Les animaux plus âgés peuvent également être au contact de la

bactérie, pour la première fois (lors d'introduction de la maladie dans le troupeau) ou si la multiplication de la bactérie est relancée ou en cas de ré-infection (Storset et al., 2001). Contrairement aux infections expérimentales, il n'est pas possible de savoir précisément quand les animaux ont été contaminés dans les troupeaux naturellement infectés, ni le nombre de bactéries ingérées. Tous les animaux issus d'un troupeau infecté n'ont pas forcément été infectés de la même façon (différentes doses, différents âges, réactions immunitaires différentes, voire susceptibilité génétique différente) (Manning et al., 2003).

Les résultats de cette étude montrent que le test IFN $\gamma$  peut être utilisé à partir de 22 mois pour détecter les animaux excréteurs et les éliminer car ils participent à la contamination du milieu. Cependant, en raison de sa faible sensibilité (33%), il est conseillé de tester les animaux négatifs en IFN $\gamma$  avec une PCR sur fèces. Avant 22 mois, les tests basés sur les réactions immunitaires ne sont pas assez sensibles et la détection des animaux excréteurs devrait être réalisée par PCR sur fèces. Pour comparer la différence entre une détection précoce par PCR et une détection plus tardive par un test de dosage de l'IFN $\gamma$ , une étude économique pourrait être conduite. Elle devrait intégrer non seulement le coût des analyses et de leur mise en œuvre, mais aussi les coûts indirects liés à la non-élimination des animaux excréteurs.

#### II - 4 - Conclusion

Bien que rapides et automatisables, les tests basés sur les réactions immunitaires sont peu sensibles pour la détection des animaux excréteurs et sont tardifs, mais ils sont très spécifiques (100%). Avec un seul contrôle réalisé à un âge d'environ 22 mois, la sensibilité du test IFN $\gamma$  a été estimée à 33%. Pour l'ELISA, avec un seul contrôle réalisé à un âge d'environ 31 mois, la sensibilité a été estimée à 25 %. La répétition des tests a permis d'obtenir sur l'ensemble du suivi, une sensibilité maximale de 49 % pour le test IFN $\gamma$  et une sensibilité maximale de 29 % pour le test ELISA.

Par rapport à la culture fécale, la PCR a détecté plus d'animaux positifs à tous les contrôles. Cet avantage, associé à l'obtention plus rapide d'une réponse, a été mis à profit pour définir le statut excréteur des animaux. Par rapport aux autres tests, la PCR détecte plus d'animaux et de façon plus précoce. Elle présente donc un intérêt car il est important de pouvoir détecter rapidement les animaux excréteurs, quelle que soit l'origine de l'excrétion, pour pouvoir les éliminer.

## Chapitre 4. Discussion générale

Les travaux réalisés avaient pour finalité la production de connaissances épidémiologiques descriptives concernant la prévalence de l'infection par Map, d'une part, et les performances des outils de détection d'autre part, afin d'aider à la conception ultérieure d'actions de maîtrise et d'éclairer les différents acteurs impliqués (éleveurs, organisations professionnelles et décideurs publics). La lutte contre l'infection par Map peut être conduite de façon indépendante au niveau de chaque troupeau, et/ou de façon concertée au niveau d'un territoire (département, région, pays) ou d'un ensemble d'éleveurs partageant les mêmes intérêts vis-à-vis de la maladie. Au niveau des troupeaux, les plans de lutte, décrits dans la partie bibliographique, à la seule charge de l'éleveur, ont pour objectif de diminuer la contamination du milieu et de protéger les animaux de renouvellement. Pour augmenter l'efficacité de la lutte, une action collective pourrait être mise en place avec des protocoles standardisés débouchant sur des niveaux de qualification ; la participation des éleveurs pourrait alors bénéficier d'un soutien financier par les organisations professionnelles et/ou les collectivités territoriales. Globalement, la décision sur l'opportunité d'une lutte collective dépend de l'évaluation des risques de la maladie pour la collectivité au regard de la santé publique et de l'économie des productions animales (prévalence importante, forte contagiosité, pertes importantes). En complément de la lutte contre l'infection, la détection, la surveillance et la protection des troupeaux non infectés permet de sécuriser les échanges. Le recours à la certification, pratiquée par un organisme ad hoc, permet ainsi de garantir le statut de ces troupeaux avec une probabilité donnée. Des procédures de certification des troupeaux ont été proposées dans différents pays, notamment aux Etats-Unis, en Australie (y compris pour les caprins) et aux Pays-Bas. En France, une certification existe pour les troupeaux bovins. C'est une démarche qui semble rentable pour les sélectionneurs mais dont l'efficacité n'a pas été évaluée (Anonyme, 2009a).

Notre discussion générale aura pour objectif de montrer l'apport des différents résultats produits pour l'élaboration de plans de maîtrise de l'infection par Map dans les troupeaux caprins français. En raison de l'influence des performances des outils de diagnostic sur l'estimation de la prévalence, notre discussion générale s'affranchit du plan de la thèse. Ainsi, la première partie de la discussion portera sur les qualités des outils de diagnostic dans différentes situations épidémiologiques, tandis que la deuxième partie portera sur les données concernant l'estimation de la prévalence de l'infection par Map.

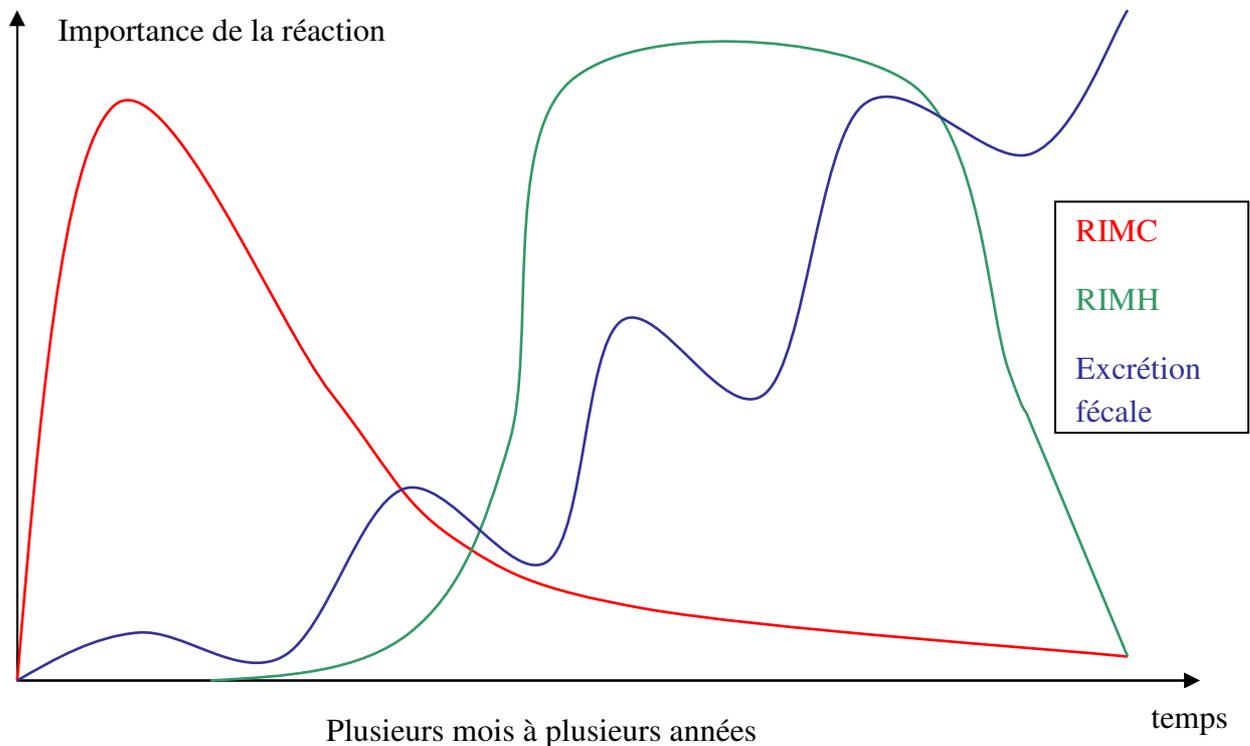
### Apports et limites de la connaissance des performances des outils de diagnostic

La sensibilité des tests est généralement faible et la spécificité est généralement élevée (Anonyme, 2000). Des tests directs, comme l'examen microscopique (scopie), la culture ou la PCR, et des tests indirects tels que l'IDG ou l'ELISA ont été utilisés pour dépister l'infection sub-clinique (Geisbauer et al., 2007).

Les 2 études du chapitre B sont complémentaires dans leur approche. La première, qui avait pour objectif de comparer les tests pour le dépistage des animaux infectés par Map en fonction de l'âge des animaux, a été réalisée sur 412 animaux répartis en 4 classes d'âge et issus de 12 troupeaux de statut inconnu vis-à-vis de l'infection par Map. La deuxième, qui avait pour objectif de décrire les performances des tests pour la détection des animaux excréteurs, a été réalisée sur une cohorte de 49 animaux issus d'un troupeau naturellement infecté par Map, suivie pendant 2,5 ans. Dans les 2 études, la culture fécale et le même test ELISA (ELISA Paratuberculose anticorps bicupule®, Institut Pourquier, Montpellier, France) ont été utilisés. En revanche, la première étude a utilisé d'autres tests sérologiques (2 autres

tests ELISA commerciaux, ainsi qu'un test d'immuno-diffusion en gélose) et un autre test de détection de la bactérie, la scopie. La deuxième étude, a utilisé la PCR sur prélèvements fécaux et un test de détection des réactions immunitaires à médiation cellulaire, le test de l'IFN $\gamma$ .

Les résultats obtenus dans ces 2 études peuvent être rapprochés et être comparés au schéma théorique de l'évolution de l'infection (Figure 15).



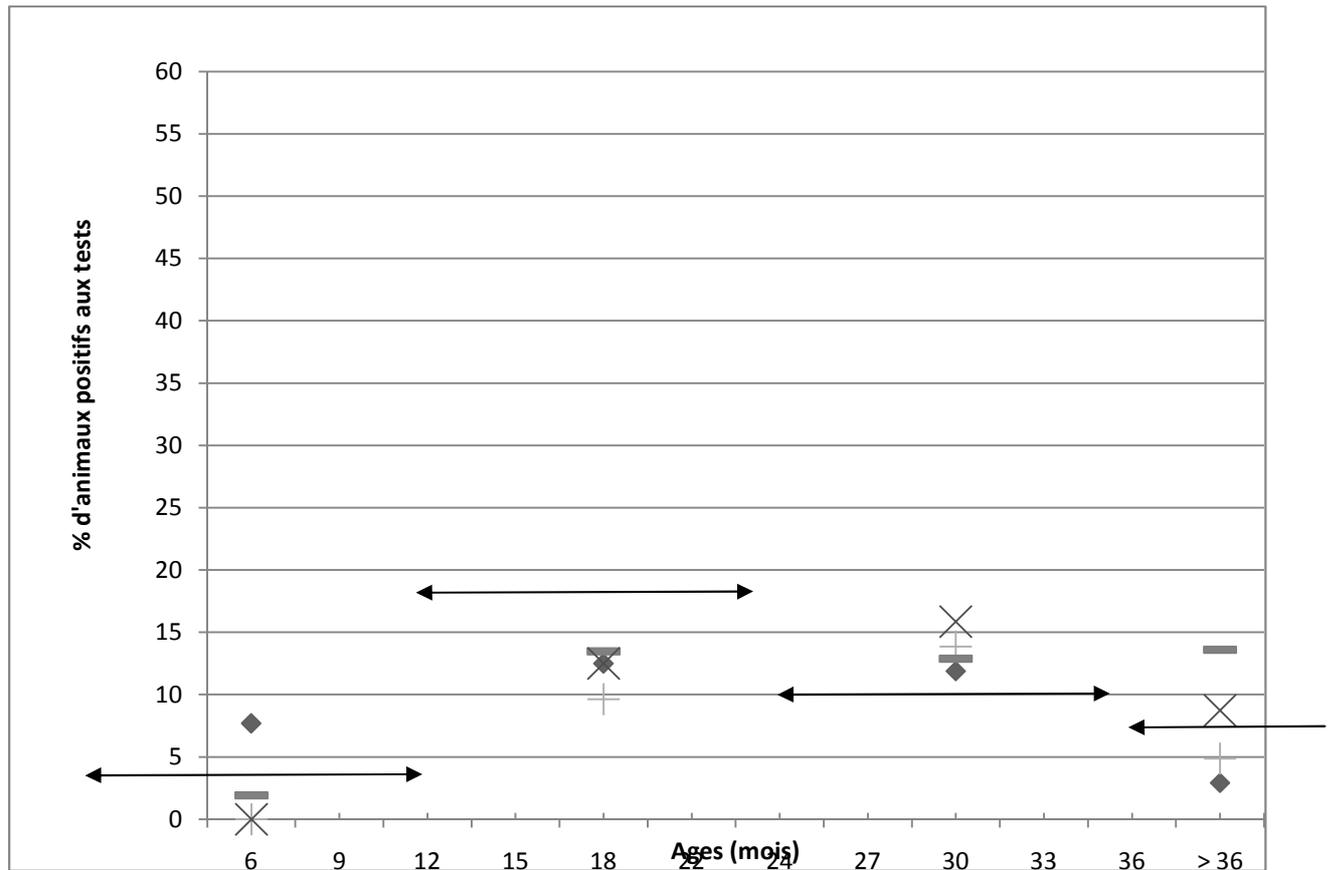
RIMC : Réaction Immunitaire à Médiation Cellulaire  
 RIMH : Réaction Immunitaire à Médiation Humorale

Figure 15 : Evolution théorique des réactions immunitaires et de l'excrétion fécale au cours de l'infection par Map (Wintz, 2006)

Selon ce schéma théorique, la réaction immunitaire à médiation cellulaire est importante en début d'infection, puis elle diminue avec l'extension de l'infection. En revanche, la réaction immunitaire à médiation humorale (qui se traduit par la production d'anticorps), apparaît quand la réaction immunitaire cellulaire baisse, puis elle augmente progressivement au cours de l'infection. L'excrétion fécale est faible au début de l'infection, puis elle augmente progressivement, tout en étant intermittente. Enfin, elle devient importante et constante à la fin du processus infectieux. Ce schéma constitue toutefois un pseudo-dogme sans fondements suffisants et il mérite d'être confronté aux résultats obtenus dans des troupeaux naturellement infectés (Figure 16). L'hypothèse retenue est que le nombre d'animaux détectés positifs est d'autant plus élevé que l'intensité de la réaction est importante.

Pour comparer les résultats obtenus dans les 2 études à l'évolution théorique des réactions suite à l'infection, les pourcentages de réponses positives aux différents tests ont été exprimés en fonction du temps. Dans la figure 16A, qui correspond aux résultats de la première étude, les réponses positives obtenues à la culture fécale et à 3 tests ELISA commerciaux ont été

représentées dans les différentes classes d'âge. Ces réponses ont été obtenues pour des animaux âgés respectivement de 0 à 1 an, 1 à 2 ans, 2 à 3 ans et plus de 3 ans. Pour chaque classe d'âge, les réponses positives sont observées sur des animaux différents. La figure 16B, qui correspond aux résultats de la deuxième étude, représente l'évolution des réponses positives à 4 tests (culture fécale, PCR, ELISA et IFN) d'une cohorte de 49 animaux suivis pendant 2,5 ans. Les animaux de cette cohorte ont été contrôlés 4 fois au cours du suivi, l'âge au contrôle étant compris, suivant les animaux, dans un intervalle de 50 jours. Seule cette figure représente réellement une variation des réponses positives dans le temps, mais les variations des réponses dans les différentes classes d'âge ont été considérées comme indicatrices d'une variation dans le temps.



↔ : période d'enregistrement (12 mois)

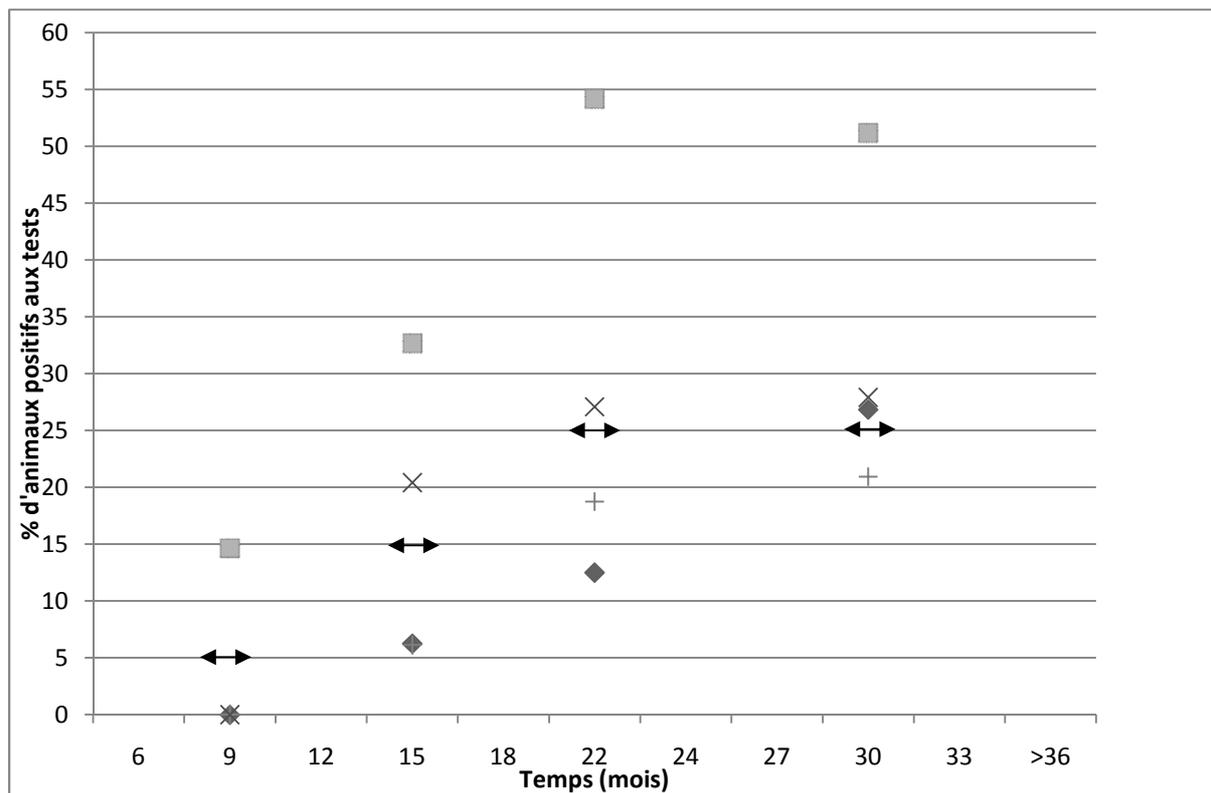
◆ : culture fécale

+ : ELISA A

— : ELISA B

X : ELISA C

Figure 16A : résultats des différentes classes d'âge



↔ : période d'enregistrement (1, 5 mois)

◆ : culture fécale

■ : PCR

+ : ELISA A

X : IFN $\gamma$

Figure 16B : résultats du suivi de cohorte

Figure 16 : Evolution des réponses positives aux tests au cours du temps

Sur la figure 16A, nous observons que l'évolution entre les 3 tests ELISA est parallèle, sauf pour l'ELISA B en fin d'évolution. La production d'anticorps apparaît à partir de 1 an et augmente au cours du temps. L'excrétion fécale, mesurée par la culture, est précoce et augmente au cours du temps sauf pour les animaux de plus de 3 ans. L'excrétion fécale précède bien la réaction humorale et les 2 phénomènes évoluent de la même façon.

Sur la figure 16B, nous observons que les réactions immunitaires (cellulaires et humorales) sont tardives, apparaissent en même temps et évoluent de façon similaire. La production d'IFN $\gamma$  n'est pas la plus précoce et ne diminue pas quand la production d'anticorps se développe. L'excrétion fécale (mesurée par PCR) est précoce et augmente au cours du temps. En revanche, la culture fécale est synchrone de l'ELISA.

Nos résultats ont donc montré que l'excrétion fécale, mesurée par culture ou par PCR, démarre tôt (dès la première année) et augmente au cours du temps, sauf au-delà de 3 ans.

Cela peut s'expliquer par le fait que les signes cliniques de la paratuberculose apparaissent sur des animaux de plus de 2 ans. Les chèvres infectées ont donc une probabilité plus grande d'être mortes ou d'avoir été réformées avant l'âge de 3 ans. Par conséquent, les chèvres de plus de 3 ans présentes dans les troupeaux, ont une probabilité plus grande de ne pas être infectées, et donc de donner des réponses négatives aux tests. Dans les systèmes laitiers intensifs de l'ouest de la France, Malher et al. (1999) ont observé un taux de réforme moyen de 24,3%. Les principales causes de réforme relevées étant un trouble de santé (dont la cachexie) dans 10,3 % des cas et une production insuffisante dans 10,0% des cas, 2 causes évocatrices de la forme clinique de l'infection par Map. Celle-ci constitue donc une cause fréquente de réforme dans les troupeaux caprins. L'âge moyen à la réforme des animaux dans ces troupeaux était compris entre 3,2 et 5,8 ans.

La réaction immunitaire à médiation humorale, mesurée par le dosage des anticorps, apparaît entre 1 et 2 ans et augmente au cours du temps. Chez les animaux de 3 ans et plus, le pourcentage d'animaux avec des anticorps diminue, vraisemblablement pour la même raison que l'excrétion fécale.

La réaction immunitaire à médiation cellulaire, mesurée par le dosage de l'INF $\gamma$ , n'est pas détectée chez les animaux de moins de 1 an et elle augmente au cours du temps. Ainsi, la réaction immunitaire à médiation cellulaire telle qu'elle a été observée dans nos études, ne correspond pas au schéma théorique : elle n'est pas précoce et persiste au cours du temps.

Ainsi, le schéma pathogénique décrit chez les bovins et chez les caprins suite à des infections expérimentales (Storset et al., 2001) n'a pas été confirmé chez des caprins issus de troupeaux naturellement infectés par Map. Dans les conditions naturelles, l'infection ne se produit pas nécessairement pendant les premiers mois de vie, même si elle est plus fréquente à cette période. Chez les bovins, une méta-analyse conduite récemment a mis en évidence une plus grande susceptibilité des jeunes à l'infection par Map (Windsor et Whittington, 2010). Cependant, l'infection est possible chez les adultes, en particulier avec des doses infectantes élevées. Les animaux plus âgés peuvent donc être infectés, pour la première fois (lors d'introduction de la maladie dans le troupeau avec une contamination massive) ou si la multiplication de la bactérie est relancée ou en cas de ré-infection (Storset et al., 2001). Ainsi, contrairement aux infections expérimentales, dans les troupeaux naturellement infectés, il n'est pas possible de savoir précisément quand les animaux ont été contaminés, ni le nombre de bactéries ingérées. Tous les animaux issus d'un troupeau infecté n'ont pas forcément été infectés de la même façon (doses différentes, âges différents) ou ont pu présenter une variabilité de la réponse à l'infection (réactions immunitaires différentes en fonction du stade physiologique ou des affections intercurrentes, voire susceptibilité génétique différente) (Manning et al., 2003). Les facteurs de variation de l'expression clinique dans les troupeaux caprins sont jusqu'à présent inconnus. Les animaux d'un troupeau infecté par Map peuvent donc présenter différentes formes pathologiques et immunologiques et se trouver en différents endroits du spectre de réponses. La compréhension de cet aspect est particulièrement important car la réponse de l'animal aux différents tests de diagnostic est associée à sa localisation dans le spectre : aucun test basé sur un seul type de réponse immunitaire, humorale ou cellulaire, ne peut, seul, identifier tous les animaux du spectre (Clarke et Little, 1996 ; Perez et al., 1997).

En raison de l'absence de Gold Standard pour définir l'infection par Map, l'utilisation de méthodes bayésiennes a permis d'évaluer la sensibilité et la spécificité d'un test ELISA (ELISA Paratuberculose anticorps bicupule®, Institut Pourquier, Montpellier, France) (chapitre A-I) : elles ont été estimées à respectivement 53 % et 100%. Dans le même temps, l'estimation de la sensibilité et de la spécificité de la culture fécale chez les caprins a été

obtenue, avec des valeurs de respectivement 34% et 99%. Les performances de la culture fécale sont moins bonnes que celle du test ELISA, qui présente en outre l'avantage d'être rapide, automatisable et moins coûteux.

La capacité des tests à détecter les animaux infectés évolue en fonction de l'âge des animaux puisque les marqueurs évoluent au cours du temps (Salgado et al., 2005 ; Nielsen et Toft, 2008). Par conséquent, pour choisir un test, il est nécessaire de connaître ses performances selon l'âge des animaux. Nos travaux ont consisté à évaluer les performances de tests directs (scopie, culture fécale) et indirects (immunodiffusion en gélose et ELISA) dans différentes classes d'âge (chapitre B- I). En l'absence de Gold Standard, cette évaluation a été effectuée par une méthode bayésienne tenant compte de la dépendance entre les tests pour détecter 2 phénomènes, l'excrétion fécale d'une part, la production d'anticorps d'autre part. Ainsi, pour les chèvres âgées de 2 à 3 ans, les tests ELISA ont une sensibilité comprise entre 70 et 77 %, tandis que la spécificité est comprise entre 94 et 96 %. En revanche, pour les autres classes, aucun test n'est suffisamment sensible pour détecter les caprins infectés par Map. Les tests ELISA donnent donc les meilleurs résultats et présentent l'avantage d'être rapides et automatisables, mais en raison de leur faible sensibilité, l'élimination des seules chèvres séropositives ne permet pas d'éliminer toutes les chèvres infectées. Cependant, à défaut de la détection systématique des animaux infectés, il est important de pouvoir détecter au moins les animaux excréteurs, qui excrètent la bactérie et représentent donc la principale source de contamination de l'environnement. Ces animaux devraient être éliminés en priorité (Spangler et al., 1992).

L'évaluation des outils pour la détection des caprins excréteurs a donc été entreprise (chapitre B-II). L'excrétion a été décrite par la répétition des tests PCR et 2 tests reposant sur des bases biologiques différentes ont été évalués au cours d'un suivi de cohorte réalisé pendant 2,5 ans : un test de dosage de l'IFN $\gamma$ , permettant de mettre en évidence les réactions immunitaires à médiation cellulaire, et un test ELISA (ELISA Paratuberculose anticorps bicupule®, Institut Pourquier, Montpellier, France), permettant de mettre en évidence les réactions immunitaires à médiation humorale. Réalisée sur 49 animaux, dans des conditions naturelles d'infection, cette étude a montré que la sensibilité du test de l'IFN $\gamma$  est supérieure à celle du test ELISA pour la détection des animaux excréteurs (49% versus 29%). La PCR a été le test le plus précoce, suivie par le test de l'IFN $\gamma$  et le test ELISA. Dès le premier contrôle (vers 9 mois) des résultats positifs ont été obtenus en PCR.

La PCR a détecté plus d'animaux positifs que l'IFN $\gamma$  ou l'ELISA, avec respectivement 40, 23 et 13 animaux détectés au cours du suivi. Une réponse positive en PCR correspond à la présence d'ADN de bactéries, mais celle-ci n'est pas toujours liée à une infection. En effet, le phénomène d'excrétion passive a été décrit par Sweeney et al. (1992c) chez des bovins infectés expérimentalement. Celle-ci se produit dans les jours qui suivent l'inoculation et est proportionnelle à la quantité inoculée : Map subit un transfert passif dans le tube digestif et elle est éliminée dans les matières fécales, sans provoquer d'infection (pénétration dans les cellules intestinales). Dans les conditions naturelles d'infection, il n'est pas établi que l'excrétion passive ait lieu (Van Roermund et al., 2007), mais elle pourrait être observée dans les troupeaux fortement contaminés (McDonald et al., 1999Mc ; Whittington et Sergeant, 2001 ; Van Roermund et al., 2007 ; Manning et al., 2003, pour les caprins). Cependant, l'excrétion passive a une signification épidémiologique différente de celle de l'excrétion active car il n'y a pas de multiplication de la bactérie. Par ailleurs, la réaction PCR peut détecter de l'ADN provenant de bactéries mortes, et dans ce cas les animaux positifs n'ont aucun rôle dans la contamination du milieu et des animaux. La PCR atteste alors simplement de la présence de Map dans le troupeau.

Les travaux que nous avons conduits ont utilisé une interprétation qualitative de la PCR et de la culture (positif versus négatif). Cependant, l'interprétation de la PCR peut également être

quantitative (par PCR en temps réel ou PCR quantitative). De la même façon, l'interprétation de la culture peut être semi-quantitative. L'intérêt d'une telle interprétation est de pouvoir détecter les animaux les plus fortement excréteurs, qui contribuent massivement à la contamination du milieu et qui peuvent être considérés comme des animaux présentant un risque élevé pour la contamination du milieu. Ceux-ci devraient donc être éliminés en priorité. Une approche de la lutte basée sur la détection et l'élimination des animaux les plus fortement excréteurs a été proposée au Danemark (Nielsen, 2009). De même, Collins et al. (2010) ont obtenu une diminution de la prévalence intra-troupeau en éliminant les animaux à risque élevé. Cette approche, qui consiste à éliminer un nombre plus restreint d'animaux, est moins coûteuse chez les bovins (Collins et al., 2010) et elle est plus facilement applicable par les éleveurs.

Le test de dosage de l'IFN $\gamma$  détecte l'exposition des animaux à Map et des réactions positives peuvent traduire une évolution de l'infection vers la guérison. Cependant, dans notre étude, le test de dosage de l'IFN $\gamma$  a détecté des animaux excréteurs à partir de 22 mois. Ce test ayant une faible sensibilité (33%), il est conseillé de tester les animaux négatifs en IFN $\gamma$  avec une PCR sur fèces. Avant 22 mois, les tests basés sur les réactions immunitaires ne sont pas assez sensibles et la détection des animaux excréteurs devrait être réalisée par PCR sur fèces.

#### Apports et limites de l'estimation de la prévalence de l'infection par Map

Nos travaux (chapitre A-II) ont montré que grâce à une enquête sérologique, la prévalence a été estimée à 63 % pour les troupeaux et 7 % pour les animaux de plus de 6 mois en France. L'importance de la prévalence de l'infection par Map dans les troupeaux caprins français, peut justifier la mise en place d'un plan de lutte collectif.

De plus, nous avons observé que, dans les troupeaux séropositifs, les prévalences intra-troupeaux sont très variables (entre 1 et 33%), certains troupeaux pouvant être considérés comme faiblement infectés et d'autres comme fortement infectés. Différentes actions pourraient donc être proposées en fonction de la prévalence intra-troupeau initiale, de l'objectif choisi, de la durée du plan, des moyens consacrés, et des objectifs retenus (assainissement ou maîtrise) :

- pour les troupeaux faiblement infectés, l'assainissement pourrait être envisagé, avec mise en œuvre de mesures strictement sanitaires : détection régulière et élimination progressive des animaux infectés d'une part, et protection du troupeau de renouvellement, d'autre part.
- pour les troupeaux fortement infectés (avec vraisemblablement un pourcentage important d'animaux présentant des signes cliniques), pour réduire la contamination du milieu, l'objectif de la lutte devrait en priorité, viser à l'élimination des animaux atteints (excrétion maximale), ainsi que la diminution du nombre d'animaux excréteurs et de la quantité de bactéries excrétées. Le recours à la vaccination pendant plusieurs années semble donc nécessaire pour atteindre cet objectif, d'autant que la répétition des analyses pendant plusieurs années pour la détection et l'élimination des animaux infectieux, peut s'avérer coûteuse dans les troupeaux caprins en raison de la taille souvent importante des troupeaux. Les mesures sanitaires devraient également être appliquées, en particulier pour limiter l'exposition des chevrettes de renouvellement.

Pour les caprins, les plans de lutte reposant sur des mesures uniquement sanitaires peuvent avoir une efficacité encore plus limitée que pour les bovins, en raison des coûts liés à la répétition des analyses sur des effectifs parfois importants en rapport la faible valeur de la chèvre de réforme. Gezon et al. (1988) ont montré qu'au bout de 7 ans, il a néanmoins été

possible d'éliminer l'infection par Map dans un troupeau caprin grâce un programme strict. Ce résultat ne peut pas être généralisé à tous les troupeaux infectés. La recommandation opérationnelle principale est donc que le plan de lutte doit être adapté à chaque élevage, et pour qu'il puisse être efficace, il faut d'abord s'assurer qu'il soit réellement applicable. Les plans de lutte collective mis en place contre la paratuberculose, tant en France qu'à l'étranger (Etats-Unis, Australie, Pays-Bas, Danemark), concernent essentiellement les bovins (Anonyme, 2009a ; Tavoranpanich et al., 2006 ; Kennedy et Allworth, 2000 ; Benedictus et al., 2000 ; Kudahl et al., 2008). Ces plans peuvent avoir plusieurs objectifs (Benedictus et al., 2000), classés par ordre décroissant de coût :

- éradiquer l'infection par Map,
- minimiser les pertes économiques en réduisant les signes cliniques,
- limiter la diffusion de la paratuberculose entre troupeaux et à l'intérieur des troupeaux (Jubb et Galvin, 2004 ; Ferrouillet et al., 2009), avec comme conséquence de limiter la prévalence de l'infection au niveau des troupeaux et intra-troupeaux (Muskens et al., 2000),
- réduire le risque pour les consommateurs d'être exposés à Map (Weber et al., 2008).

Ces plans ont permis de réduire la prévalence des cas cliniques et la prévalence de l'infection au bout de plusieurs années (Jubb et Galvin, 2004 ; Raizman et al., 2006 ; Wells et al., 2008 ; Ferrouillet et al., 2009 ; Collins et al., 2010). Le nombre d'animaux excréteurs diminue également ainsi que le taux de réforme des vaches pour cause de paratuberculose (Raizman et al., 2006 ; Wells et al., 2008 ; Ferrouillet et al., 2009). En plus de l'efficacité, ces plans doivent être évalués avec une analyse coût/bénéfice. Les faibles performances des outils de diagnostic au plan individuel et l'évolution chronique de l'infection par Map (Jubb et Galvin, 2004) constituent toutefois le point faible des plans de lutte et rendent impossible à court terme l'éradication de l'infection. En effet, la détection précoce des animaux infectés est pratiquement impossible et les sensibilités des tests sont faibles, ce qui impose de renouveler les analyses (Anonyme, 2000).

Rossiter et Burhans (1996) ont proposé un plan en 7 points :

- recensement des informations concernant l'exploitation (productions, pratiques d'élevage, ressources, autres pathologies),
- recensement de l'historique et de la prévalence de la maladie (mortalité, morbidité, résultats aux tests, description des cas, contrôles de performances, achats, ...),
- identification des facteurs de risque de transmission spécifiques à l'exploitation (passés et présents),
- analyse des possibilités de contrôle de ces facteurs de risque (en fonction de leur impact, des ressources disponibles et de leur efficacité),
- définition des objectifs du contrôle et des délais,
- définition de l'intensité du contrôle (en fonction de la situation initiale, des objectifs et des délais),
- planification, exécution (partenariat vétérinaire-éleveur) et évaluation (faisabilité, efficacité) à intervalles réguliers du plan.

Pour tous les troupeaux, il est recommandé de ne pas introduire d'animaux, quel que soit leur âge, car l'excrétion est possible à tout âge. De plus, les tests de diagnostic individuels ne sont pas assez sensibles pour garantir le caractère indemne d'un animal (Anonyme, 2000) et la répétition des analyses ne permet que d'identifier des troupeaux avec un risque faible de transmission de Map (Allworth et Kennedy, 2000).

Les prévalences estimées dans notre étude montrent que l'infection par Map est largement présente dans les troupeaux caprins français. Cependant certains troupeaux peuvent être considérés comme non infectés par Map et pourraient s'engager, de façon individuelle et

volontaire, dans une démarche de certification. En matière de paratuberculose, en raison de la biologie particulière de Map et des limites des tests de dépistage, la certification n'atteste pas du caractère indemne du troupeau, mais permet de définir des niveaux progressifs de garantie, avec une probabilité croissante que les troupeaux fournissant des réponses négatives ne soient pas infectés par Map. La détection et le maintien des troupeaux non infectés reposent, dans les troupeaux sans signes cliniques, sur la répétition pendant plusieurs années de différents tests avec obtention de résultats toujours négatifs (Collins, 1996 ; Anonyme, 2009a). Parallèlement aux tests, des mesures de biosécurité doivent être mises en place dans les troupeaux certifiés pour minimiser le risque d'introduction de Map (contrôle des achats, mesures environnementales). L'intérêt de la certification est d'obtenir des animaux présentant un risque d'infection par Map très faible. Cette démarche représente un coût important qui ne peut pas être intégralement répercuté sur le prix de vente des reproducteurs, mais qui pourrait constituer une condition indispensable pour l'accès à certains marchés (export en particulier). La certification des troupeaux bovins est réalisée en France par l'ACERSA. Une certification des troupeaux caprins a été mise en place dans certaines régions d'Australie (Whittington et Sergeant, 2001) depuis 1999 afin de fournir une appréciation objective que les troupeaux certifiés ont un risque faible d'être infectés par Map. Il s'agit d'une démarche volontaire, qui permet de vendre les animaux de ces troupeaux dans les régions indemnes de paratuberculose. Avant d'entrer dans le programme de certification, les troupeaux reçoivent la visite d'un vétérinaire spécialisé. Puis les animaux sont testés tous les ans par des cultures fécales de mélange ou par des tests sérologiques. Trois niveaux de garantie ont été définis, en fonction de l'ancienneté dans le programme (Anonyme, 2009c). En 2009, 13 troupeaux caprins étaient en niveau 1, 19 troupeaux étaient en niveau 2 et 11 troupeaux étaient en niveau 3, alors que dans le même temps 20 troupeaux caprins étaient infectés par Map (Anonyme, 2009b).

Au total, les résultats produits fournissent des éléments de connaissance pour l'élaboration des plans de lutte contre l'infection par Map chez les caprins, dans les conditions françaises d'élevage : l'évaluation des outils de diagnostic a confirmé leurs performances limitées, surtout en terme de sensibilité, et la prévalence de l'infection a été définie au niveau national, en ce qui concerne les troupeaux et intra-troupeau. Des études complémentaires restent néanmoins nécessaires. Elles concernent notamment les outils de diagnostic, avec :

- l'amélioration des outils de détection des réactions immunitaires (cellulaires et humorales) par utilisation d'antigènes plus sensibles,
- l'amélioration de la précocité des outils de détection des réactions immunitaires (cellulaires et humorales),
- l'évaluation des outils pour la détection des caprins fortement excréteurs.

L'efficacité des mesures de lutte devrait également être évaluée chez les caprins, en particulier :

- l'impact de la vaccination,
- l'efficacité des mesures de protection des chevrettes de renouvellement,
- l'impact des réformes sur l'évolution de la prévalence intra-troupeau,
- la décontamination des fumiers.

Par ailleurs, avec la mise en œuvre des plans de lutte, il est nécessaire :

- d'identifier des facteurs qui favorisent l'expression clinique, afin de proposer aux éleveurs des pratiques d'élevage qui leur permettent de limiter l'expression clinique,
- d'évaluer l'impact économique de l'infection par Map dans les élevages caprins.

Ultérieurement, les données produites pourraient permettre d'évaluer les effets à long terme et l'intérêt économique des différentes options de lutte contre l'infection par Map chez les

caprins avec le recours à la modélisation, comme cela a été fait chez les bovins (Groenendaal et al., 2002 ; Dorshorst et al., 2006 ; Kudahl et al., 2007 ; Kudahl et al., 2008).

## Conclusion

Les résultats attendus de cette thèse étaient de disposer de connaissances sur la prévalence de l'infection par Map dans les troupeaux caprins français, ainsi que de décrire la variabilité des performances des outils de diagnostic de l'infection par Map chez les caprins. Des outils et des approches complémentaires ont été utilisés dans les différentes études.

Ainsi, une enquête sérologique réalisée avec un test ELISA commercial (ELISA Paratuberculose anticorps bicupule®, Institut Pourquier, Montpellier, France) dont les performances (sensibilité et spécificité) pour la détection de l'infection par Map ont été déterminées, a permis d'estimer une prévalence de l'infection par Map chez les caprins en France, tant au niveau troupeau, qu'au niveau individuel, à 63% (IC à 95% : 41-84) et 7% (IC à 95% : 6-7) respectivement. Dans les troupeaux séropositifs, les prévalences intra-troupeaux sont très variables (entre 1 et 33%). L'infection par Map est donc largement répandue dans les troupeaux caprins français. Ces données constituent les premiers éléments pour décider de la mise en œuvre éventuelle d'actions collectives de maîtrise de l'infection par Map chez les caprins en France. Il n'existe pas de données précises concernant la prévalence de l'infection chez les ovins et les bovins, même si pour ces derniers une lutte collective est organisée par les GDS.

Pour la détection des caprins infectés par Map, le même test ELISA réalisé chez des caprins de tous âges, a une sensibilité estimée à 53% et une spécificité estimée à 100% (chapitre A-I), alors que pour des caprins âgés de 2 à 3 ans, l'estimation de la sensibilité a été améliorée (75%) mais l'estimation de la spécificité a été dégradée (96%) (chapitre B – I).

Pour la détection des animaux excréteurs (chapitre B-II), les meilleures estimations des performances du même test ELISA ont été obtenues en combinant les résultats obtenus à 1,8 et 2,5 ans. Pour la détection de cet état, la sensibilité est beaucoup plus faible que pour la détection des caprins infectés par Map (estimée à 29%) mais la spécificité reste élevée (estimée à 100%). En revanche, la sensibilité du test de l'IFN $\gamma$  pour la détection des animaux excréteurs est supérieure à celle du test ELISA (estimée à 49 % pour des animaux âgés de 1 à 2,5 ans), et du même ordre de grandeur que celle du test ELISA pour la détection des animaux infectés. La spécificité du test IFN $\gamma$  a été estimée à 100% quel que soit l'âge des animaux étudiés.

Les différentes études confirment donc que les tests de diagnostic ont souvent des sensibilités faibles et des spécificités élevées. Ainsi, la réalisation d'un test ELISA sur des animaux âgés de 2 à 3 ans a une sensibilité de 76% pour la détection des animaux infectés. Pour la détection des caprins excréteurs la meilleure sensibilité est obtenue pour le test de l'IFN $\gamma$  à partir de 22 mois mais reste modeste (33% dans notre étude). Il n'est donc pas possible de détecter tous les caprins infectés ou excréteurs. En revanche, la spécificité élevée des tests rend pertinente l'élimination des animaux positifs, mais n'est pas suffisante à elle seule, à l'échelle du troupeau, pour l'assainissement. Les tests immunitaires doivent donc être renouvelés ou être associés à des tests directs, comme la culture fécale ou la PCR.

## Références bibliographiques

- 1 . Agreste. 2009 Enquête structure 2007. <http://agreste.maapar.lbn.fr/tableviewer/document.aspx?FileId=1292>. 14/04/2009
- 2 . Alinovi, C.A., Wu, C.C., Lin, T.L., 2009a. In utero *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection of a pygmy goat. *Veterinary Record*, 164(9), 276-277.
- 3 . Alinovi, C.A., Ward, M.P., Lin, T.L., Moore, G.E., Wu, C.C., 2009b. Real-time PCR, compared to liquid and solid culture media and ELISA, for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology*, 136(1-2), 177-179.
- 4 . Allworth, M.B. Kennedy, D.J., 2000. Progress in national control and assurance programs for ovine Johne's disease in Australia. *Veterinary Microbiology*, 77(3-4), 415-422.
- 5 . Alonso-Hearn, M., Molina, E., Geijo, M., Vazquez, P., Sevilla, I., Garrido, J.M., Juste, R.A., 2009. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from muscle tissue of naturally infected cattle. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(4), 513-518.
- 6 . Anonyme, 2000. Possible links between Crohn's disease and paratuberculosis. Bruxelles, European Commission -DG SANCO. 76 p.
- 7 . Anonyme, 2004. Maladies animales réputées contagieuses, maladies animales à déclaration obligatoire - Rapport du CES Santé animale de l'Afssa. 37 p.
- 8 . Anonyme, 2008a. La tuberculose animale - Cours des maladies contagieuses - Ecoles nationales Vétérinaires. 74 p.
- 9 . Anonyme, 2008b. Résultats de contrôle laitier des espèces bovine et caprine (campagne 2007), Institut de l'élevage. 107 p.
- 10 . Anonyme, 2009a. Paratuberculose des ruminants. Rapport Afssa. 87 p.
- 11 . Anonyme, 2009b. JD News. 7 p.
- 12 . Anonyme, 2009c. GoatMAP. Rules and guidelines of the Australian Johne's Disease market assurance program for goats, Animal Health Australia. 67 p.
- 13 . Antognoli, M.C., Hirst, H.L., Garry, F.B., Salman, M.D., 2007. Immune response to and faecal shedding of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in young dairy calves, and the association between test results in the calves and the infection status of their dams. *Zoonoses Public Health*, 54(3-4), 152-159.
- 14 . Antognoli, M.C., Garry, F.B., Hirst, H.L., Lombard, J.E., Dennis, M.M., Gould, D.H., Salman, M.D., 2008. Characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* disseminated infection in dairy cattle and its association with antemortem test results. *Veterinary Microbiology*, 127(3-4), 300-308.
- 15 . Autschbach, F., Eisold, S., Hinz, U., Zinser, S., Linnebacher, M., Giese, T., Loffler, T., Buchler, M.W., Schmidt, J., 2005. High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. *Gut*, 54(7), 944-949.
- 16 . Bannantine, J.P., Huntley, J.F., Miltner, E., Stabel, J.R., Bermudez, L.E., 2003. The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 35 kDa protein plays a role in invasion of bovine epithelial cells. *Microbiology*, 149, 2061-2069.
- 17 . Barbin, G., Bernoux, P., Chotteau, P., Guesdon, J.-C., Monniot, C., Mottet, A., Perot, C., Richard, M., You, G., 2008. L'année économique caprine 2007. Projection à l'horizon 2015. Vol. 376b. Paris, Institut de l'élevage. 80 p.
- 18 . Bauerfeind, R., Benazzi, S., Weiss, R., Schliesser, T., Willems, H., Baljer, G., 1996. Molecular characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* isolates from sheep,

- goats, and cattle by hybridization with a DNA probe to insertion element IS900. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(7), 1617-1621.
- 19 . Beaudreau, F., Belliard, M., Joly, A., Seegers, H., 2007. Reduction in milk yield associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map) infection in dairy cows. *Veterinary Research*, 38(4), 625-634.
  - 20 . Begara-McGorum, I., Wildblood, L.A., Clarke, C.J., Connor, K.M., Stevenson, K., McInnes, C.J., Sharp, J.M., Jones, D.G., 1998. Early immunopathological events in experimental ovine paratuberculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 63(3), 265-287.
  - 21 . Benedictus, A., Mitchell, R.M., Linde-Widmann, M., Sweeney, R., Fyock, T., Schukken, Y.H., Whitlock, R.H., 2008. Transmission parameters of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in a dairy herd going through a control program. *Preventive Veterinary Medicine*, 83(3-4), 215-227.
  - 22 . Benedictus, G., Dijkhuizen, A.A., Stelwagen, J., 1987. Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. *Veterinary Record*, 121(7), 142-146.
  - 23 . Benedictus, G., Dinkla, E.T.B., Wentink, G.H., 1988. Preliminary results of vaccination against paratuberculosis in adult dairy cattle. in *Second International Colloquium on Paratuberculosis*. Paris, France.
  - 24 . Benedictus, G., Verhoeff, J., Schukken, Y.H., Hesselink, J.W., 2000. Dutch paratuberculosis programme history, principles and development. *Veterinary Microbiology*, 77(3-4), 399-413.
  - 25 . Berghaus, R.D., Farver, T.B., Anderson, R.J., Jaravata, C.C., Gardner, I.A., 2006. Environmental sampling for detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* on large California dairies. *Journal of Dairy Science*, 89(3), 963-970.
  - 26 . Biet, F., Boschioli, M.L., Thorel, M.F., Guilloteau, L.A., 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium*-intracellulare complex (MAC). *Veterinary Research*, 36(3), 411-436.
  - 27 . Biet, F., Bay, S., Thibault, V.C., Euphrasie, D., Grayon, M., Ganneau, C., Lanotte, P., Daffe, M., Gokhale, R., Etienne, G., Reyrat, J.M., 2008. Lipopentapeptide induces a strong host humoral response and distinguishes *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from *M. avium* subsp. *avium*. *Vaccine*, 26(2), 257-268.
  - 28 . Bosshard, C., Stephan, R., Tasara, T., 2006. Application of an F57 sequence-based real-time PCR assay for *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bulk tank raw milk and slaughtered healthy dairy cows. *Journal of Food Protection*, 69(7), 1662-1667.
  - 29 . Bossis, N., Guinamard, C., Caramelle-Holtz, E., Barbin, G., 2008. Les systèmes caprins en France. Evolution des structures et résultats technico-économique. Campagne 2006. Paris, Institut de l'élevage. 20 p.
  - 30 . Bouyer, J., Hémon, D., Cordier, S., Derriennic, F., Stücker, I., Stengel, B., Clavel, J., 1995, Epidémiologie : principes et méthodes quantitatives: Les éditions INSERM. 498 p.
  - 31 . Bouzigues, A., 2006. Intérêt du dosage de l'interféron gamma dans le diagnostic de la paratuberculose caprine. *Thèse Vétérinaire, Nantes, 109 p.*
  - 32 . Brady, C., O'Grady, D., O'Meara, F., Egan, J., Bassett, H., 2008. Relationships between clinical signs, pathological changes and tissue distribution of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in 21 cows from herds affected by Johne's disease. *Veterinary Record*, 162(5), 147-152.
  - 33 . Branscum, A.J., Gardner, I.A., Johnson, W.O., 2005. Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modeling. *Preventive Veterinary Medicine*, 68(2-4), 145-163.

- 34 . Brenner, H. Gefeller, O., 1997. Variation of sensitivity, specificity, likelihood ratios and predictive values with disease prevalence. *Statistics in Medicine*, 16, 981-991.
- 35 . Brosch, R., Pym, A.S., Gordon, S.V., Cole, S.T., 2001. The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. *Trends in Microbiology*, 9(9), 452-458.
- 36 . Buergelt, C.D. Duncan, J.R., 1978. Age and milk production data of cattle culled from a dairy herd with paratuberculosis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 173, 478-480.
- 37 . Burrells, C., Inglis, N.F., Davies, R.C., Sharp, J.M., 1995. Detection of specific T cell reactivity in sheep infected with *Mycobacterium avium* subspecies *silvaticum* and *paratuberculosis* using two defined mycobacterial antigens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 45(3-4), 311-320.
- 38 . Bush, R.D., Windsor, P.A., Toribio, J.A., 2006. Losses of adult sheep due to ovine Johne's disease in 12 infected flocks over a 3-year period. *Australian Veterinary Journal*, 84(7), 246-253.
- 39 . Casamitjana, P. Vialard, J., 2002. Spécificités de la paratuberculose caprine. *Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires*, Hors série paratuberculose des ruminants, 81-84.
- 40 . Catton, B.A., 2002. Paucibacillary paratuberculosis in a goat. *Canadian Veterinary Journal*, 43(10), 787-788.
- 41 . Cerf, O. Griffiths, M.W., 2000. *Mycobacterium paratuberculosis* heat resistance. *Letters in Applied Microbiology*, 30(4), 341-344.
- 42 . Chacon, O., Bermudez, L.E., Barletta, R.G., 2004. Johne's disease, inflammatory bowel disease, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Annual Reviews in Microbiology*, 58, 329-363.
- 43 . Chiodini, R.J., 1989. Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clinical and Microbiological Review*, 2(1), 90-117.
- 44 . Chiodini, R.J., 1996. Immunology: resistance to paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 12(2), 313-343.
- 45 . Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J., Merkal, R.S., 1984a. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Veterinary*, 74(3), 218-262.
- 46 . Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J., Thayer, W.R., Merkal, R.S., Coutu, J.A., 1984b. Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *Digestive Disease Science*, 29(12), 1073-1079.
- 47 . Cirone, K.M., Morsella, C.G., Colombo, D., Paolicchi, F.A., 2006. Viability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in elaborated goat and bovine milk cheese maturity. *Acta Bioquímica Clínica latinoamericana*, 40(4), 507-513.
- 48 . Clark, D.L., Jr., Koziczkowski, J.J., Radcliff, R.P., Carlson, R.A., Ellingson, J.L., 2008. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: comparing fecal culture versus serum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science*, 91(7), 2620-2627.
- 49 . Clarke, C.J., 1997. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *Journal of Comparative Pathology*, 116(3), 217-261.
- 50 . Clarke, C.J. 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.

- 51 . Coelho, A.C., Pinto, M.L., Coelho, A.M., Rodrigues, J., 2008. Ziehl-Neelsen staining as a fast method in the diagnosis of ovine paratuberculosis *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 60(5), 1097-1102.
- 52 . Coetsier, C., Vannuffel, P., Blondeel, N., Deneff, J.F., Cocito, C., Gala, J.L., 2000. Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin- fixed paraffin-embedded tissues from cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(8), 3048-3054.
- 53 . Collins, D.M., 2003. Update on paratuberculosis: 2. Pathology and diagnosis. *Irish Veterinary Journal*, 56, 619-623.
- 54 . Collins, D.M., Gabric, D.M., de Lisle, G.W., 1990a. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(7), 1591-1596.
- 55 . Collins, M. Manning, E. 2010 [http://www.johnes.org/general/\\_Pathgrossileum.html](http://www.johnes.org/general/_Pathgrossileum.html). 20 juillet 2010
- 56 . Collins, M.T., 1996. Diagnosis of paratuberculosis. *The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 12(2), 357-371.
- 57 . Collins, M.T., Spahr, U., Murphy, P.M., 2001. Ecological characteristics of *M. paratuberculosis*. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 362, 32-40.
- 58 . Collins, M.T., Eggleston, V., Manning, E.J., 2010. Successful control of Johne's disease in nine dairy herds: results of a six-year field trial. *Journal of Dairy Science*, 93, 1638-1643.
- 59 . Collins, M.T., Sockett, D.C., Ridge, S., Cox, J.C., 1991. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for Johne's disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(2), 272-276.
- 60 . Collins, M.T., Kenefick, K.B., Sockett, D.C., Lambrecht, R.S., McDonald, J., Jorgensen, J.B., 1990b. Enhanced radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by using filter-concentrated bovine fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(11), 2514-2519.
- 61 . Collins, M.T., Wells, S.J., Petrini, K.R., Collins, J.E., Schultz, R.D., Whitlock, R.H., 2005. Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(6), 685-692.
- 62 . Cook, K.L. Britt, J.S., 2007. Optimization of methods for detecting *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in environmental samples using quantitative, real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 69(1), 154-160.
- 63 . Corpa, J.M., Perez, V., Garcia Marin, J.F., 2000a. Differences in the immune responses in lambs and kids vaccinated against paratuberculosis, according to the age of vaccination. *Veterinary Microbiology*, 77(3-4), 475-485.
- 64 . Corpa, J.M., Garrido, J., Garcia Marin, J.F., Perez, V., 2000b. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *Journal of Comparative Pathology*, 122(4), 255-265.
- 65 . Corpa, J.M., Perez, V., Sanchez, M.A., Marin, J.F., 2000c. Control of paratuberculosis (Johne's disease) in goats by vaccination of adult animals. *Veterinary Record*, 146(7), 195-196.
- 66 . Cousins, D.V., Evans, R.J., Francis, B.R., 1995. Use of BACTEC radiometric culture method and polymerase chain reaction for the rapid screening of faeces and tissues for *Mycobacterium paratuberculosis*. *Australian Veterinary Journal*, 72(12), 458-462.
- 67 . Cousins, D.V., Whittington, R., Marsh, I., Masters, A., Evans, R.J., Kluver, P., 1999. *Mycobacteria* distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable IS900

- polymerase chain reaction: implications for diagnosis. *Molecular Cell Probes*, 13(6), 431-442.
- 68 . Cranwell, M.P., 1993. Control of Johne's disease in a flock of sheep by vaccination. *Veterinary Record*, 133(9), 219-220.
- 69 . Crowther, R.W., Polydorou, K., Nitti, S., Phyrilla, A., 1976. Johne's disease in sheep in Cyprus. *Veterinary Record*, 98(23), 463.
- 70 . Cucino, C. Sonnenberg, A., 2001. Occupational mortality from inflammatory bowel disease in the United States 1991-1996. *American Journal of Gastroenterology*, 96(4), 1101-1105.
- 71 . de Juan, L., Mateos, A., Dominguez, L., Sharp, J.M., Stevenson, K., 2005. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology*, 106(3-4), 249-257.
- 72 . de Juan, L., Alvarez, J., Aranaz, A., Rodriguez, A., Romero, B., Bezos, J., Mateos, A., Dominguez, L., 2006. Molecular epidemiology of Types I/III strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolated from goats and cattle. *Veterinary Microbiology*, 115(1-3), 102-110.
- 73 . De Kesel, M., Gilot, P., Misonne, M.C., Coene, M., Cocito, C., 1993. Cloning and expression of portions of the 34-kilodalton-protein gene of *Mycobacterium paratuberculosis*: its application to serological analysis of Johne's disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(4), 947-954.
- 74 . Dendukuri, N., Hadgu, A., Wang, L., 2009. Modeling conditional dependence between diagnostic tests: a multiple latent variable model. *Statistics in Medicine*, 28(3), 441-461.
- 75 . Dimareli-Malli, Z., Stevenson, K., Sarris, K., Sossidou, K., 2009. Study of microbiological and molecular typing aspects of paratuberculosis in sheep and goats in Northern Greece. *Transboundary and Emerging Diseases*, 56(6-7), 285-290.
- 76 . Djonne, B., 2003. Paratuberculosis in goats-A special focus on the Nordic countries. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 44(3-4), 257-259.
- 77 . Djonne, B., Jensen, M.R., Grant, I.R., Holstad, G., 2003. Detection by immunomagnetic PCR of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from dairy goats in Norway. *Veterinary Microbiology*, 92(1-2), 135-143.
- 78 . Dohmann, K., Strommenger, B., Stevenson, K., de Juan, L., Stratmann, J., Kapur, V., Bull, T.J., Gerlach, G.F., 2003. Characterization of genetic differences between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I and type II isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11), 5215-5223.
- 79 . Donaghy, J., Keyser, M., Johnston, J., Cilliers, F.P., Gouws, P.A., Rowe, M.T., 2009. Inactivation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in milk by UV treatment. *Letters in Applied Microbiology*, 49(2), 217-221.
- 80 . Donaghy, J.A., Linton, M., Patterson, M.F., Rowe, M.T., 2007. Effect of high pressure and pasteurization on *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in milk. *Letters in Applied Microbiology*, 45(2), 154-159.
- 81 . Dorshorst, N.C., Collins, M.T., Lombard, J.E., 2006. Decision analysis model for paratuberculosis control in commercial dairy herds. *Prev Vet Med*, 75(1-2), 92-122.
- 82 . Dreier, S., Khol, J.L., Stein, B., Fuchs, K., Gutler, S., Baumgartner, W., 2006. Serological, bacteriological and molecularbiological survey of paratuberculosis (Johne's disease) in Austrian cattle. *Journal of Veterinary Medicine B*, 53(10), 477-481.

- 83 . Eamens, G.J., Walker, D.M., Porter, N.S., Fell, S.A., 2007. Pooled faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in goats. *Australian Veterinary Journal*, 85(6), 243-251.
- 84 . Ellis, T.M., Norris, R.T., Martin, P., Casey, R.H., Hawkins, C.D., 1998. Evidence for freedom from Johne's disease in cattle and goats in Western Australia. *Australian Veterinary Journal*, 76(9), 630-633.
- 85 . Eltholth, M.M., Marsh, V.R., Van Winden, S., Guitian, F.J., 2009. Contamination of food products with *Mycobacterium avium paratuberculosis*: a systematic review. *Journal of Applied Microbiology*, 107(4), 1061-1071.
- 86 . Englund, S., Bolske, G., Johansson, K.E., 2002. An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Letter*, 209, 267-271.
- 87 . Enoe, C., Georgiadis, M.P., Johnson, W.O., 2000. Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown. *Preventive Veterinary Medicine*, 45(1-2), 61-81.
- 88 . Euzéby, J. 2009 Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/mm/chelonae.html>. 04/08/2009
- 89 . Fang, Y., Wu, W.H., Pepper, J.L., Larsen, J.L., Marras, S.A., Nelson, E.A., Epperson, W.B., Christopher-Hennings, J., 2002. Comparison of real-time, quantitative PCR with molecular beacons to nested PCR and culture methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine fecal samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(1), 287-291.
- 90 . Ferrouillet, C., Wells, S.J., Hartmann, W.L., Godden, S.M., Carrier, J., 2009. Decrease of Johne's disease prevalence and incidence in six Minnesota, USA, dairy cattle herds on a long-term management program. *Preventive Veterinary Medicine*, 88(2), 128-137.
- 91 . Florou, M., Leontides, L., Kostoulas, P., Billinis, C., Sofia, M., Kyriazakis, I., Lykotrafitis, F., 2008. Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from non-ruminant wildlife living in the sheds and on the pastures of Greek sheep and goats. *Epidemiology and Infection*, 136, 644-652.
- 92 . Fodstad, F.H. Gunnarsson, E., 1979. Post-mortem examination in the diagnosis of Johne's disease in goats. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 20, 157-167.
- 93 . G.E.B., 2008. Productions caprines lait et viande : chiffres clés 2008. Paris, Institut de l'élevage. 10 p.
- 94 . Garcia-Marin, J.F., Tellechea, J., Gutierrez, M., Corpa, J.M., Perez, V., 1999. Evaluation of two vaccines (killed and attenuated) against small ruminant paratuberculosis. in *Sixth International Colloquium on Paratuberculosis*. Melbourne, Australia.
- 95 . Gardner, I.A., Stryhn, H., Lind, P., Collins, M.T., 2000. Conditional dependence between tests affects the diagnosis and surveillance of animal diseases. *Preventive Veterinary Medicine*, 45(1-2), 107-122.
- 96 . Garrido, J.M., Cortabarría, N., Oguiza, J.A., Aduriz, G., Juste, R.A., 2000. Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. *Veterinary Microbiology*, 77(3-4), 379-386.
- 97 . Geisbauer, E., Khol, J.L., Wassertheurer, M., Damoser, J., Osterreicher, E., Dunser, M., Revilla-Fernandez, S., Baumgartner, W., 2007. Longterm investigation in an Austrian dairy herd with low prevalence of paratuberculosis detection of antibodies in blood and milk. *Veterinary Quarterly*, 29(4), 138-148.

- 98 . Georgiadis, M.P., Johnson, W.O., Gardner, I.A., Singh, R., 2003. Correlation-adjusted estimation of sensitivity and specificity of two diagnostic tests. *Applied Statistics*, 52, 63-76.
- 99 . Gezon, H.M., Bither, H.D., Gibbs, H.C., Acker, E.J., Hanson, L.A., Thompson, J.K., Jorgenson, R.D., 1988. Identification and control of paratuberculosis in a large goat herd. *American Journal of Veterinary Research*, 49(11), 1817-1823.
- 100 . Giese, S.B. Ahrens, P., 2000. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Veterinary Microbiology*, 77(3-4), 291-297.
- 101 . Gilot, P., De Kesel, M., Machtelinckx, L., Coene, M., Cocito, C., 1993. Isolation and sequencing of the gene coding for an antigenic 34-kilodalton protein of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 175(15), 4930-4935.
- 102 . Godden, S., McMartin, S., Feirtag, J., Stabel, J., Bey, R., Goyal, S., Metzger, L., Fetrow, J., Wells, S., Chester-Jones, H., 2006. Heat-treatment of bovine colostrum. II: effects of heating duration on pathogen viability and immunoglobulin G. *Journal of Dairy Science*, 89(9), 3476-3483.
- 103 . Gonda, M.G., Chang, Y.M., Shook, G.E., Collins, M.T., Kirkpatrick, B.W., 2006. Genetic variation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in US Holsteins. *Journal of Dairy Science*, 89(5), 1804-1812.
- 104 . Grant, I.R., 2003. *Mycobacterium paratuberculosis* and milk. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 44(3-4), 261-266.
- 105 . Grant, I.R., 2005. Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: the current position. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), 1282-1293.
- 106 . Grant, I.R., Ball, H.J., Neill, S.D., Rowe, M.T., 1996. Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cows' milk at pasteurization temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 631-636.
- 107 . Grant, I.R., O'Riordan, L.M., Ball, H.J., Rowe, M.T., 2001. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw sheep and goats' milk in England, Wales and Northern Ireland. *Veterinary Microbiology*, 79(2), 123-131.
- 108 . Grant, I.R., Pope, C.M., O'Riordan, L.M., Ball, H.J., Rowe, M.T., 2000. Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR. *Veterinary Microbiology*, 77(3-4), 369-378.
- 109 . Grant, I.R., Hitchings, E.I., McCartney, A., Ferguson, F., Rowe, M.T., 2002. Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurization on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in naturally infected cows' milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 602-607.
- 110 . Green, E.P., Tizard, M.L., Moss, M.T., Thompson, J., Winterbourne, D.J., McFadden, J.J., Hermon-Taylor, J., 1989. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Research*, 17(22), 9063-9073.
- 111 . Greenstein, R.J., 2003. Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *Lancet Infectious Disease*, 3(8), 507-514.
- 112 . Grewal, S.K., Rajeev, S., Sreevatsan, S., Michel, F.C., Jr., 2006. Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and other zoonotic pathogens during simulated composting, manure packing, and liquid storage of dairy manure. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 565-574.
- 113 . Groenendaal, H., Nielen, M., Jalvingh, A.W., Horst, S.H., Galligan, D.T., Hesselink, J.W., 2002. A simulation of Johne's disease control. *Prev Vet Med*, 54(3), 225-245.

- 114 . Gumber, S., Eamens, G., Whittington, R.J., 2006. Evaluation of a Pourquier ELISA kit in relation to agar gel immunodiffusion (AGID) test for assessment of the humoral immune response in sheep and goats with and without *Mycobacterium paratuberculosis* infection. *Veterinary Microbiology*, 115(1-3), 91-101.
- 115 . Gumber, S., Taylor, D.L., Whittington, R.J., 2009. Evaluation of the immunogenicity of recombinant stress-associated proteins during *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection: Implications for pathogenesis and diagnosis. *Veterinary Microbiology*, 137(3-4), 290-296.
- 116 . Gunnarsson, E. Fodstad, F.H., 1979. Analysis of antigens in *Mycobacterium paratuberculosis*. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 20(2), 200-215.
- 117 . Gwozdz, J.M., Reichel, M.P., Murray, A., Manktelow, W., West, D.M., Thompson, K.G., 1997. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine tissues and blood by the polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, 57(2-3), 233-244.
- 118 . Haines, D.M. West, K.H., 2005. Immunohistochemistry: forging the links between immunology and pathology. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108(1-2), 151-156.
- 119 . Hardin, L.E. Thorne, J.G., 1996. Comparison of milk with serum ELISA for the detection of paratuberculosis in dairy cows. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 209(1), 120-122.
- 120 . Harris, N.B. Barletta, R.G., 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 489-512.
- 121 . Hasvold, H.J., Valheim, M., Berntsen, G., Storset, A.K., 2002. In vitro responses to purified protein derivate of caprine T lymphocytes following vaccination with live strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 90(1-2), 79-89.
- 122 . Hendrick, S.H., Kelton, D.F., Leslie, K.E., Lissemore, K.D., Archambault, M., Duffield, T.F., 2005a. Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 227(8), 1302-1308.
- 123 . Hendrick, S.H., Duffield, T.E., Kelton, D.E., Leslie, K.E., Lissemore, K.D., Archambault, M., 2005b. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays performed on milk and serum samples for detection of paratuberculosis in lactating dairy cows. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 226(3), 424-428.
- 124 . Herthnek, D. Bolske, G., 2006. New PCR systems to confirm real-time PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *BMC Microbiology*, 6, 87.
- 125 . Hines, M.E., 2nd, Stiver, S., Giri, D., Whittington, L., Watson, C., Johnson, J., Musgrove, J., Pence, M., Hurley, D., Baldwin, C., Gardner, I.A., Aly, S., 2007a. Efficacy of spheroplastic and cell-wall competent vaccines for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in experimentally-challenged baby goats. *Veterinary Microbiology*, 120(3-4), 261-283.
- 126 . Hines, M.E., 2nd, Stabel, J.R., Sweeney, R.W., Griffin, F., Talaat, A.M., Bakker, D., Benedictus, G., Davis, W.C., de Lisle, G.W., Gardner, I.A., Juste, R.A., Kapur, V., Koets, A., McNair, J., Pruitt, G., Whitlock, R.H., 2007b. Experimental challenge models for Johne's disease: a review and proposed international guidelines. *Veterinary Microbiology*, 122(3-4), 197-222.
- 127 . Holstad, G., Sigurdardottir, O.G., Storset, A.K., Tharaldsen, J., Nyberg, O., Schonheit, J., Djonne, B., 2005. Description of the infection status in a Norwegian cattle herd naturally infected by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 46(1-2), 45-56.

- 128 . Hruska, K., Bartos, M., Kralik, P., Pavlik, I., 2005. *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in powdered infant milk: paratuberculosis in cattle - the public health problem to be solved. *Veterinarni Medicina*, 50, 327-335.
- 129 . Huda, A., Jensen, H.E., 2003. Comparison of histopathology, cultivation of tissues and rectal contents, and interferon-gamma and serum antibody responses for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Journal of Comparative Pathology*, 129(4), 259-267.
- 130 . Huda, A., Jungersen, G., Lind, P., 2004. Longitudinal study of interferon-gamma, serum antibody and milk antibody responses in cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology*, 104(1-2), 43-53.
- 131 . Hui, S.L., Walter, S.D., 1980. Estimating the error rates of diagnostic tests. *Biometrics*, 36(1), 167-171.
- 132 . Ikonomopoulos, J., Balaskas, C., Kantzoura, B., Fragiadaki, E., Pavlik, I., Bartos, M., Lukas, J.C., Gazouli, M., 2007. Comparative evaluation of positive tests to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in clinically healthy sheep and goats in south-west Greece using molecular techniques, serology, and culture. *Veterinary Journal*, 174(2), 337-343.
- 133 . Ireng, L.M., Walravens, K., Govaerts, M., Godfroid, J., Rosseels, V., Huygen, K., Gala, J.L., 2009. Development and validation of a triplex real-time PCR for rapid detection and specific identification of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in faecal samples. *Veterinary Microbiology*, 136(1-2), 166-172.
- 134 . Johnson, W.O., Gastwirth, J.L., Pearson, L.M., 2001. Screening without a "gold standard": the Hui-Walter paradigm revisited. *American Journal of Epidemiology*, 153(9), 921-924.
- 135 . Jubb, T.F., Galvin, J.W., 2004. Effect of a test and control program for bovine Johne's disease in Victorian dairy herds 1992 - 2002. *Australian Veterinary Journal*, 82(4), 228-232.
- 136 . Jungersen, G., Grell, S.N., Clemensen, A., Roust, T., Huda, A., Howard, C.J., 2005. Interleukin-12 potentiation of the interferon-gamma test rescues day-old blood samples for diagnosis of paratuberculosis PPD specific cellular mediated immune response. in *8th International Colloquium on Paratuberculosis*. Copenhagen, Denmark.
- 137 . Juste, R.A., Garcia Marin, J.F., Peris, B., Saez de Ocariz, C.S., Badiola, J.J., 1994. Experimental infection of vaccinated and non-vaccinated lambs with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Journal of Comparative Pathology*, 110(2), 185-194.
- 138 . Kaba, J., Gerlach, G.F., Nowicki, M., Rypula, K., 2008. Agreement between ELISA and complement fixation test used for diagnosing of paratuberculosis in goats. *Polish Journal of Veterinary Science*, 11(3), 209-212.
- 139 . Kalis, C.H., Hesselink, J.W., Barkema, H.W., Collins, M.T., 2000. Culture of strategically pooled bovine fecal samples as a method to screen herds for paratuberculosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12(6), 547-551.
- 140 . Kalis, C.H., Collins, M.T., Hesselink, J.W., Barkema, H.W., 2003. Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay. *Veterinary Microbiology*, 97(1-2), 73-86.
- 141 . Karcher, E.L., Beitz, D.C., Stabel, J.R., 2008a. Parturition invokes changes in peripheral blood mononuclear cell populations in Holstein dairy cows naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 124(1-2), 50-62.
- 142 . Karcher, E.L., Johnson, C.S., Beitz, D.C., Stabel, J.R., 2008b. Osteopontin immunoreactivity in the ileum and ileocecal lymph node of dairy cows naturally

- infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 126(1-2), 142-148.
- 143 . Kathaperumal, K., Kumanan, V., McDonough, S., Chen, L.H., Park, S.U., Moreira, M.A., Akey, B., Huntley, J., Chang, C.F., Chang, Y.F., 2009. Evaluation of immune responses and protective efficacy in a goat model following immunization with a cocktail of recombinant antigens and a polyprotein of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vaccine*, 27(1), 123-135.
  - 144 . Kennedy, D.J. Allworth, M.B., 2000. Progress in national control and assurance programs for bovine Johne's disease in Australia. *Veterinary Microbiology*, 77(3-4), 443-451.
  - 145 . Kennedy, K.J. Tetlow, L., 2008. Test and teach. Chronic soft tissue inflammation following accidental inoculation with a sheep vaccine. Diagnosis: Immune response to mineral oil and *Mycobacterium* antigens in vaccine strain (Gudair) of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Pathology*, 40(7), 711-713.
  - 146 . Klausen, J., Huda, A., Ekeroth, L., Ahrens, P., 2003. Evaluation of serum and milk ELISAs for paratuberculosis in Danish dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, 58(3-4), 171-178.
  - 147 . Klein, S., 2006. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* et maladie de Crohn : actualités sur un risque hypothétique de zoonose. *Thèse vétérinaire*. Maisons-Alfort, 251 p.
  - 148 . Koets, A., Hoek, A., Langelaar, M., Overdijk, M., Santema, W., Franken, P., Eden, W., Rutten, V., 2006. Mycobacterial 70 kD heat-shock protein is an effective subunit vaccine against bovine paratuberculosis. *Vaccine*, 24(14), 2550-2559.
  - 149 . Koets, A.P., Adugna, G., Janss, L.L., van Weering, H.J., Kalis, C.H., Wentink, G.H., Rutten, V.P., Schukken, Y.H., 2000. Genetic variation of susceptibility to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 83(11), 2702-2708.
  - 150 . Kormendy, B., 1988. Diagnostic value of mammalian, avian and johnin PPD tuberculins in cattle herds infected by *Mycobacterium paratuberculosis*. *Acta Veterinaria Hungarica*, 36(3-4), 177-183.
  - 151 . Kormendy, B., 1994. The effect of vaccination on the prevalence of paratuberculosis in large dairy herds. *Veterinary Microbiology*, 41(1-2), 117-125.
  - 152 . Kostoulas, P., Leontides, L., Billinis, C., Amiridis, G.S., Florou, M., 2006a. The association of sub-clinical paratuberculosis with the fertility of Greek dairy ewes and goats varies with parity. *Preventive Veterinary Medicine*, 74(2-3), 226-238.
  - 153 . Kostoulas, P., Leontides, L., Enoe, C., Billinis, C., Florou, M., Sofia, M., 2006b. 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(1-2), 56-73.
  - 154 . Kruze, J., Salgado, M., Paredes, E., Mella, A., Collins, M.T., 2006. Goat paratuberculosis in Chile: first isolation and confirmation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in a dairy goat. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18(5), 476-479.
  - 155 . Kudahl, A., Nielsen, S.S., Sorensen, J.T., 2004. Relationship between antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and shape of lactation curves. *Preventive Veterinary Medicine*, 62(2), 119-134.
  - 156 . Kudahl, A.B., Nielsen, S.S., Ostergaard, S., 2008. Economy, efficacy, and feasibility of a risk-based control program against paratuberculosis. *Journal of Dairy Science*, 91(12), 4599-4609.

- 157 . Kudahl, A.B., Ostergaard, S., Sorensen, J.T., Nielsen, S.S., 2007. A stochastic model simulating paratuberculosis in a dairy herd. *Preventive Veterinary Medicine*, 78(2), 97-117.
- 158 . Kumar, S., Singh, S.V., Singh, A.V., Singh, P.K., Sohal, J.S., Maitra, A., 2010. Wildlife (*Boselaphus tragocamelus*)-small ruminant (goat and sheep) interface in the transmission of 'Bison type' genotype of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in India. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 33(2), 145-159.
- 159 . Kumar, S., Singh, S.V., Sevilla, I., Singh, A.V., Whittington, R.J., Juste, R.A., Sharma, G., Singh, P.K., Sofhal, J.S., 2008. Lacto-prevalence, genotyping of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and evaluation of three diagnostic tests in milk of naturally infected goat herds. *Small Ruminant Research*, 74, 37-44.
- 160 . Lambeth, C., Reddacliff, L.A., Windsor, P., Abbott, K.A., McGregor, H., Whittington, R.J., 2004. Intrauterine and transmammary transmission of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in sheep. *Australian Veterinary Journal*, 82(8), 504-508.
- 161 . Landis, J.R. Koch, G.G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33(1), 159-174.
- 162 . Larsen, A.B., Merkal, R.S., Vardaman, T.H., 1956. Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research*, 17(64), 549-551.
- 163 . Larsen, A.B., Moyle, A.I., Himes, E.M., 1978. Experimental vaccination of cattle against paratuberculosis (Johne's disease) with killed bacterial vaccines: a controlled field study. *American Journal of Veterinary Research*, 39(1), 65-69.
- 164 . Lascelles, A.K., 1979. The immune system on the ruminant mammary gland and its role in the control of mastitis. *Journal of Dairy Science*, 62(1), 154-167.
- 165 . Lenghaus, C., Badman, R.T., Gillick, J.C., 1977. Johne's disease in goats. *Australian Veterinary Journal*, 53(9), 460.
- 166 . Leroy, B., Roupie, V., Noel-Georis, I., Rosseels, V., Walravens, K., Govaerts, M., Huygen, K., Wattiez, R., 2007. Antigen discovery: a postgenomic approach to paratuberculosis diagnosis. *Proteomics*, 7(7), 1164-1176.
- 167 . Leroy, B., Viart, S., Trincherro, N., Roupie, V., Govaerts, M., Letesson, J.J., Huygen, K., Wattiez, R., 2009. Use of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* specific coding sequences for serodiagnosis of bovine paratuberculosis. *Vet Microbiol*, 135(3-4), 313-319.
- 168 . Leslie, P., Riemann, H., West, G., Moe, A., 1988. Vaccination field trial for *Mycobacterium paratuberculosis* (Johne's disease) in the caprine species. in *Second International Colloquium on Paratuberculosis*. Paris, France.
- 169 . Lilenbaum, W., Marassi, C.D., Oelemann, W.M.R., 2007. Paratuberculosis: an update. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 580-590.
- 170 . Lombard, J.E., Garry, F.B., McCluskey, B.J., Wagner, B.A., 2005. Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 227(12), 1975-1981.
- 171 . Lombard, J.E., Byrem, T.M., Wagner, B.A., McCluskey, B.J., 2006a. Comparison of milk and serum enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in dairy cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18(5), 448-458.
- 172 . Lombard, J.E., Wagner, B.A., Smith, R.L., McCluskey, B.J., Harris, B.N., Payeur, J.B., Garry, F.B., Salman, M.D., 2006b. Evaluation of environmental sampling and culture to determine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* distribution and herd infection status on US dairy operations. *Journal of Dairy Science*, 89(11), 4163-4171.

- 173 . Lopez-Pedemonte, T., Sevilla, I., Garrido, J.M., Aduriz, G., Guamis, B., Juste, R.A., Roig-Sagues, A.X., 2006. Inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cow's milk by means of high hydrostatic pressure at mild temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 4446-4449.
- 174 . Lovell, R., Levi, M., Francis, J., 1944. Studies on the survival of Johne's bacilli. *Journal of Comparative Pathology*, 54, 120-129.
- 175 . Lybeck, K.R., Storset, A.K., Olsen, I., 2009. Neutralization of interleukin-10 from CD14(+) monocytes enhances gamma interferon production in peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-infected goats. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(7), 1003-1011.
- 176 . Malher, X., Beaudeau, F., Poupin, B., Falaise, G., Losdat, J., 1999. Réforme et renouvellement dans les grands troupeaux laitiers caprins de l'Ouest de la France. *INRA Productions Animales*, 12(2), 123-133.
- 177 . Manning, E.J., Collins, M.T., 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Revue Scientifique et Technique de l'O.I.E.*, 20(1), 133-150.
- 178 . Manning, E.J., Steinberg, H., Krebs, V., Collins, M.T., 2003. Diagnostic testing patterns of natural *Mycobacterium paratuberculosis* infection in pygmy goats. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 67(3), 213-218.
- 179 . Manning, E.J., Cushing, H.F., Hietala, S., Wolf, C.B., 2007. Impact of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection on serologic surveillance for Johne's disease in goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(2), 187-190.
- 180 . Marly, J., Thorel, M.F., Perrin, G., Pardon, P., Guerrault, P., 1988. Suivi de vaccination de chevrettes contre la paratuberculose : conséquences cliniques, sérologiques et allergiques, et épreuve virulente. in *Second International Colloquium on Paratuberculosis*. Paris, France.
- 181 . Martin, S.W., Shoukri, M., Thorburn, M.A., 1992. Evaluating the health status of herds based on tests applied to individuals. *Preventive Veterinary Medicine*, 14, 33-43.
- 182 . Martinson, S.A., Hanna, P.E., Ikede, B.O., Lewis, J.P., Miller, L.M., Keefe, G.P., McKenna, S.L., 2008. Comparison of bacterial culture, histopathology, and immunohistochemistry for the diagnosis of Johne's disease in culled dairy cows. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(1), 51-57.
- 183 . McDonald, W.L., Ridge, S.E., Hope, A.F., Condron, R.J., 1999. Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in young cattle. *Australian Veterinary Journal*, 77(2), 113-119.
- 184 . McKenna, S.L., Barkema, H.W., Keefe, G.P., Sockett, D.C., 2006. Agreement between three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle. *Veterinary Microbiology*, 114(3-4), 285-291.
- 185 . Meadus, W.J., Gill, C.O., Duff, P., Badoni, M., Saucier, L., 2008. Prevalence on beef carcasses of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA. *International Journal of Food Microbiology*, 124(3), 291-294.
- 186 . Mendes, S., Boinas, F., Albuquerque, T., Fernandes, L., Afonso, A., Amado, A., 2004. Epidemiological studies on paratuberculosis in small ruminants in Portugal. *Epidémiologie et santé animale*, 45, 61-71.
- 187 . Mercier, P., Baudry, C., Martin, J., Bertin, C., Laroucau, K., Beaudeau, F., Seegers, H., Malher, X., 2007. Utilisation des techniques bayésiennes pour estimer les caractéristiques de 2 tests de diagnostic de la paratuberculose caprine *Epidémiologie et santé animale*, 51, 57-64.
- 188 . Mercier, P., Baudry, C., Martin, J., Bertin, C., Laroucau, K., Beaudeau, F., Seegers, H., Malher, X., 2009. Utilisation des techniques bayésiennes pour estimer les

- caractéristiques de deux tests de diagnostic de la paratuberculose caprine - Erratum. *Epidémiologie et santé animale*, 56, 255-256.
- 189 . Milner, A.R., Mack, W.N., Coates, K.J., 1989. A modified ELISA for the detection of goats infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Australian Veterinary Journal*, 66(9), 305-307.
- 190 . Mobius, P., Hotzel, H., Rassbach, A., Kohler, H., 2008. Comparison of 13 single-round and nested PCR assays targeting IS900, ISMav2, f57 and locus 255 for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology*, 126(4), 324-333.
- 191 . Molina, A., Morera, L., Llanes, D., 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. *American Journal of Veterinary Research*, 52(6), 863-868.
- 192 . Momotami, E., Whipple, D.L., Thiermann, A.B., Cheville, N.F., 1988. Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Veterinary Pathology*, 25, 131-137.
- 193 . Mortensen, H., Nielsen, S.S., Berg, P., 2004. Genetic variation and heritability of the antibody response to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Danish Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 87(7), 2108-2113.
- 194 . Moss, M.T., Sanderson, J.D., Tizard, M.L., Hermon-Taylor, J., el-Zaatari, F.A., Markesich, D.C., Graham, D.Y., 1992. Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* in long term cultures from Crohn's disease and control tissues. *Gut*, 33(9), 1209-1213.
- 195 . Motiwala, A.S., Amonsin, A., Strother, M., Manning, E.J., Kapur, V., Sreevatsan, S., 2004. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates recovered from wild animal species. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4), 1703-1712.
- 196 . Muehlherr, J.E., Zweifel, C., Corti, S., Blanco, J.E., Stephan, R., 2003. Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. *Journal of Dairy Science*, 86, 3849-3856.
- 197 . Munjal, S.K., Boehmer, J., Beyerbach, M., Strutzberg-Minder, K., Homuth, M., 2004. Evaluation of a LAM ELISA for diagnosis of paratuberculosis in sheep and goats. *Veterinary Microbiology*, 103(1-2), 107-114.
- 198 . Munjal, S.K., Tripathi, B.N., Paliwal, O.P., Boehmer, J., Homuth, M., 2007. Application of different methods for the diagnosis of experimental paratuberculosis in goats. *Zoonoses Public Health*, 54(3-4), 140-146.
- 199 . Muskens, J., Barkema, H.W., Russchen, E., van Maanen, K., Schukken, Y.H., Bakker, D., 2000. Prevalence and regional distribution of paratuberculosis in dairy herds in The Netherlands. *Veterinary Microbiology*, 77(3-4), 253-261.
- 200 . Nancy, C. Buckley, M., 2008. *Mycobacterium avium paratuberculosis*: infrequent human pathogen or public health threat ? Rapport de l'Académie Américaine de Microbiologie (AAM). 37 p.
- 201 . Navarro, J.A., Bernabe, A., Gomez, M.A., Sanchez, J., Gomez, S., 1991. Mycobacterial antigen detection by immunohistochemistry in goat paratuberculosis. *Journal of Veterinary Medicine B*, 38(3), 231-237.
- 202 . Navarro, J.A., Ramis, G., Seva, J., Pallares, F.J., Sanchez, J., 1998. Changes in lymphocyte subsets in the intestine and mesenteric lymph nodes in caprine paratuberculosis. *Journal of Comparative Pathology*, 118(2), 109-121.
- 203 . Nebbia, P., Robino, P., Zoppi, S., De Meneghi, D., 2006. Detection and excretion pattern of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk of asymptomatic sheep and goats by nested-PCR. *Small Ruminant Research*, 66, 116-120.

- 204 . Nelli, R.K., Graham, E., Dunham, S.P., Taylor, D.J., 2008. Real-time PCR identification of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in ovine and bovine tissues. *Veterinary Record*, 163(14), 422-423.
- 205 . Nielsen, S.S., 2008. Transitions in diagnostic tests used for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections in cattle. *Veterinary Microbiology*, 132(3-4), 274-282.
- 206 . Nielsen, S.S., 2009. Use of diagnostics for risk-based control of paratuberculosis in dairy herds. *In Practice*, 31, 150-154.
- 207 . Nielsen, S.S. Toft, N., 2006. Age-specific characteristics of ELISA and fecal culture for purpose-specific testing for paratuberculosis. *Journal of Dairy Science*, 89(2), 569-579.
- 208 . Nielsen, S.S. Toft, N., 2008. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques. *Veterinary Microbiology*, 129(3-4), 217-235.
- 209 . Nielsen, S.S. Toft, N., 2009. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Preventive Veterinary Medicine*, 88(1), 1-14.
- 210 . Nielsen, S.S., Grohn, Y.T., Enevoldsen, C., 2002a. Variation of the milk antibody response to paratuberculosis in naturally infected dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 85(11), 2795-2802.
- 211 . Nielsen, S.S., Enevoldsen, C., Grohn, Y.T., 2002b. The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ELISA response by parity and stage of lactation. *Preventive Veterinary Medicine*, 54(1), 1-10.
- 212 . Nielsen, S.S., Bjerre, H., Toft, N., 2008. Colostrum and milk as risk factors for infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 91(12), 4610-4615.
- 213 . Nielsen, S.S., Thamsborg, S.M., Houe, H., Bitsch, V., 2000. Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 44(1-2), 1-7.
- 214 . Nielsen, S.S., Gronbaek, C., Agger, J.F., Houe, H., 2002c. Maximum-likelihood estimation of sensitivity and specificity of ELISAs and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis. *Preventive Veterinary Medicine*, 53(3), 191-204.
- 215 . Nordlund, K.V., Goodger, W.J., Pelletier, J., Collins, M.T., 1996. Associations between subclinical paratuberculosis and milk production, milk components, and somatic cell counts in dairy herds. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 208(11), 1872-1876.
- 216 . O.I.E., 2008, Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres (mammifères, oiseaux et abeilles). 6ème ed. 1467 p p.
- 217 . Olsen, I., Sigurgardottir, G., Djonne, B., 2002. Paratuberculosis with special reference to cattle. A review. *Veterinary Quarterly*, 24(1), 12-28.
- 218 . Ott, S.L., Wells, S.J., Wagner, B.A., 1999. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Preventive Veterinary Medicine*, 40(3-4), 179-192.
- 219 . Pachoud, D., 1991. Contribution à l'étude de la paratuberculose bovine. Action de la température et de la présure sur la survie de *Mycobacterium paratuberculosis* dans le colostrum. *Thèse vétérinaire*. Lyon, 91 p.
- 220 . Pavlik, I., Bejckova, L., Pavlas, M., Rozsypalova, Z., Koskova, S., 1995. Characterization by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization using IS900 of bovine, ovine, caprine and human dependent strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated in various localities. *Veterinary Microbiology*, 45(4), 311-318.

- 221 . Pavlik, I., Ayele, Y., Fisher, O., Matlova, L., Svastova, P., Bartos, M., Machackova, M., Alexa, M., Lamka, J., 2002. Role of the external environment, plants and non-vertebrates for the spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. in *Seventh International Colloquium on Paratuberculosis*. Bilbao, Spain.
- 222 . Payne, J.M. Rankin, J.D., 1961. The pathogenesis of experimental John's disease in calves. *Research in Veterinary Science*, 2, 167-174.
- 223 . Perez, V., Tellechea, J., Badiola, J.J., Gutierrez, M., Garcia Marin, J.F., 1997. Relation between serologic response and pathologic findings in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *American Journal of Veterinary Research*, 58(8), 799-803.
- 224 . Petit, H., 2006. La paratuberculose des petits ruminants: résultats d'une enquête GDS sur la paratuberculose. *Le Point Vétérinaire*, 263(mars), 46-50.
- 225 . Pfeiffer, D.U., 2004. The risk of transmission of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* via bovine semen. *EFSA Journal*, 110, 1-59.
- 226 . Pickup, R.W., Rhodes, G., Arnott, S., Sidi-Boumedine, K., Bull, T.J., Weightman, A., Hurley, M., Hermon-Taylor, J., 2005. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the catchment area and water of the River Taff in South Wales, United Kingdom, and its potential relationship to clustering of Crohn's disease cases in the city of Cardiff. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 2130-2139.
- 227 . Pillars, R.B., Grooms, D.L., Woltanski, J.A., Blair, E., 2009. Prevalence of Michigan dairy herds infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as determined by environmental sampling. *Preventive Veterinary Medicine*, 89, 191-196.
- 228 . Pinedo, P.J., Buergelt, C.D., Donovan, G.A., Melendez, P., Morel, L., Wu, R., Langae, T.Y., Rae, D.O., 2009. Association between CARD15/NOD2 gene polymorphisms and paratuberculosis infection in cattle. *Veterinary Microbiology*, 134(3-4), 346-352.
- 229 . Pithua, P., Godden, S.M., Wells, S.J., Oakes, M.J., 2009. Efficacy of feeding plasma-derived commercial colostrum replacer for the prevention of transmission of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in Holstein calves. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 234(9), 1167-1176.
- 230 . Pouillot, R., Gerbier, G., Gardner, I.A., 2002. "TAGS", a program for the evaluation of test accuracy in the absence of a gold standard. *Preventive Veterinary Medicine*, 53(1-2), 67-81.
- 231 . Poupard, P., Coene, M., Van Heuverswyn, H., Cocito, C., 1993. Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of John's disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(6), 1601-1605.
- 232 . Praet, N., Dorny, P., Saegerman, C., Marcotty, T., Berkvens, D., 2006. Estimation de la prévalence d'une maladie et des caractéristiques des tests diagnostiques par une approche bayésienne. *Epidémiologie et santé animale*, 49, 113-130.
- 233 . Pribylova, R., Kralik, P., Pavlik, I., 2009. Oligonucleotide microarray technology and its application to *Mycobacterium avium paratuberculosis* research: a review. *Molecular Biotechnology*, 42, 30-40.
- 234 . Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., 2000. Diseases caused by bacteria- IV. Paratuberculosis, in *Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*, W.B. Saunders Company Ltd, London. p. 920-934.
- 235 . Raizman, E.A., Wells, S.J., Godden, S.M., Fetrow, J., Friendshuh, K., Michael Oakes, J., 2006. Characterization of Minnesota dairy herds participating in a John's disease control program and evaluation of the program risk assessment tool. *Preventive Veterinary Medicine*, 75(1-2), 22-33.
- 236 . Raizman, E.A., Wells, S.J., Godden, S.M., Bey, R.F., Oakes, M.J., Bentley, D.C., Olsen, K.E., 2004. The distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in

- the environment surrounding Minnesota dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 87(9), 2959-2966.
- 237 . Rajukumar, K., Tripathi, B.N., Kurade, N.P., Parihar, N.S., 2001. An enzyme-linked immunosorbent assay using immonoaffinity-purified antigen in the diagnosis of caprine paratuberculosis and its comparison with conventional ELISAs. *Veterinary Research Communications*, 25(7), 539-553.
- 238 . Reddacliff, L.A., Vadali, A., Whittington, R.J., 2003. The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from tissues and faeces. *Veterinary Microbiology*, 95(4), 271-282.
- 239 . Reddacliff, L.A., Beh, K., McGregor, H., Whittington, R.J., 2005. A preliminary study of possible genetic influences on the susceptibility of sheep to Johne's disease. *Australian Veterinary Journal*, 83(7), 435-441.
- 240 . Reviriego, F.J., Moreno, M.A., Dominguez, L., 2000. Soil type as a putative risk factor of ovine and caprine paratuberculosis seropositivity in Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 43(1), 43-51.
- 241 . Ris, D.R., Hamel, K.L., Ayling, J.M., 1988. The detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces by isolation and the comparison of isolation with the examination of stained smears by light microscopy. *New Zeland Veterinary Journal*, 36(3), 112-114.
- 242 . Robbe-Austerman, S., Krull, A.C., Stabel, J.R., 2006a. Time delay, temperature effects and assessment of positive controls on whole blood for the gamma interferon ELISA to detect paratuberculosis. *Journal of Veterinary Medicine B*, 53(5), 213-217.
- 243 . Robbe-Austerman, S., Gardner, I.A., Thomsen, B.V., Morrical, D.G., Martin, B.M., Palmer, M.V., Thoen, C.O., Ewing, C., 2006b. Sensitivity and specificity of the agar-gel-immunodiffusion test, ELISA and the skin test for detection of paratuberculosis in United States Midwest sheep populations. *Veterinary Research*, 37(4), 553-564.
- 244 . Rogan, W.J. Gladen, B., 1978. Estimating prevalence from the results of a screening test. *American Journal of Epidemiology*, 107(1), 71-76.
- 245 . Rosseels, V. Huygen, K., 2008. Vaccination against paratuberculosis. *Expert Review Vaccines*, 7(6), 817-832.
- 246 . Rossiter, C.A. Burhans, W.S., 1996. Farm-specific approach to paratuberculosis (Johne's disease) control. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 12(2), 383-415.
- 247 . Roupie, V., Leroy, B., Rosseels, V., Piersoel, V., Noel-Georis, I., Romano, M., Govaerts, M., Letesson, J.J., Wattiez, R., Huygen, K., 2008. Immunogenicity and protective efficacy of DNA vaccines encoding MAP0586c and MAP4308c of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* secretome. *Vaccine*, 26(37), 4783-4794.
- 248 . Salgado, M., Manning, E.J., Collins, M.T., 2005. Performance of a Johne's disease enzyme-linked immunosorbent assay adapted for milk samples from goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(4), 350-354.
- 249 . Salgado, M., Kruze, J., Collins, M.T., 2007. Diagnosis of paratuberculosis by fecal culture and ELISA on milk and serum samples in two types of Chilean dairy goat herds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(1), 99-102.
- 250 . Santema, W., Hensen, S., Rutten, V., Koets, A., 2009. Heat shock protein 70 subunit vaccination against bovine paratuberculosis does not interfere with current immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Vaccine*, 27(17), 2312-2319.
- 251 . Saxegaard, F. Fodstad, F.H., 1985. Control of paratuberculosis (Johne's disease) in goats by vaccination. *Veterinary Record*, 116(16), 439-441.

- 252 . Schonenbrucher, H., Abdulmawjood, A., Failing, K., Bulte, M., 2008. New triplex real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(9), 2751-2758.
- 253 . Secott, T.E., Lin, T.L., Wu, C.C., 2001. Fibronectin attachment protein homologue mediates fibronectin binding by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infection and Immunity*, 69(4), 2075-2082.
- 254 . Sergeant, E.S., Whittington, R.J., More, S.J., 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(3-4), 199-211.
- 255 . Sevilla, I., Garrido, J.M., Geijo, M., Juste, R.A., 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.
- 256 . Sevilla, I., Singh, S.V., Garrido, J.M., Aduriz, G., Rodriguez, S., Geijo, M.V., Whittington, R.J., Saunders, V., Whitlock, R.H., Juste, R.A., 2005. Molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains from different hosts and regions. *Revue Scientifique et Technique de l'O.I.E.*, 24(3), 1061-1066.
- 257 . Sherman, D.M., Markham, R.J., Bates, F., 1984. Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 185(2), 179-182.
- 258 . Shin, S.J., Cho, D., Collins, M.T., 2008. Diagnosis of bovine paratuberculosis by a novel enzyme-linked immunosorbent assay based on early secreted antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(8), 1277-1281.
- 259 . Shin, S.J., Yoo, H.S., McDonough, S.P., Chang, Y.F., 2004. Comparative antibody response of five recombinant antigens in related to bacterial shedding levels and development of serological diagnosis based on 35 kDa antigen for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of Veterinary Science*, 5(2), 111-117.
- 260 . Shin, S.J., Anklam, K., Manning, E.J., Collins, M.T., 2009. Rapid mycobacterial liquid culture-screening method for *Mycobacterium avium* complex based on secreted antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(5), 613-620.
- 261 . Sigurdardottir, O.G., Press, C.M., Evensen, O., 2001. Uptake of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* through the distal small intestinal mucosa in goats: an ultrastructural study. *Veterinary Pathology*, 38(2), 184-189.
- 262 . Sigurdardottir, O.G., Press, C.M., Saxegaard, F., Evensen, O., 1999. Bacterial isolation, immunological response, and histopathological lesions during the early subclinical phase of experimental infection of goat kids with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Pathology*, 36(6), 542-550.
- 263 . Sigurdardottir, O.G., Bakke-McKellep, A.M., Djonje, B., Evensen, O., 2005. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* enters the small intestinal mucosa of goat kids in areas with and without Peyer's patches as demonstrated with the everted sleeve method. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 28(3), 223-230.
- 264 . Sigurdsson, B., 1960. A killed vaccine against paratuberculosis (Johne's disease) in sheep. *American Journal of Veterinary Research*, 21, 54-67.
- 265 . Singh, P.K., Singh, S.V., Singh, A.V., Sohal, J.S., 2008. Evaluation of four methods of DNA recovery from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* present in intestine tissue of goats and comparative sensitivity of IS900 PCR with respect to culture for diagnosis of Johne's disease. *Indian Journal of Experimental Biology*, 46, 579-582.

- 266 . Singh, S.V. Vihan, V.S., 2004. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in goat milk. *Small Ruminant Research*, 54, 231-235.
- 267 . Singh, S.V., Singh, A.V., Singh, P.K., Gupta, V.K., Kumar, S., Vohra, J., 2007a. Seroprevalence of paratuberculosis in young kids using "Bison type", *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antigen in plate ELISA. *Small Ruminant Research*, 70, 89-92.
- 268 . Singh, S.V., Singh, P.K., Singh, A.V., Sohal, J.S., Gupta, V.K., Vihan, V.S., 2007b. Comparative efficacy of an indigenous 'inactivated vaccine' using highly pathogenic field strain of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* 'Bison type' with a commercial vaccine for the control of Capri-paratuberculosis in India. *Vaccine*, 25(41), 7102-7110.
- 269 . Singh, S.V., Singh, A.V., Singh, R., Sandhu, K.S., Singh, P.K., Sohal, J.S., Gupta, V.K., Vihan, V.S., 2007c. Evaluation of highly sensitive indigenous milk ELISA kit with fecal culture, milk culture and fecal-PCR for the diagnosis of bovine Johne's disease (BJD) in India. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 30(3), 175-186.
- 270 . Slana, I., Kralik, P., Kralova, A., Pavlik, I., 2008a. On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2), 250-257.
- 271 . Slana, I., Paolicchi, F., Janstova, B., Navratilova, P., Pavlik, I., 2008b. Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and milk products: a review. *Veterinarni Medicina*, 53(6), 283-306.
- 272 . Slana, I., Liapi, M., Moravkova, M., Kralova, A., Pavlik, I., 2009. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cow bulk tank milk in Cyprus detected by culture and quantitative IS900 and F57 real-time PCR. *Preventive Veterinary Medicine*, 89, 223-226.
- 273 . Sohal, J.S., Singh, S.V., Tyagi, P., Subhodh, S., Singh, P.K., Singh, A.V., Narayanasamy, K., Sheoran, N., Singh Sandhu, K., 2008. Immunology of mycobacterial infections: with special reference to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Immunobiology*, 213(7), 585-598.
- 274 . Spangler, E., Bech-Nielsen, S., Heider, L.E., 1992. Diagnostic performance of two serologic tests and fecal culture for subclinical paratuberculosis, and associations with production. *Preventive Veterinary Medicine*, 13, 185-195.
- 275 . Spangler, E., Heider, L.E., Bech-Nielsen, S., Dorn, C.R., 1991. Serologic enzyme-linked immunosorbent assay responses of calves vaccinated with a killed *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine. *American Journal of Veterinary Research*, 52(8), 1197-1200.
- 276 . Spiegelhalter, D., Thomas, A., Best, N., Gilks, W. 1996 BUGS : Bayesian inference Using Gibbs Sampling, version 0.50.
- 277 . Springer, B., Stockman, L., Teschner, K., Roberts, G.D., Bottger, E.C., 1996. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(2), 296-303.
- 278 . Stabel, J.R., 2000a. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology*, 77(3-4), 465-473.
- 279 . Stabel, J.R., 2000b. Cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells from cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research*, 61(7), 754-760.
- 280 . Stabel, J.R., 2007. Host responses to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: a complex arsenal. *Animal Health research Reviews*, 7(1-2), 61-70.

- 281 . Stabel, J.R., 2008. Pasteurization of colostrum reduces the incidence of paratuberculosis in neonatal dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 91(9), 3600-3606.
- 282 . Stehman, S.M., 1996. Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 12(2), 441-455.
- 283 . Stehman, S.M., 2000. Advances in identifying and controlling paratuberculosis. in *7th International Conference on Goats*. Tours, France.
- 284 . Stevenson, K. Sharp, J.M., 1997. The contribution of molecular biology to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* research. *Veterinary Journal*, 153(3), 269-286.
- 285 . Stewart, D.J., Vaughan, J.A., Stiles, P.L., Noske, P.J., Tizard, M.L., Prowse, S.J., Michalski, W.P., Butler, K.L., Jones, S.L., 2006. A long-term study in Angora goats experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: clinical disease, faecal culture and immunological studies. *Veterinary Microbiology*, 113(1-2), 13-24.
- 286 . Storset, A.K., Berg, I., Djonne, B., 2005. Evaluation of the gamma interferon test for diagnosis of paratuberculosis in goats. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 107(1-2), 87-94.
- 287 . Storset, A.K., Hasvold, H.J., Valheim, M., Brun-Hansen, H., Berntsen, G., Whist, S.K., Djonne, B., Press, C.M., Holstad, G., Larsen, H.J., 2001. Subclinical paratuberculosis in goats following experimental infection. An immunological and microbiological study. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 80(3-4), 271-287.
- 288 . Stratmann, J., Strommenger, B., Stevenson, K., Gerlach, G.F., 2002. Development of a peptide-mediated capture PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(11), 4244-4250.
- 289 . Straube, E.F. McGregor, B.A., 1982. Johne's disease in a goat. *Australian Veterinary Journal*, 59(2), 62.
- 290 . Streeter, R.N., Hoffsis, G.F., Bech-Nielsen, S., Shulaw, W.P., Rings, D.M., 1995. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *American Journal of Veterinary Research*, 56(10), 1322-1324.
- 291 . Sung, N. Collins, M.T., 1998. Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(3), 999-1005.
- 292 . Sweeney, R.W., 1996. Transmission of paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 12(2), 305-312.
- 293 . Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Rosenberger, A.E., 1992a. *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(1), 166-171.
- 294 . Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Rosenberger, A.E., 1992b. *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. *American Journal of Veterinary Research*, 53(4), 477-480.
- 295 . Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Hamir, A.N., Rosenberger, A.E., Herr, S.A., 1992c. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* after oral inoculation in uninfected cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 53(8), 1312-1314.
- 296 . Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Buckley, C.L., Spencer, P., Rosenberger, A.E., Hutchinson, L.J., 1994. Diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle, using enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *American Journal of Veterinary Research*, 55(7), 905-909.
- 297 . Tanaka, S., Sato, M., Onitsuka, T., Kamata, H., Yokomizo, Y., 2005. Inflammatory cytokine gene expression in different types of granulomatous lesions during

- asymptomatic stages of bovine paratuberculosis. *Veterinary Pathology*, 42(5), 579-588.
- 298 . Tasara, T. Stephan, R., 2005. Development of an F57 sequence-based real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 5957-5968.
- 299 . Tavoranpanich, S., Gardner, I.A., Carpenter, T.E., Johnson, W.O., Anderson, R.J., 2006. Evaluation of cost-effectiveness of targeted sampling methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* infection in dairy herds. *American Journal of Veterinary Research*, 67(5), 821-828.
- 300 . Tavoranpanich, S., Gardner, I.A., Anderson, R.J., Shin, S., Whitlock, R.H., Fyock, T., Adaska, J.M., Walker, R.L., Hietala, S.K., 2004. Evaluation of microbial culture of pooled fecal samples for detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in large dairy herds. *American Journal of Veterinary Research*, 65(8), 1061-1070.
- 301 . Thomas, G.W., 1983. Paratuberculosis in a large goat herd. *Veterinary Record*, 113(20), 464-466.
- 302 . Thorel, M.F. Valette, L., 1979. Etude de *Mycobacterium paratuberculosis* d'origine caprine et comparaison avec *M. paratuberculosis* d'origine ovine et bovine. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 130, 1623-1633.
- 303 . Thorel, M.F. Delcroix, T., 2002. La vaccination contre la paratuberculose dans le monde. *Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires*, Hors-série Paratuberculose des ruminants, 91-94.
- 304 . Thorel, M.F., Krichevsky, M., Levy-Frebault, V.V., 1990. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40(3), 254-260.
- 305 . Thorel, M.F., Vialard, J., Manfroni, F., Bernardot, J., Ostyn, A., Vandeveld, J., 1992. Paratuberculose expérimentale chez le mouton après inoculation par voie veineuse ou par voie orale: pouvoir pathogène et diagnostic biologique. *Annales de la Recherche Vétérinaire*, 23(2), 105-115.
- 306 . Thoresen, O.F., Falk, K., Evensen, O., 1994. Comparison of immunohistochemistry, acid-fast staining, and cultivation for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 6(2), 195-199.
- 307 . Thrusfield, M., 2005, *Veterinary epidemiology*. Third edition: Blackwell Science Ltd, Oxford, UK. 610 p.
- 308 . Thrusfield, M., Ortega, C., de Blas, I., Noordhuizen, J.P., Frankena, K., 2001. WINEPISCOPE 2.0 improved epidemiological software for veterinary medicine. *Veterinary Record*, 148, 567-572.
- 309 . Toft, N. Nielsen, S., Guidelines for establishing the prevalence of paratuberculosis (communication personnelle). 2009.
- 310 . Toft, N., Jorgensen, E., Hojsgaard, S., 2005. Diagnosing diagnostic tests: evaluating the assumptions underlying the estimation of sensitivity and specificity in the absence of a gold standard. *Preventive Veterinary Medicine*, 68(1), 19-33.
- 311 . Toma, B., Dufour, B., Sanaa, M., Bénet, J.J., Shaw, A., Moutou, F., Louza, A., 2001, *Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures - 2ème édition*. Maisons-Alfort: AEEMA. 696 p.
- 312 . Tripathi, B.N., Periasamy, S., Paliwal, O.P., Singh, N., 2006. Comparison of IS900 tissue PCR, bacterial culture, johnin and serological tests for diagnosis of naturally occurring paratuberculosis in goats. *Veterinary Microbiology*, 116(1-3), 129-137.

- 313 . Vacek, P.M., 1985. The effect of conditional dependence on the evaluation of diagnostic tests. *Biometrics*, 41(4), 959-968.
- 314 . Valheim, M., Storset, A.K., Aleksersen, M., Brun-Hansen, H., 2002a. Lesions in subclinical paratuberculosis of goats are associated with persistent gut-associated lymphoid tissue. *Journal of Comparative Pathology*, 127(2-3), 194-202.
- 315 . Valheim, M., Hasvold, H.J., Storset, A.K., Larsen, H.J., Press, C.M., 2002b. Localisation of CD25+ cells and MHCII+ cells in lymph nodes draining *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* vaccination granuloma and the presence of a systemic immune response. *Research in Veterinary Science*, 73(1), 77-85.
- 316 . van Roermund, H.J., Bakker, D., Willemsen, P.T., de Jong, M.C., 2007. Horizontal transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in an experimental setting: calves can transmit the infection to other calves. *Veterinary Microbiology*, 122(3-4), 270-279.
- 317 . van Schaik, G., Pradenas, F.M., Mella, N.A., Kruze, V.J., 2007a. Diagnostic validity and costs of pooled fecal samples and individual blood or fecal samples to determine the cow- and herd-status for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Preventive Veterinary Medicine*, 82(1-2), 159-165.
- 318 . van Schaik, G., Haro, F., Mella, A., Kruze, J., 2007b. Bayesian analysis to validate a commercial ELISA to detect paratuberculosis in dairy herds of southern Chile. *Preventive Veterinary Medicine*, 79(1), 59-69.
- 319 . Vannuffel, P., Gilot, P., Limbourg, B., Naerhuyzen, B., Dieterich, C., Coene, M., Machtelinckx, L., Cocito, C., 1994. Development of species-specific enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease in cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(5), 1211-1216.
- 320 . Vansnick, E., De Rijk, P., Vercammen, F., Geysen, D., Rigouts, L., Portaels, F., 2004. Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology*, 100(3-4), 197-204.
- 321 . Vargas, R., Marassi, C.D., Oelemann, W., Lilenbaum, W., 2009. Interference of intradermal tuberculin tests on the serodiagnosis of paratuberculosis in cattle. *Research in Veterinary Science*, 86(3), 371-372.
- 322 . Vialard, J., 2000. La paratuberculose caprine. *Point vétérinaire*, 31(206), 133-138.
- 323 . Vialard, J., 2002. Epidémiologie de la paratuberculose. *Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires*, Hors série paratuberculose des ruminants, 6-11.
- 324 . Waddell, L.A., Rajic, A., Sargeant, J., Harris, J., Amezcua, R., Downey, L., Read, S., McEwen, S.A., 2008. The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*: a systematic review. *Canadian Journal of Public Health*, 99(2), 145-155.
- 325 . Waters, W.R., Stabel, J.R., Sacco, R.E., Harp, J.A., Pesch, B.A., Wannemuehler, M.J., 1999. Antigen-specific B-cell unresponsiveness induced by chronic *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of cattle. *Infection and Immunity*, 67(4), 1593-1598.
- 326 . Weber, M.F., Nielen, M., Velthuis, A.G., van Roermund, H.J., 2008. Milk quality assurance for paratuberculosis: simulation of within-herd infection dynamics and economics. *Veterinary Research*, 39(2), 12.
- 327 . Wells, S.J., Hartmann, W.L., Anderson, P.L., 2008. Evaluation of progress made by dairy and beef herds enrolled in the Minnesota Johne's Disease Control Program. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 233(12), 1920-1926.

- 328 . Wells, S.J., Whitlock, R.H., Lindeman, C.J., Fyock, T., 2002. Evaluation of bacteriologic culture of pooled fecal samples for detection of *Mycobacterium paratuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research*, 63(8), 1207-1211.
- 329 . Wells, S.J., Godden, S.M., Lindeman, C.J., Collins, J.E., 2003. Evaluation of bacteriologic culture of individual and pooled fecal samples for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in dairy cattle herds. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 223(7), 1022-1025.
- 330 . Whan, L.B., Grant, I.R., Ball, H.J., Scott, R., Rowe, M.T., 2001. Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. *Letters in Applied Microbiology*, 33(3), 227-231.
- 331 . Whitlock, R.H. Buergelt, C., 1996. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 12(2), 345-356.
- 332 . Whitlock, R.H., Wells, S.J., Sweeney, R.W., Van Tiem, J., 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Veterinary Microbiology*, 77(3-4), 387-398.
- 333 . Whittington, R.J. Sergeant, E.S., 2001. Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in animal populations. *Australian Veterinary Journal*, 79(4), 267-278.
- 334 . Whittington, R.J. Windsor, P.A., 2009. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. *Veterinary Journal*, 179(1), 60-69.
- 335 . Whittington, R.J., Eamens, G.J., Cousins, D.V., 2003a. Specificity of absorbed ELISA and agar gel immuno-diffusion tests for paratuberculosis in goats with observations about use of these tests in infected goats. *Australian Veterinary Journal*, 81(1-2), 71-75.
- 336 . Whittington, R.J., Marsh, I., McAllister, S., Turner, M.J., Marshall, D.J., Fraser, C.A., 1999. Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(4), 1077-1083.
- 337 . Whittington, R.J., Taragel, C.A., Ottaway, S., Marsh, I., Seaman, J., Fridriksdottir, V., 2001. Molecular epidemiological confirmation and circumstances of occurrence of sheep (S) strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cases of paratuberculosis in cattle in Australia and sheep and cattle in Iceland. *Veterinary Microbiology*, 79(4), 311-322.
- 338 . Whittington, R.J., Marsh, I.B., Taylor, P.J., Marshall, D.J., Taragel, C., Reddacliff, L.A., 2003b. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* from environmental samples collected from farms before and after destocking sheep with paratuberculosis. *Australian Veterinary Journal*, 81(9), 559-563.
- 339 . Whittington, R.J., Marsh, I., Turner, M.J., McAllister, S., Choy, E., Eamens, G.J., Marshall, D.J., Ottaway, S., 1998. Rapid detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in clinical samples from ruminants and in spiked environmental samples by modified BACTEC 12B radiometric culture and direct confirmation by IS900 PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(3), 701-707.
- 340 . Whittington, R.J., Fell, S., Walker, D., McAllister, S., Marsh, I., Sergeant, E., Taragel, C.A., Marshall, D.J., Links, I.J., 2000. Use of pooled fecal culture for sensitive and economic detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in flocks of sheep. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7), 2550-2556.

- 341 . Willemsen, P.T., Westerveen, J., Dinkla, A., Bakker, D., van Zijderveld, F.G., Thole, J.E., 2006. Secreted antigens of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as prominent immune targets. *Veterinary Microbiology*, 114(3-4), 337-344.
- 342 . Wilson, D.J., Rossiter, C., Han, H.R., Sears, P.M., 1993. Association of *Mycobacterium paratuberculosis* infection with reduced mastitis, but with decreased milk production and increased cull rate in clinically normal dairy cows. *American Journal of Veterinary Research*, 54(11), 1851-1857.
- 343 . Windsor, P.A. Whittington, R.J., 2010. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Veterinary Journal*, 184(1), 37-44.
- 344 . Wintz, E., 2006. Étude comparative de différentes méthodes de diagnostic de la paratuberculose caprine. *Thèse vétérinaire*. Maisons-Alfort, 136 p.
- 345 . Woo, S.R. Czuprynski, C.J., 2008. Tactics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* for intracellular survival in mononuclear phagocytes. *Journal of Veterinary Science*, 9(1), 1-8.
- 346 . Woo, S.R., Sotos, J., Hart, A.P., Barletta, R.G., Czuprynski, C.J., 2006. Bovine monocytes and a macrophage cell line differ in their ability to phagocytose and support the intracellular survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 110(1-2), 109-120.
- 347 . Wu, C.w., Schmoller, S.K., Bannantine, J.P., Eckstein, T.M., Inamine, J.M., Livesey, M., Albrecht, R., Talaat, A.M., 2009. A novel cell wall lipopeptide is important for biofilm formation and pathogenicity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Microbial Pathogenesis*, 46(4), 222-230.
- 348 . Yokomizo, Y., Yugi, H., Merkal, R.S., 1985. A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Nippon Juigaku Zasshi*, 47(1), 111-119.
- 349 . Zimmer, K., Drager, K.G., Klawonn, W., Hess, R.G., 1999. Contribution to the diagnosis of Johne's disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl-Neelsen staining, faecal culture and a commercially available DNA-Probe test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in faeces from cattle. *Journal of Veterinary Medicine B*, 46(2), 137-140.

## **Annexes**

Annexe1 :

Mercier P, Baudry C, Martin J, Bertin C, Laroucau K, Beaudeau F, Seegers H, Malher X.  
Utilisation des techniques bayésiennes pour estimer les caractéristiques de deux tests de  
diagnostic de la paratuberculose caprine. *Epidémiologie et santé animale*, 2007, 51, 57-64

## UTILISATION DES TECHNIQUES BAYESIENNES POUR ESTIMER LES CARACTERISTIQUES DE DEUX TESTS DE DIAGNOSTIC DE LA PARATUBERCULOSE CAPRINE \*

**Pascale Mercier<sup>1</sup>, Christian Baudry<sup>1</sup>, Jennifer Martin<sup>1</sup>,  
Claire Bertin<sup>2</sup>, Karine Laroucau<sup>2</sup>, François Beaudeau<sup>3</sup>,  
Henri Seegers<sup>3</sup> et Xavier Malher<sup>3</sup>**

**RESUME :** En l'absence de test parfait, la sensibilité (Se) et la spécificité (Sp) d'un test de diagnostic peuvent être estimées par des modèles probabilistes. Afin d'estimer les caractéristiques (Se et Sp) d'un test sérologique (ELISA) et de la culture fécale (FC) pour détecter l'infection par *Mycobacterium avium paratuberculosis* (Map), deux méthodes ont été mises en œuvre : la méthode du maximum de vraisemblance et l'inférence bayésienne.

Des échantillons de sang et de fèces ont été prélevés sur 532 chèvres appartenant à 15 troupeaux. Les résultats des deux modèles sont comparés et discutés. Le modèle bayésien avec « priors » informatifs permet d'obtenir les meilleures estimations. La Se et la Sp de l'ELISA ont été estimées respectivement à 34% et 99%, tandis que les valeurs pour la culture fécale ont été estimées à 53% et 100%.

**Mots-clés :** Paratuberculose, caprin, sensibilité, spécificité, méthodes bayésiennes.

**SUMMARY:** Two latent class models [maximum likelihood (ML) methods and Bayesian inference (BI)] were used to estimate the sensitivity (Se) and the specificity (Sp) of a serum ELISA and a faecal culture for the detection of infection with Map in French dairy goats. Samples of blood and faeces were collected in 532 goats from 15 herds.

Estimates according to ML and BI methods were compared. The better estimations of the accuracy of the 2 tests are obtained by the BI (WinBUGS) model with informative priors. The Se and Sp of the ELISA were estimated to be 34% and 99% respectively. For faecal culture, the Se was 53% and the Sp was 100%.

**Keywords :** Paratuberculosis, goat, sensibility, specificity, bayesian estimations.



\* Texte de la communication orale présentée lors de la Journée AEEMA, 1er juin 2007

<sup>1</sup> Afssa Niort – Laboratoire d'études et de recherches caprines, France

<sup>2</sup> Afssa Laboratoire d'études et de recherches en pathologie animale et zoonoses, Maisons-Alfort, France

<sup>3</sup> UMR708 Gestion de la santé animale INRA ENVN, Ecole nationale vétérinaire, Nantes, France

---

## I - INTRODUCTION

---

Pour conduire des études épidémiologiques ou évaluer des plans de contrôle, il est important de disposer de tests de diagnostic de caractéristiques (sensibilité et spécificité) connues. La sensibilité et la spécificité d'un test sont déterminées par comparaison avec un test de référence (ou « gold standard ») qui détermine sans ambiguïté le statut sanitaire des animaux. Mais, pour de nombreuses maladies, et en particulier la paratuberculose, il n'existe pas de test de référence parfait. Dès lors, des approches alternatives doivent être utilisées pour estimer les performances du test en l'absence de gold standard. L'objectif de ce travail est de décrire deux de ces approches pour définir les caractéristiques (sensibilité et spécificité) de deux tests de diagnostic de

l'infection à *Mycobacterium avium paratuberculosis* chez la chèvre.

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) est l'agent de la paratuberculose qui se traduit cliniquement chez les caprins par un amaigrissement progressif des animaux de plus de 2 ans. On considère que la principale modalité de contamination est l'ingestion de bactéries pendant les premières semaines de vie. Il existe donc une période assez longue pendant laquelle l'infection est asymptomatique. Cependant, il est important d'un point de vue épidémiologique, de pouvoir diagnostiquer précocement les animaux infectés par Map. Il s'agit donc d'évaluer des tests permettant de réaliser le diagnostic de l'infection par Map.

---

## II - MATERIEL ET METHODES

---

### 1. ANIMAUX ET PRELEVEMENTS

Des prélèvements de sang et de fèces ont été effectués sur 600 chèvres issues de 15 troupeaux de la Région Poitou-Charentes. Deux populations ont été identifiées : une population de troupeaux caprins avec des signes cliniques évocateurs de la paratuberculose et une population de troupeaux caprins sans signes cliniques. Dans chaque population, un échantillonnage a été réalisé dans respectivement neuf et six troupeaux. Dans chaque troupeau, des prélèvements ont été effectués sur 40 animaux sans signes cliniques et appartenant à différentes classes d'âge.

### 2. TESTS DE DIAGNOSTIC

Deux tests de diagnostic ont été mis en oeuvre : un test direct, reposant sur la mise en évidence de la bactérie (culture fécale) et un test indirect, reposant sur la mise en évidence des anticorps avec un test ELISA commercial (Institut Pourquier, Montpellier).

La culture fécale a été réalisée selon la norme en vigueur (NF U47-103). Les analyses sérologiques ont été effectuées conformément aux indications du producteur (test bicupule) : le seuil de positivité a été fixé à 60%.

### 3. L'APPROCHE BAYESIENNE

Il s'agit d'une approche probabiliste. Le statut des animaux vis-à-vis de l'infection paratuberculeuse est considéré comme « latent » c'est-à-dire qu'il existe (infecté ou non-infecté) mais qu'il ne peut pas être déterminé [Enøe *et al.*, 2000].

L'utilisation de cette approche repose sur le paradigme de Hui et Walter. Trois conditions doivent être vérifiées :

- les deux populations ont des prévalences différentes,
- les deux tests sont indépendants,
- les caractéristiques des tests (sensibilité et spécificité) sont identiques dans les deux populations.

Le calcul des différentes probabilités est lourd et le développement des méthodes bayésiennes a été rendu possible par la mise au point de logiciels de calcul en libre accès.

### 4. LOGICIELS

Les modèles « latent class » peuvent être séparés en deux approches :

- une approche fréquentielle : estimation du maximum de vraisemblance (Maximum Likelihood ou ML),
- une approche bayésienne qui permet d'estimer le paramètre recherché à partir des données récoltées sur le terrain et des informations d'experts [Enøe *et al.*, 2000].

Deux logiciels correspondant à chacune des deux approches ont été utilisés.

#### 4.1. LE LOGICIEL TAGS (TESTS IN ABSENCE OF A GOLD STANDARD)

Il s'agit d'un logiciel développé par Pouillot *et al.* sous R ([www.afssa.fr/interne/tags.htm](http://www.afssa.fr/interne/tags.htm)) et qui permet d'estimer le maximum de vraisemblance. Ce modèle peut produire les valeurs les plus probables des paramètres qui auraient mené aux données observées. Le paramètre estimé est obtenu en maximisant la vraisemblance par des algorithmes. Deux algorithmes sont utilisés successivement : l'algorithme de Newton-Raphson (NR) et l'algorithme EM (Expectation-Maximisation).

#### 4.2. LE LOGICIEL WINBUGS

Il s'agit d'un logiciel développé par Spiegelhalter *et al.*, pour faciliter l'utilisation de l'approche bayésienne (<http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/bugs/winbugs/contents.shtml>). BUGS correspond à « Bayesian inference Using Gibbs Sampling ». Ce logiciel utilise la méthode de l'échantillonneur de Gibbs (Gibbs sampling) avec des algorithmes Monte Carlo par Chaîne de Markov (MCMC). Cet algorithme (MCMC) est un algorithme d'échantillonnage à partir d'une distribution de probabilités afin de construire une ou plusieurs chaînes d'itérations, celles-ci étant le résultat de chaque étape de la simulation. WinBUGS amorce une valeur arbitraire pour chaque chaîne et simule les différents paramètres à partir de cette valeur. Ceux-ci sont alors utilisés dans l'itération suivante comme valeur de départ [Praet *et al.*, 2006]. Si on réalise un grand nombre d'itérations, alors on pourra avoir une bonne estimation de la loi *a posteriori* [Enøe *et al.*, 2000].

Dans cette approche, les paramètres à évaluer sont des variables aléatoires dont il faut préciser la distribution. L'estimation de la valeur est la probabilité *a posteriori* (ou « Posterior »), qui est déterminée à partir d'informations fournies par des experts (ou « Priors ») et les données récoltées sur le terrain (vraisemblance) [Branscum *et al.*, 2005].

Les informations *a priori* sont considérées comme des variables binomiales dont la distribution suit une loi béta de paramètres  $a$  et  $b$ , dans l'intervalle  $[0,1]$  et notée  $Be(a,b)$  [Johnson *et al.*, 2001]. Pour construire les lois béta (logiciel betabuster : <http://www.epi.ucdavis.edu/diagnostictests/betabuster.html>), les experts doivent fournir pour chaque paramètre la valeur la plus probable (ou la meilleure estimation) et une valeur limite [Enøe *et al.*, 2000].

#### 4.3. LES DIFFERENTS « PRIORS »

Les « priors » ont été définis à partir des données bibliographiques pour la sensibilité et la spécificité des deux tests et à partir de l'expérience des auteurs pour les prévalences.

Quatre modèles correspondant à différents *a priori* ont été testés (tableau 1). Le modèle II est un adaptation du modèle I dans laquelle la sensibilité du test ELISA a été modifiée pour tenir compte d'une étude réalisée sur des caprins et utilisant le même test ELISA [Gumber *et al.*, 2006]. Le modèle III reprend les « priors » utilisés par Kostoulas *et al.*. Ils ont considéré que les spécificités des deux tests étaient proches de 100% mais qu'ils ne disposaient pas d'informations concernant les sensibilités. Les lois  $Be(1,1)$  correspondant à une distribution uniforme du « prior » ont donc été utilisées. Pour les prévalences, les lois  $Be(0,1/0,9)$  et  $(0,9/0,1)$  sont utilisées [Enøe *et al.*, 2000]. On parle alors de modèle non informatif (NI).

Le logiciel WinBUGS permet de calculer, pour chaque modèle, la valeur médiane de la distribution et de déterminer un intervalle de probabilité à 95% (2,5 et 97,5 percentiles) [Branscum *et al.*, 2005].

Tableau 1

**Paramètres a et b des différentes lois béta (Be (a/b)) utilisées comme valeurs  
a priori dans les quatre modèles**

Paramètres	I	II	III	IV (NI)
Se <sub>FC</sub>	Be (207,6/420,5) a	Be (207,6/420,5)	Be (1/1)	Be (1/1)
Sp <sub>FC</sub>	Be (298,1/1) a	Be (298,1/1)	Be (100/2) e	Be (1/1)
Se <sub>ELISA</sub>	Be (7,4/7,9) a,b	Be (12,44/4,2) d	Be (1/1)	Be (1/1)
Sp <sub>ELISA</sub>	Be (58,7/1,4) b,c	Be (58,7/1,4)	Be (100/5,5) e	Be (1/1)
p <sub>1</sub>	Be (6,2/99,7)	Be (6,2/99,7)	Be (6,2/99,7)	Be (0,1/0,9)
p <sub>2</sub>	Be (14,5/77,7)	Be (14,5/77,7)	Be (14,5/77,7)	Be (0,9/0,1)

a : Whitlock *et al.*, 2000 ; b : Robbe-Austerman *et al.*, 2006 ; c : Wintz, 2006 ;

d : Gumber *et al.*, 2006 ; e : Kostoulas *et al.*, 2006

### III – RESULTATS

#### 1. RESULTATS DES TESTS

Sur les prélèvements des 600 chèvres, les résultats de l'ELISA et de la culture fécale ont été obtenus pour 532 animaux (tableau 2).

#### 2. METHODE FREQUENTIELLE

L'application du logiciel TAGS aux données récoltées permet d'estimer la sensibilité et la spécificité des deux tests, ainsi que la prévalence dans les deux populations (tableau 3).

Pour la culture fécale, la sensibilité et la spécificité ont été estimées à respectivement 52 et 99%, alors que pour le test ELISA, la sensibilité et la spécificité ont été estimées à 51 et 100%. Les prévalences dans les deux populations ont également été estimées à 2% pour la population 1 (faible prévalence) et 24% pour la population 2 (forte prévalence).

L'intervalle de confiance à 95% n'a pu être défini pour la spécificité de l'ELISA, en raison de la taille de l'échantillon.

Tableau 2

**Résultats de la culture fécale et du test ELISA dans les deux sous-populations**

Sous-population 1				Sous-population 2				
		Culture fécale (FC)			Culture fécale (FC)			
		+	-		Total	+		-
ELISA	+	2	1	3	+	13	13	26
	-	6	311	317	-	15	171	186
Total		8	312	320	Total	28	184	212

Tableau 3

**Estimations des différents paramètres à partir du logiciel TAGS (IC à 95%)  
en pourcentages**

PARAMETRES	ML* (IC à 95%)
Sensibilité de la culture fécale	52 (34-69)
Spécificité de la culture fécale	99 (95-100)
Sensibilité de l'ELISA	51 (21-72)
Spécificité de l'ELISA	100 (ND-100)
Prévalence dans la population 1	2 (0,5-6)
Prévalence dans la population 2	24 (16-34)

\* ML : Maximum Likelihood : maximum de vraisemblance

### 3. METHODE BAYESIENNE

L'estimation du paramètre est obtenue à partir de la moyenne, de la médiane ou du mode de la distribution du « posterior » [Branscum *et al.*, 2005]. En fonction du choix des « priors » différentes estimations sont obtenues pour la sensibilité et la spécificité des deux tests ainsi que pour la prévalence dans les deux populations (tableau 4). Les différents modèles ont permis de mettre en évidence l'influence du choix des « priors » sur les estimations des différents paramètres (« posteriors »).

Les prévalences estimées sont de l'ordre de 3% pour la population 1 et de 20% pour la population 2. Les estimations de la spécificité

des deux tests sont comparables, quel que soit le modèle, et sont proches de 100%.

En revanche, les estimations de la sensibilité varient selon le modèle utilisé. Ainsi, l'estimation de la sensibilité de la culture fécale est comprise entre 42 et 53%. L'estimation de la sensibilité de l'ELISA varie encore plus, de 34 à 61%. La modification de la sensibilité de l'ELISA dans le modèle II a pour effet de modifier la sensibilité de la culture fécale. Dans le modèle III, la sensibilité de l'ELISA devient supérieure à la sensibilité de la culture fécale. En revanche, dans le modèle IV, les estimations de la sensibilité de la culture fécale et de l'ELISA sont comparables.

Tableau 4

**Valeurs *a posteriori* des différents paramètres pour les quatre modèles utilisés  
avec le logiciel WinBUGS : médiane (intervalle de probabilité à 95%) en pourcentages**

Paramètres	I	II	III	IV (NI)
Se <sub>FC</sub>	42 (30-57)	53 (38-70)	50 (33-70)	53 (34-72)
Sp <sub>FC</sub>	100 (99-100)	100 (99-100)	98 (97-99)	98 (96-100)
Se <sub>ELISA</sub>	34 (31-38)	34 (31-38)	61 (42-83)	53 (33-78)
Sp <sub>ELISA</sub>	99 (98-100)	99 (98-100)	99 (97-100)	99 (98-100)
p <sub>1</sub>	4 (2-7)	3 (1-6)	3 (1-5)	1 (0-4)
p <sub>2</sub>	23 (17-30)	22 (16-28)	19 (13-25)	23 (14-34)

---

## IV- DISCUSSION

---

### 1. VERIFICATION DU PARADIGME DE HUI ET WALTER

#### 1.1. INDEPENDANCE DES TESTS

Les deux tests utilisés reposent sur des bases biologiques différentes (antigène pour l'un, anticorps pour l'autre) et peuvent donc être considérés comme indépendants [Branscum *et al.*, 2005]. De plus, différents auteurs [Kostoulas *et al.*, 2006, Van Schaik *et al.*, 2006] ont testé l'hypothèse d'une dépendance entre les deux tests et ont démontré que cette hypothèse ne pouvait pas être retenue.

Il existe cependant une méthode développée par Vacek [1985] pour appliquer l'approche bayésienne quand les tests sont dépendants.

#### 1.2. DIFFERENCE DE PREVALENCE ENTRE LES DEUX POPULATIONS

La constitution des deux sous-populations (sur la base des manifestations cliniques) a été réalisée indépendamment des résultats des tests et indépendamment de critères biologiques (âge, sexe). Les données récoltées montrent que les prévalences sont différentes. Cette hypothèse est donc vérifiée.

Il n'est pas nécessaire que la différence de prévalence entre les deux populations soit importante [Enøe *et al.*, 2000].

Cependant, selon différents auteurs [Nielsen *et al.*, 2002 ; Toft *et al.*, 2005] il vaudrait mieux utiliser des critères géographiques pour constituer les deux sous-populations.

#### 1.3. CONSTANCE DES PARAMETRES

C'est l'hypothèse la plus difficile à vérifier. En effet, selon van Schaik *et al.* [2006], les sensibilités sont différentes dans les deux populations car l'excrétion est moins intense dans les troupeaux sans signes cliniques.

### 2. CHOIX DES PRIORS

Les priors doivent être définis indépendamment des données de l'étude [Branscum *et al.*, 2005]. Idéalement, ils

devraient être définis à partir d'études comparables [Enøe *et al.*, 2000]. Or il existe très peu d'études concernant les caprins. Les estimations *a priori* ont donc été faites sur la base de résultats obtenus pour d'autres espèces, principalement les bovins. Par ailleurs, différents tests ELISA sont commercialisés pour le diagnostic de la paratuberculose et leurs évaluations ont été réalisées par rapport à différents tests (culture fécale, lésions histologiques, signes cliniques,...). Il est donc très difficile de proposer des valeurs *a priori* pour les différents paramètres.

Le fait de tester différents « priors » permet de vérifier la stabilité de l'analyse bayésienne [Enøe *et al.*, 2000].

### 3. CHOIX D'UNE APPROCHE

Les méthodes probabilistes sont particulièrement adaptées aux maladies chroniques ou à infection persistante telles que la paratuberculose car les antigènes et les anticorps sont détectables pendant l'essentiel du processus infectieux [Branscum *et al.*, 2005].

Les estimations obtenues avec le modèle bayésien non informatif (modèle IV) sont très proches de celles obtenues avec l'approche fréquentielle. L'avantage de l'approche bayésienne, est de pouvoir traiter des échantillons de petite taille, avec des valeurs nulles dans les tableaux de contingence, contrairement à l'approche fréquentielle [Enøe *et al.*, 2000]. Un intervalle de probabilité peut être défini dans tous les cas.

La précision de l'estimation est déterminée par l'amplitude de l'intervalle de probabilité : plus l'intervalle est réduit, meilleure est la précision [Branscum *et al.*, 2005]. Par ailleurs, la taille de l'intervalle de probabilité dépend de la différence de prévalence entre les deux populations [Enøe *et al.*, 2000] : un écart faible entre les deux prévalences induit un intervalle de probabilité large et donc augmente l'imprécision. Les modèles I et II sont les modèles les plus précis.

---

## V - CONCLUSION

---

L'approche bayésienne permet donc d'estimer les caractéristiques de deux tests pour le diagnostic de l'infection paratuberculeuse. En raison du choix des valeurs *a priori* et de la précision des estimations, c'est le modèle II qui

a été retenu. La sensibilité de la culture fécale est supérieure à celle du test ELISA (53% contre 34%). En revanche, les spécificités des deux tests sont comparables.

---

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Branscum A.J., Gardner I.A., Johnson W.O. - Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modelling. *Prev. Vet. Med.*, 2005, **68**, 145-163.
- Enøe C., Georgiadis M.P., Johnson W.O. - Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown. *Prev. Vet. Med.*, 2000, **45**, 61-81.
- Gumber S., Eamens G., Whittington R.J. - Evaluation of a Pourquier ELISA kit in relation to agar gel immunodiffusion (AGID) test for assessment of the humoral immune response in sheep and goats with and without Mycobacterium paratuberculosis infection. *Vet. Microbiol.*, 2006, **115**, 91-101.
- Johnson W.O., Gastwirth J.L., Pearson L.M. - Screening without a «gold standard» : the Hui-Walter paradigm revisited. *Am. J. of Epidem.*, 2001, **153** (9), 921-924.
- Kostoulas P., Leontides L., Enøe C., Billinis C., Florou M., Sofia M. - Bayesian estimation of sensitivity and specificity of serum ELISA and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis in greek dairy sheep and goats. *Prev. Vet. Med.*, 2006, **76** (1-2), 56-73.
- Nielsen S.S., Grønbaek C., Agger J.F., Houe H. - Maximum-likelihood estimation of sensitivity and specificity of ELISAs and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis. *Prev. Vet. Med.*, 2002, **53**, 191-204.
- Pouillot R., Gerbier G., Gardner I.A. - «TAGS», a program for the evaluation of test accuracy in the absence of a gold standard. *Prev. Vet. Med.*, 2002, **53**, 67-81.
- Praet N., Dorny P., Saegerman C., Marcotty T., Berkvens D. - Estimation de la prévalence d'une maladie et des caractéristiques des tests diagnostiques par une approche bayésienne. *Epidémiol. et santé anim.*, 2006, **49**, 113-130.
- Robbe-Austerman S., Gardner I.A., Thomsen B.V., Morrill D.G., Martin B.M., Palmer M.V., Thoen C.O., Ewing C. - Sensitivity and specificity of the agar-gel-immunodiffusion test, ELISA and the skin test for the detection of paratuberculosis in United States Midwest sheep populations. *Vet. Res.*, 2006, **37**, 553-564.
- Spiegelhalter D., Thomas A., Best N., Gilks W. - BUGS: Bayesian Inference Using Gibbs Sampling, version 0.50. MRC Biostatistics Unit, Cambridge, 1996.
- Toft N., Jørgensen E., Højsgaard S. - Diagnosing diagnostic tests: evaluating the assumptions underlying the estimation of sensitivity and specificity in the absence of a gold standard. *Prev. Vet. Med.*, 2005, **68**, 19-33.
- Vacek P.M. - The effect of conditional dependence on the evaluation of diagnostic tests. *Biometrics*, 1985, **41**, 959-968.
- Van Schaik G., Haro F., Mella A., Kruze J. - Bayesian analysis to validate a commercial ELISA to detect paratuberculosis in dairy herds of southern Chile. *Prev. Vet. Med.*, 2007, **79** (1), 59-69.
- Whitlock R.H., Wells S.J., Sweeney R.W., Van Tiem J. - ELISA and faecal culture for paratuberculosis : sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol.*, 2000, **77**, 387-398.

Wintz E. - Etude comparative de différentes méthodes de diagnostic de la paratuberculose caprine. Thèse de doctorat vétérinaire, Alfort, 2006.

ERRATUM :

*Epidémiol. et santé anim.*, 2007, **51**, 57-64

UTILISATION DES TECHNIQUES BAYESIENNES POUR ESTIMER LES  
CARACTERISTIQUES DE DEUX TESTS DE DIAGNOSTIC DE LA  
PARATUBERCULOSE CAPRINE \*

***Pascale Mercier*<sup>1</sup>, *Christian Baudry*<sup>1</sup>, *Jennifer Martin*<sup>1</sup>, *Claire Bertin*<sup>2</sup>, *Karine Laroucau*<sup>2</sup>, *François Beaudeau*<sup>3</sup>, *Henri Seegers*<sup>3</sup> et *Xavier Malher*<sup>3</sup>**

1 Afssa Niort – Laboratoire d'études et de recherches caprines, France

2 Afssa Laboratoire d'études et de recherches en pathologie animale et zoonoses, Maisons-Alfort, France

3 UMR708 Gestion de la santé animale INRA ENVN, Ecole nationale vétérinaire, Nantes, France

Les auteurs présentent leurs excuses pour les erreurs apparues dans le tableau 4 de l'article ci-dessus.

La première ligne du tableau correspond aux estimations de la sensibilité du test ELISA, la deuxième ligne correspond aux estimations de la spécificité du test ELISA, la troisième ligne correspond aux estimations de la sensibilité de la culture fécale et la quatrième ligne correspond aux estimations de la spécificité de la culture fécale. Le tableau corrigé est reproduit ci-dessous.

Dans **Résumé**

*au lieu de* : La Se et la Sp de l'ELISA ont été estimées respectivement à 34% et 99%, tandis que les valeurs pour la culture fécale ont été estimées à 53% et 100%.

*lire* : La Se et la Sp de l'ELISA ont été estimées respectivement à 53 % et 100%, tandis que les valeurs pour la culture fécale ont été estimées à 34% et 99%.

Dans **Summary**

*au lieu de* : The Se and Sp of the ELISA were estimated to be 34% and 99% respectively. For faecal culture, the Se was 53% and the Sp was 100%.

*lire* : The Se and Sp of the ELISA were estimated to be 53% and 100% respectively. For faecal culture, the Se was 34% and the Sp was 99%.

Dans **III Résultats, paragraphe 3, Méthode Bayésienne,**

*au lieu de* : Ainsi, l'estimation de la sensibilité de la culture fécale est comprise entre 42 et 53%. L'estimation de la sensibilité de l'ELISA varie encore plus, de 34 à 61%. La modification de la sensibilité de l'ELISA dans le modèle II a pour effet de modifier la sensibilité de la culture fécale. Dans le modèle III, la sensibilité de l'ELISA devient supérieure à la sensibilité de la culture fécale.

*lire* : Ainsi, l'estimation de la sensibilité de la culture fécale est comprise entre 34 et 61%. L'estimation de la sensibilité de l'ELISA varie de 42 à 53%. La modification de la sensibilité de l'ELISA dans le modèle II a pour effet de modifier la sensibilité de l'ELISA. Dans le modèle III, la sensibilité de l'ELISA devient inférieure à la sensibilité de la culture fécale.

Remplacer le Tableau 4 par le tableau suivant :

**Tableau 4**

**Valeurs *a posteriori* des différents paramètres pour les quatre modèles utilisés avec le logiciel WinBUGS : médiane (intervalle de probabilité à 95%) en pourcentages**

<b>Paramètres</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV (NI)</b>
Se <sub>ELISA</sub>	42 (30-57)	53 (38-70)	50 (33-70)	53 (33-78)
Sp <sub>ELISA</sub>	100 (99-100)	100 (99-100)	98 (97-99)	99 (98-100)
Se <sub>FC</sub>	34 (31-38)	34 (31-38)	61 (42-83)	53 (34-72)
Sp <sub>FC</sub>	99 (98-100)	99 (98-100)	99 (97-100)	98 (96-100)
p <sub>1</sub>	4 (2-7)	3 (1-6)	3 (1-5)	1 (0-4)
p <sub>2</sub>	23 (17-30)	22 (16-28)	19 (13-25)	23 (14-34)

#### Dans **V Conclusion**

*au lieu de* : La sensibilité de la culture fécale est supérieure à celle du test ELISA (53% contre 34%).

*lire* : La sensibilité du test ELISA est supérieure à celle de la culture fécale (53% contre 34%).

Annexe 2 :

Mercier P, Baudry C, Beaudeau F, Seegers H, Malher X. Estimated prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in herds of dairy goats in France. VetRecord/2009/032953, accepté pour publication le 21 janvier 2010.

# Papers

## Estimated prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in herds of dairy goats in France

P. Mercier, C. Baudry, F. Beaudreau, H. Seegers, X. Malher

**A study of the prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) infection in dairy goats was carried out in France, using a serological ELISA. One hundred and five herds were randomly selected in different regions, and all the goats aged six months or older (11,847 goats) were sampled. An estimation had previously been made of the accuracy of the ELISA, and the Rogan-Gladen estimator was used to convert apparent prevalence values into estimates of true prevalence values. Given that sensitivity and specificity at herd level are functions of sample size, and because the sizes of the herds varied considerably, the true prevalence of infection at herd level was estimated using a weighted average depending on the herd size stratum. At the level of the individual animal, the total true prevalence was estimated by applying a weighted average in accordance with the regional distribution of the animals in the target population. At herd level, apparent prevalence and estimated true prevalence were 55.2 and 62.9 per cent, respectively; at individual animal level they were 2.9 and 6.6 per cent, respectively. In herds that were seropositive for MAP, the average within-herd apparent prevalence was 5.9 per cent and the estimated average within-herd true prevalence was 11.1 per cent.**

*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) causes a sub-clinical infection in various mammalian species, including goats (Dreier and others 2006). Some infected animals develop the clinical form of infection (paratuberculosis/Johne's disease) after several years. In goats, clinical signs usually appear after the age of two years. The disease manifests clinically mainly as weight loss (Salgado and others 2005) without loss of appetite. This weight loss is often preceded by a decrease in milk production (Thomas 1983). Only 10 to 20 per cent of clinical cases show diarrhoea or clumping of the faeces in the late stages of the disease (Stehman 1996). As in other ruminant species, weight loss is followed by cachexia and death. In goats, the lesions consist of granulomatous inflammation in the intestine, and the draining lymph nodes are caseous and often partially calcified (Fodstad and Gunnarsson 1979). Control programmes for paratuberculosis are based on hygiene measures to prevent transmission from adult goats to juveniles, and on whole-herd

testing of adult animals with culling of individual reactors to reduce contamination (Whittington and Sergeant 2001). In the absence of a treatment, vaccination is a valuable option; however, as vaccinated animals may shed MAP, it has been suggested that the vaccine is of limited value in preventing the infection (Chiodini and others 1984). Nevertheless, vaccination has been the only recommended procedure for preventing the spread of infection to naive animals (Gilmour 1976, Wilesmith 1982, Wentink and others 1993). The major reasons for controlling MAP infections are that they cause economic losses to farmers because of loss of milk production and the necessity for early culling, and they may also possibly play a role in Crohn's disease in human beings (Mendoza and others 2009). MAP infection is difficult to diagnose because it develops very slowly. In addition, the immune responses to MAP have particular kinetics that make interpretation of the results difficult (Stabel 2000): the cell-mediated immune response that occurs first is not an indicator of persistent infection, because at this stage an animal can still eliminate the bacterium. The humoral immune response appears later, and particularly after the cell-mediated immune response has declined. Therefore, it is the humoral response that is considered to be an indicator of persistent infection. Another difficulty in arriving at a diagnosis of MAP infection is that tests with high sensitivity and specificity are lacking (Nielsen and Toft 2008).

The prevalence of an infection is often a key issue when policy-makers have to decide whether the infection should be considered important, and determine the measures that are to be applied. Prevalence estimates are also often required as input parameters in epidemiological models used for simulating the spread of the infection and also in making risk assessments. In a review, Nielsen and Toft (2009) showed that no estimate of true prevalence of MAP infection at the individual animal level was conclusive in Europe for goats, although MAP was isolated from animals in most of the studies. At herd level also, the estimates of true prevalence were deemed to be uninterpretable in most studies; the exceptions were estimates in

Veterinary Record (2010) 167, 412-415 doi: 10.1136/vr.c4454

**P. Mercier**, DVM,  
**C. Baudry**, MSc,  
Laboratory for Studies and Research on  
Goats, French Food Safety Agency,  
60 rue de Pied-de-Fond, BP 3081,  
79012 Niort Cedex, France  
**F. Beaudreau**, DVM, PhD,  
**H. Seegers**, DVM, PhD,  
**X. Malher**, DVM, PhD,  
UMR1300 Bio-Aggression,  
Epidemiology and Risk Analysis,  
Veterinary School of Nantes, BP 40706,  
44307 Nantes, France

E-mail for correspondence:  
pascale.mercier@anses.fr

Provenance: not commissioned;  
externally peer reviewed

Switzerland and Spain (>20 per cent). The prevalence of MAP infection in dairy goat herds in France is unknown, although paratuberculosis is considered to be a major disease (Petit 2006).

This study was carried out to estimate the herd-level prevalence of MAP infection in herds of dairy goats in France, by means of a serological survey. Despite its relatively low sensitivity, a serological technique was chosen because of the convenience of sample collection, rapid laboratory turnaround time and relatively low cost.

## Materials and methods

### Study design

The target condition under study was infection with MAP, defined as any condition in which the entrance and persistence of MAP bacteria has been of sufficient duration to have elicited an immune response at any time (Nielsen and Toft 2008). This status can be estimated by the detection of antibodies by an ELISA test (Nielsen and Toft 2006).

The target population consisted of all goats aged six months and above in all the registered herds in France. In 2007, 11,483 professional farms with a total of 825,258 goats were registered in France (Agreste 2009). Among these, 10,437 farms, keeping 812,171 goats in total, were located in 14 regions with more than 5000 goats (termed 'goat regions'). Five of the goat regions had more than 70,000 goats each: Poitou-Charentes, Rhône-Alpes, Pays-de-Loire, Centre and Midi-Pyrénées. The other nine 'goat regions' were grouped together into one class, designated as 'Others'. Effectively, therefore, the goat herd population was divided into six regions (Poitou-Charentes, Rhône-Alpes, Pays-de-Loire, Centre, Midi-Pyrénées and Others), with 14 per cent, 20 per cent, 9 per cent, 8 per cent, 8 per cent and 41 per cent of the herds, respectively.

The prevalence of MAP was estimated as 50 per cent by extrapolation from previous sets of unpublished data from the French Food Safety Agency (AFSSA), Niort. Based on this estimated prevalence, the sample had to consist of at least 97 herds in order to obtain a relative precision of 20 per cent with 95 per cent confidence (Thrusfield 2007). The study population included 105 herds randomly selected from the six regions. The distribution of selected herds in the different regions was as follows: 19 per cent from Poitou-Charentes, 19 per cent from Rhône-Alpes, 12 per cent from Pays-de-Loire, 10 per cent from Centre, 5 per cent from Midi-Pyrénées and 35 per cent from Others. The selection was restricted only to herds that had been tested for brucellosis under a compulsory scheme. Blood samples were collected in each of the herds from all the animals aged six months and above (11,847 goats). Sample collection was carried out by veterinary practitioners working within the framework of the national notifiable disease control scheme. All serum samples were sent for testing from each official veterinary laboratory to the Laboratory for Studies and Research on Goats at AFSSA, Niort.

### ELISA

The serum samples were analysed using a commercial ELISA in accordance with the instructions provided by the manufacturer (ELISA Paratuberculose anticorps bicupule; Institut Pourquier). This ELISA measures serum antibodies to MAP, using an absorption step with sonicates from an environmental mycobacterium, *Mycobacterium phlei*, to remove non-specific antibodies, as recommended by Yokomizo and others (1985). On each 96-well plate, 46 serum samples were tested in duplicate. The negative and positive control samples provided by the manufacturer were run in duplicate on each plate. Plates were read at 450 nm with an automated plate reader linked to a computer. A positive sample was defined by a sample-to-positive ratio of 0.6 or more.

With this cut-off, a specificity of 100 per cent (95 per cent confidence interval [CI] 99 to 100 per cent) and sensitivity of 53 per cent (95 per cent CI 38 to 70 per cent) were estimated for the detection of infected goats, based on Bayesian methods (Mercier and others 2007, 2009). These methods are highly recommended for the validation of tests without a gold standard for comparison (Gardner 2004), as is the case for MAP infection.

### Data analysis

Because all the goats were tested in each of the herds, it was possible to calculate the prevalence of MAP at individual animal level and the

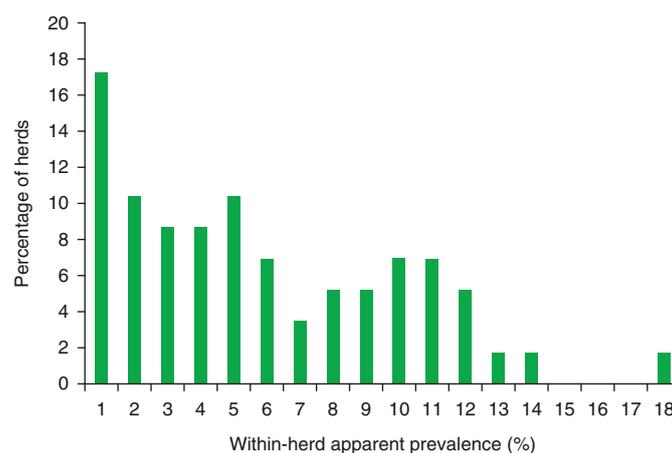


FIG 1: Distribution of within-herd apparent prevalence in 58 dairy goat herds in France positive for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

within-herd prevalence, in addition to the prevalence at herd level. However, because of clustering at herd level, the estimate of MAP infection at individual animal level will be of lower informative value than the estimates of prevalence at herd (number of serologically positive herds among the total number of herds tested) and within-herd (number of serologically positive goats in positive herds among the total number of goats tested in those herds) levels.

The apparent prevalence of MAP infection at individual animal level and at herd level were calculated, respectively, as the number of serologically positive goats among the total number of goats tested, and the number of serologically positive herds among the total number of herds tested. At individual animal level, a positive serological result was defined in terms of the cut-off of the ELISA test. At herd level, the cut-off definition of a positive herd was one serologically positive goat.

At individual animal level, the true prevalence was estimated in two ways. A first estimation was obtained from the apparent prevalence in the whole sample by using the Rogan-Gladen estimator for correction (Rogan and Gladen 1978):

$$AP = Se \times TP + (1 - Sp) \times (1 - TP) \leftrightarrow TP = (AP + Sp - 1) / (Sp + Se - 1)$$

Where Se is the sensitivity and Sp is the specificity, and AP is the apparent prevalence and TP is the true prevalence.

Thereafter, another estimation of the true prevalence at individual animal level was obtained by calculating the weighted average of the true prevalence estimated in each region. The weighting assigned per stratum was the proportion of goats in each region in the target population.

The herd-level counterparts of sensitivity, specificity and true prevalence can be termed herd-level sensitivity (HSe), herd-level specificity (HSp) and herd true prevalence, respectively. As with the individual animal level, the conversion at herd level from herd apparent prevalence to herd true prevalence requires that HSe and HSp are known. Formulas for estimating HSe and HSp were proposed by Martin and others (1992). The HSe can be calculated as  $HSe = 1 - (1 - P)^n$ , where P is the apparent prevalence of infection within a MAP-positive herd, and n is the number of animals tested in the herd. The HSp can be calculated as  $HSp = 1 - (1 - Sp)^n$ .

Both HSe and HSp are functions of sample size (n). In this study, the sample size per herd varied within a wide range (range 14 to 840, first quartile 50, median 89, third quartile 145). Therefore, the true prevalence at herd level was estimated using a weighted average of stratum-specific estimates (Musken and others 2000). Strata were defined based on herd size, and the weighting assigned per stratum was the number of herds in that stratum divided by the total number of herds (spreadsheet available from the authors on request).

The within-herd apparent prevalence was calculated only in 58 serologically MAP-positive herds, as the number of serologically MAP-positive goats among the total number of goats tested in that herd, expressed as a percentage. The Rogan-Gladen estimator was used to derive within-herd true prevalence from within-herd AP.

## Results

### Prevalence of MAP at individual animal level

A total of 347 goats were found to be serologically positive for MAP. The total apparent prevalence was 2.9 per cent (95 per cent CI 2.62 to 3.24 per cent). From the whole sample, and using the Rogan-Gladen estimator, the estimate of the total true prevalence was 5.5 per cent (95 per cent CI 5.1 to 5.9 per cent). Using the weighted average, the estimate of the total true prevalence was higher (6.6 per cent [95 per cent CI 6.1 to 7.0 per cent]).

### Prevalence of MAP at herd level

Fifty-eight herds were found to be serologically positive for MAP. The herd apparent prevalence was 55.2 per cent (95 per cent CI 45.3 to 64.7 per cent), and the estimate of true prevalence was 62.9 per cent (95 per cent CI 41.4 to 84.4 per cent).

### Within-herd prevalence of MAP

In serologically positive herds, the average within-herd apparent prevalence was 5.9 per cent (range 0.7 to 17.6 per cent, first quartile 2.2 per cent, median 4.8 per cent, third quartile 9.3 per cent) (Fig 1). The average estimate of within-herd true prevalence was calculated as 11.1 per cent (range 1.1 to 33.1 per cent, first quartile 4.1 per cent, median 9.0 per cent, third quartile 17.6 per cent).

## Discussion

The results of this study confirmed that MAP infection is widespread in goat herds in France (herd true prevalence estimated to be 62.9 per cent). The sample size was calculated based on an estimated prevalence of 50 per cent, with a relative precision of 20 per cent. The herd apparent prevalence was calculated to be 55.2 per cent on a sample of 105 herds. The calculated relative precision ( $2\sigma$ /herd apparent prevalence, where  $\sigma$  is the sd) was 18 per cent, which was better than the desired value. In the present study, the number of herds in each region provided a study population representative of the target population but was too low for comparisons to be made between regions.

The Rogan-Gladen method was used to estimate true prevalence. An alternative option would have been to adopt a Bayesian approach, for example, an iterative approach such as a Gibbs sampler. However, the use of the Rogan-Gladen estimator has the advantage of being well recognised; also, it forms part of the recommendations of Nielsen and Toft (2009) for estimating the true prevalence when the accuracy of the test is known.

Despite its low sensitivity, an absorption ELISA was chosen for this study because of the convenience of sample collection, rapid laboratory turnaround time and relatively low cost. Moreover, this test was suitable for detecting MAP-infected goats, and its accuracy (specificity of 100 per cent and sensitivity of 53 per cent) has been assessed by Bayesian methods in a previous study (Mercier and others 2007, 2009) and was consistent with data in the literature (Nielsen and Toft 2008). According to Martin and others (1992), the estimate of true prevalence at herd level depends only on the specificity of the test. A specificity of 100 per cent could be questioned, while the data of Nielsen and Toft (2008) gave a range of 93 to 100 per cent. In the present study, the lower specificity value (93 per cent) would give an estimated true prevalence of 44.8 per cent instead of 62.9 per cent. However, this value (44.8 per cent) is included in the 95 per cent CI of the true prevalence estimated at herd level in this study.

In each herd, all the goats aged six months and above were tested, which allowed an estimation of the apparent prevalence at individual animal level and within-herd prevalence in a wide range of sample sizes, making the estimation of true prevalence more relevant. Nevertheless, the prevalence estimate at individual animal level is less informative than those at herd and within-herd levels, given the clustering at herd level.

The true prevalence at individual animal level was estimated as 6.6 per cent, which is lower than the true prevalence at herd level. The average estimate of within-herd true prevalence was calculated as 11.1 per cent. However, the estimated within-herd true prevalence varied within a wide range (1.1 to 33.1 per cent), and 25 per cent of the herds had a within-herd true prevalence greater than 18 per cent. The within-herd prevalence of MAP infection varied greatly between the herds.

The within-herd prevalence was calculated in 58 herds that were

serologically positive for MAP. As the sensitivity of the test was low, some herds that were judged to be serologically negative may have been false-negatives. However, in any false-negative herds, the within-herd prevalence values were probably low, and therefore would have had no major influence on the average estimate of within-herd true prevalence.

The size of the CI is a measure of the precision of the estimate. The precision of the true prevalence was better than the precision of the herd true prevalence because the size of the study population at individual animal level was higher than that at herd level.

The results obtained in this study are difficult to compare with those of other studies because of differences between the studies in the tests used, the sample sizes and the study populations. Using the agar gel immunodiffusion test, a herd apparent prevalence of 52 per cent was found in a study of 23 randomly sampled goat herds in Spain (Reviriego and others 2000), but goats in that study population were older (only goats that were at least 18 months of age were sampled). Apparent prevalence was not calculated at individual animal level. Because the accuracy of the test had not been previously estimated, true prevalence was not estimated. The apparent prevalence (3.6 per cent) found by Mendes and others (2004) was obtained by sampling only 10 per cent of goats (in four herds with a total of 886 goats [ $>2$  years old]). Ideally, comparisons between studies should be made only for true prevalence values. Indeed, true prevalence values are estimates that are adjusted for the performance of the tests, whereas apparent prevalence values depend on the performance of the tests and the cut-off used.

The present study was set up for the purpose of documenting the prevalence of MAP infection in goat herds in France, to enable selection, design and budgeting of MAP infection control programmes in French goat herds. As suggested by Nielsen and Toft (2009), the prevalence of infection at herd and individual animal levels should influence the content of MAP infection control programmes. In France, MAP infection is widespread in goats, and many measures are needed to reduce the percentage of infected herds and goats. Control of clinical signs, together with vaccination and sound management practices, should be considered in herds with a high within-herd prevalence; improved management practices should be considered in herds with moderate within-herd prevalence; and surveillance should be used in herds in which MAP infection has not been detected. Therefore, data on the percentages of serologically positive goats and herds are needed, as well as on geographical trends in variation and the estimated true prevalence of MAP infection (Muskens and others 2000, Nielsen and Toft 2009). In France, the estimate of herd prevalence obtained in the present study could be used in the future by the animal health services at regional level as reference values to support decision-making with regard to the implementation of control strategies. The observed distribution of within-herd prevalence can also suggest a cut-off value to target a given proportion of predominantly infected herds.

## Acknowledgements

The authors thank the veterinary laboratories and professional breeder organisations GDS (Groupements de Défense Sanitaire) for serum collection, and M-P. Pellet for serological analysis. This study was a part of a PhD thesis conducted by PM and supervised by XM from UMR INRA-ENVN (BioEPA).

## References

- AGRESTE (2009) Enquête Structure 2007. <http://agreste.maapar.lbn.fr/tableviewer/document.aspx?FileId=1292>. Accessed April 14, 2009
- CHIODINI, R. J., VAN KRUININGEN, H. J. & MERKAL, R. S. (1984) Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Veterinarian* **74**, 218-262
- DREIER, S., KHOL, J. L., STEIN, B., FUCHS, K., GÜTLER, S. & BAUMGARTNER, W. (2006) Serological, bacteriological and molecularbiological survey of paratuberculosis (Johne's disease) in Austrian cattle. *Journal of Veterinary Medicine, B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* **53**, 477-481
- FODSTAD, F. H. & GUNNARSSON, E. (1979) Post-mortem examination in the diagnosis of Johne's disease in goats. *Acta Veterinaria Scandinavica* **20**, 157-167
- GARDNER, I. A. (2004) An epidemiologic critique of current microbial risk assessment practices: the importance of prevalence and test accuracy data. *Journal of Food Protection* **67**, 2000-2007
- GILMOUR, N. J. (1976) The pathogenesis, diagnosis and control of Johne's disease. *Veterinary Record* **99**, 433-434
- MARTIN, S. W., SHOUKRI, M. & THORBURN, M. A. (1992) Evaluating the health status of herds based on tests applied to individuals. *Preventive Veterinary Medicine* **14**,

33-43

- MENDES, S., BOINAS, F., ALBUQUERQUE, T., FERNANDES, L., AFONSO, A. & AMADO, A. (2004) Epidemiological studies on paratuberculosis in small ruminants in Portugal. *Epidémiologie et Santé Animale* **45**, 61-71
- MENDOZA, J. L., LANA, R. & DÍAZ-RUBIO, M. (2009) *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis and its relationship with Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology: WJG* **15**, 417-422
- MERCIER, P., BAUDRY, C., MARTIN, J., BERTIN, C., LAROUCAU, K., BEAUDEAU, E., SEEGERS, H. & MALHER, X. (2007) Utilisation des techniques bayésiennes pour estimer les caractéristiques de 2 tests de diagnostic de la paratuberculose caprine. *Epidémiologie et Santé Animale* **51**, 57-64
- MERCIER, P., BAUDRY, C., MARTIN, J., BERTIN, C., LAROUCAU, K., BEAUDEAU, E., SEEGERS, H. & MALHER, X. (2009) Utilisation des techniques bayésiennes pour estimer les caractéristiques de deux tests de diagnostic de la paratuberculose caprine - Erratum. *Epidémiologie et Santé Animale* **56**, 255-256
- MUSKENS, J., BARKEMA, H. W., RUSSCHEN, E., VAN MAANEN, K., SCHUKKEN, Y. H. & BAKKER, D. (2000) Prevalence and regional distribution of paratuberculosis in dairy herds in the Netherlands. *Veterinary Microbiology* **77**, 253-261
- NIELSEN, S. S. & TOFT, N. (2006) Age-specific characteristics of ELISA and fecal culture for purpose-specific testing for paratuberculosis. *Journal of Dairy Science* **89**, 569-579
- NIELSEN, S. S. & TOFT, N. (2008) Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques. *Veterinary Microbiology* **129**, 217-235
- NIELSEN, S. S. & TOFT, N. (2009) A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Preventive Veterinary Medicine* **88**, 1-14
- PETIT, H. (2006) La paratuberculose des petits ruminants: résultats d'une enquête GDS sur la paratuberculose. *Le Point Vétérinaire* **263**, 46-50
- REVIRIEGO, F. J., MORENO, M. A. & DOMÍNGUEZ, L. (2000) Soil type as a putative risk factor of ovine and caprine paratuberculosis seropositivity in Spain. *Preventive Veterinary Medicine* **43**, 43-51
- ROGAN, W. J. & GLADEN, B. (1978) Estimating prevalence from the results of a screening test. *American Journal of Epidemiology* **107**, 71-76
- SALGADO, M., MANNING, E. J. & COLLINS, M. T. (2005) Performance of a Johne's disease enzyme-linked immunosorbent assay adapted for milk samples from goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **17**, 350-354
- STABEL, J. R. (2000) Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology* **77**, 465-473
- STEHMAN, S. M. (1996) Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **12**, 441-455
- THOMAS, G. W. (1983) Paratuberculosis in a large goat herd. *Veterinary Record* **113**, 464-466
- THRUSFIELD, M. (2007) Surveys. In *Veterinary Epidemiology*. 3rd edn. Blackwell Science. pp 228-246
- WENTINK, G. H., BONGERS, J. H., VOS, J. H. & ZEEUWEN, A. A. (1993) Relationship between negative skin test with Johnin after vaccination and post mortem findings. *Veterinary Record* **132**, 38-39
- WHITTINGTON, R. J. & SERGEANT, E. S. (2001) Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in animal populations. *Australian Veterinary Journal* **79**, 267-278
- WILESMITH, J. W. (1982) Johne's disease: a retrospective study of vaccinated herds in Great Britain. *British Veterinary Journal* **138**, 321-331
- YOKOMIZO, Y., YUGI, H. & MERKAL, R. S. (1985) A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Japanese Journal of Veterinary Science* **47**, 111-119

Annexe 2bis : calcul de la prévalence réelle pour les troupesaux

taille	Ni	Pi	PATi	ni	TSei	PVTi	Ni x PVTi
<50	26	0,03	0,50	35	0,655	0,76	19,83
[50 – 100[	35	0,04	0,63	78	0,959	0,66	23,00
[100 – 200[	31	0,03	0,61	139	0,986	0,61	19,19
>= 200	13	0,02	0,31	301	0,998	0,31	4,04
	105						66,06

Ni = nombre de troupesaux dans la classe i

Pi = prévalence intra-troupeau moyenne dans la classe i

PATi = % de troupesaux positifs dans la classe i

ni = taille moyenne des troupesaux dans la classe i

TSei = sensibilité troupeau dans la classe i, calculée par la formule  $(1 - (1 - P_i)^{n_i})$

PVTi = prévalence réelle troupeau dans la classe i

La prévalence réelle troupeau =  $\sum Ni \times PVTi / \sum Ni = 66,06/105 = 62,9 \%$



Annexe 3 :

Mercier P, Beaudeau F, Laroucau K, Bertin C, Boschioli ML, Baudry C, Seegers H, Malher X. Comparative age-related responses to serological and faecal tests directed to *Mycobacterium avium paratuberculosis* (Map) in French dairy goats. *Small Ruminant Research*, 87 (2009) 50-56



## Comparative age-related responses to serological and faecal tests directed to *Mycobacterium avium paratuberculosis* (*Map*) in French dairy goats

P. Mercier<sup>a,\*</sup>, F. Beauudeau<sup>b</sup>, K. Laroucau<sup>c</sup>, C. Bertin<sup>c</sup>, M.-L. Boschioli<sup>c</sup>,  
C. Baudry<sup>a</sup>, H. Seegers<sup>b</sup>, X. Malher<sup>b</sup>

<sup>a</sup> AFSSA – LERC, 60, rue de Pied-de-Fond, BP 3081, 79012 Niort Cedex, France

<sup>b</sup> INRA, Envn, UMR 1300 BioEpAR, BP 40706, 44307 Nantes Cedex 3, France

<sup>c</sup> AFSSA – LERPAZ, 23, avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort Cedex, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 March 2009

Received in revised form

28 September 2009

Accepted 8 October 2009

Available online 25 October 2009

#### Keywords:

*Mycobacterium avium* subspecies

*paratuberculosis*

Subclinical infection

Serological tests

Faecal tests

Goats

Bayesian statistic

Kappa statistic

### ABSTRACT

The objectives of the present study were to estimate sensitivity and specificity of 6 different tests directed to *Mycobacterium avium paratuberculosis* (faecal culture, microscopic examination, Agar Gel Immunodiffusion (AGID) and 3 commercial ELISA tests, named A, B and C) in different age categories and to assess the degree of agreement between responses thus obtained. The study was carried out in 12 French commercial dairy herds, which were selected in a population of herds with unknown paratuberculosis status. In each herd, a sample of goats without clinical signs was randomly selected according to 4 age categories. Responses of 412 goats with concomitant results for the 6 tests were analysed. In the 4 age categories, the specificity and the sensitivity of the 6 tests were estimated using Bayesian methods with conditional dependence between tests. Agreement among the results obtained for these tests was determined by calculating the kappa statistic.

With the exception of AGID, the proportions of positive responses for each test differed significantly between herds (range 0–27.5%). With the exception of scopy, the proportions of positive responses for each test differed significantly between age categories. Sensitivities and specificities of the 6 tests were very different according to age categories. Specificities were higher than sensitivities. The highest values in sensitivity were obtained in goats between 2 and 3 years, with the best value for ELISA C (76.6%, 95% CI of 46.1–96.1%). In the other age categories, sensitivities of the 6 tests were too low to have practical use. Only scopy, faecal culture and ELISA B have positive responses in category 1 (goats of less than 1 year). Agreements between the different pairs of tests were low, except between the 3 ELISA tests which were in “good” or “quite good” agreement.

This study showed that detection of infection with *Map* was efficient only in goats between 2 and 3 years, with an ELISA test. For goats in other age categories, no test was sensitive enough to detect goats infected with *Map*. In a *Map* infection control program, ELISA tests, performed on goats between 2 and 3 years, can be used to define herd status and to estimate prevalence but they should not be used at goat level to select goats for culling, due to the low positive predictive value.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author: Tel.: +33 5 49 79 61 28; fax: +33 5 49 79 42 19.

E-mail address: [p.mercier@niort.afssa.fr](mailto:p.mercier@niort.afssa.fr) (P. Mercier).

## 1. Introduction

Paratuberculosis is an incurable wasting disease caused by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (*Map*) in various mammal species, including goats. The disease has a prolonged incubation period and, thus, most infected animals are in a subclinical stage. In goats, clinical signs usually appear after 2 years of age. The clinical expression of the disease mainly consists in a weight loss (Salgado et al., 2005) without any loss of appetite. Generally occurring during lactation, this weight loss is often preceded by a decrease in milk production (Thomas, 1983). Only 10–20% of clinical cases show diarrhea or clumping of faeces in late stages of the disease (Stehman, 1996). As in other ruminant species, emaciation is followed by cachexia and death. There is no therapy to stop this evolution. Economic losses due to paratuberculosis are extensively documented in cattle (Ott et al., 1999). In goats, they can be severe because of production decrease and early mortality.

In western France, goat herds are intensively reared, with a yield of 791 L per present goat per year (National Milk Recording Scheme, Institut de l'élevage, 2008) and a median annual replacement rate of about 35% (Malher et al., 1999). In these herds, 44% of exits (culled and dead goats) were reported to take place under or at the age of 3 years (Malher et al., 2001). Exits for health reason and low milk production, as declared by the farmer, accounted for 42.5% and 36.6% of total exit respectively. Sixteen percent of exit due to health reason were related to emaciation.

As in cattle, transmission of *Map* in goats is assumed primarily via faecal–oral route (Stehman, 1996). The prevailing hypothesis on the pathogenesis of paratuberculosis is that after infection, cell-mediated immune responses occur, followed by humoral immune responses together with faecal excretion of *Map* (Stabel, 2000). Observations on goats during experimental infections support this hypothesis (Storset et al., 2001). However, early *Map* shedding has been detected in experimentally infected goats (Stewart et al., 2006) as well as in naturally infected calves (Antognoli et al., 2007; van Roermund et al., 2007).

In goats, clinical diagnosis of paratuberculosis is difficult as symptoms are not specific and may be easily misinterpreted with other causes of chronic weight loss like parasitism, internal abscesses due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*, caprine arthritis–encephalitis, and malnutrition (Stehman, 1996). However, clinical stage of paratuberculosis can be diagnosed by post-mortem examination including necropsy, histology or tissue culture (Martinson et al., 2008). Nevertheless, ante-mortem detection of animals at subclinical stage is still a diagnostic challenge (Martinson et al., 2008). Different specific immunological or bacteriological markers can be used for detection, depending on the infection stage: cell-mediated immune responses could be detected at early stages while serum antibodies and *Map* are more suitable for detecting progressed stages of infection.

Direct and indirect tests are currently used for the detection of the subclinically infected animals (Geisbauer et al., 2007). On one hand, microscopical examination of Ziehl–Neelsen stained smears, faecal culture and PCR are used as direct methods, on the other hand, Agar Gel Immunod-

iffusion (AGID), Complement Fixation Test (CFT) and the Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA) are used as indirect methods. Tests used to detect the cell-mediated immune response (skin test, interferon gamma test) are still not used in routine. Depending on the test, its ability to detect infected animals will vary with age, as markers change during the productive life of the goat (Salgado et al., 2005; Nielsen and Toft, 2008). Therefore to choose a test, it is needed to assess its performance according to the age of the animal. The sensitivity ( $Se$ ) and specificity ( $Sp$ ) of a test can be obtained with several statistical methods. When a perfect reference test (gold-standard) is available, the  $Se$  and  $Sp$  of the test can be estimated directly. However, there is no gold-standard available for paratuberculosis and the latent class methods (for example Bayesian approach) are specifically useful for this disease (Branscum et al., 2005). The latent class models mean that the disease status of the individuals is latent: existing but not realized (Toft et al., 2005). Latent class models were first developed by Hui and Walter (1980) for 2 independent tests, e.g. which do not measure the similar biological phenomenon (Gardner et al., 2000). In the last years, Bayesian conditional dependence models were developed for tests which measured the same biological attribute. The Bayesian approach to infer about a generic parameter combines prior information about this parameter with the data, to obtain the posterior distribution (Branscum et al., 2005).

Despite the possibility of using vaccines which can prevent clinical signs but not *Map* excretion (Rosseels and Huygen, 2008), control of paratuberculosis is mainly based on detection and elimination of shedders and, more efficiently, infected animals, which could eventually transmit *Map*. To control paratuberculosis, it is more relevant, for practical and economical reasons, to use 1 test rather than a battery of tests.

Thus, the objectives of the present study were, within different age categories:

- to estimate the sensitivity and the specificity of 6 different tests (faecal culture, microscopic examination, AGID and 3 commercial ELISA tests) and
- to assess the degree of association between responses obtained by the 6 different tests.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sampled population and sampling

The study was carried out in 480 goats belonging to 12 commercial dairy herds (called A–L) from the middle western France between February and March 2004. Herds were selected in a population with unknown paratuberculosis status based on the willingness of the farmer to participate in the survey. Their average size was 286 goats (range: 88–650).

In each herd, goats without clinical signs were randomly selected according to 4 age categories: less than 1 year, between 1 and 2 years, between 2 and 3 years and more than 3 years, corresponding to age categories 1, 2, 3 and 4, respectively.

Blood and fresh faecal samples were simultaneously collected from each goat in order to perform 6 different tests, i.e. 2 faecal tests for detection of *Map* (faecal culture and microscopic examination) and 4 serological tests (AGID and 3 commercial ELISA tests). Individual faecal samples were collected from the rectum using a new glove for each goat and approximately 10 g of the faecal sample was immediately placed in 2 individual sterile 50-ml containers. Blood samples (20 ml) were obtained by puncture of the jugular vein. All samples (faeces and blood) were placed in

coolers and transported directly to the laboratory. After clotting and centrifugation, serum was harvested from blood samples. Serum samples were divided in 4 aliquots. Both sera and faecal samples were frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until tested.

## 2.2. Laboratory analyses

### 2.2.1. Detection of *Map*

Ziehl-Neelsen-stained faeces smears were examined microscopically ("scopy") by the same observer during a fixed time (15 min), similarly to Martinson et al. (2008). Positive test was based on the presence of clumps of strong acid fast stained bacilli (OIE, 2004).

*Map* culture was performed according to the method of Dreier et al. (2006). In brief, samples were decontaminated with HPC (hexa-decylpyridinium chloride) and inoculated onto four Herrold's egg yolk medium (HEYM) slants, supplemented or not with mycobactin. Incubation was carried out at  $37^{\circ}\text{C}$ , for up to 5 months. Samples were checked for growth of *Map* every month, starting 1 month after inoculation. Visible colonies on tubes with mycobactin were confirmed by Ziehl-Neelsen staining and a PCR targetting the IS900 genetic element adapted from Moss et al. (1992). Only PCR-positive cultures were reported as positive. Results were reported as negative, positive or contaminated. All animals with "contaminated" faecal culture were excluded from the analysis.

### 2.2.2. Serological tests

For Agar Gel Immunodiffusion test (AGID), agarose gels were prepared according to the method of Sherman et al. (1984), using a crude protoplasmic extract of *Map* (strain *M. avium* 18) as antigen. Plates were read at 24 and 48 h after incubation at room temperature, and results were recorded as positive if there was one precipitation line confluent with the line produced by the positive control serum. A negative result was recorded if no line of precipitation or non-specific lines were observed.

The serum samples were examined with three commercial ELISA tests: ELISA A (ELISA Paratuberculose anticorps bicipule<sup>®</sup>, Institut Pourquier, Montpellier, France), ELISA B (Herdchek M.pt<sup>®</sup>, Idexx, Cergy-Pontoise, France) and ELISA C (Kit LSI paratuberculose confirmation serum ruminants<sup>®</sup>, LSI, Lissieu, France). All tests were performed according to the manufacturers' instructions. The negative (NC) and positive control samples (PC) provided by the manufacturers were included in each run. All tests are suitable for goats and include a rapid absorption step with *Mycobacterium phlei* to remove cross-reacting antibodies (Yokomizo et al., 1985).

Doubtful results were considered as positive.

All tests were performed blind for other test outcomes.

## 2.3. Strategy of analysis

The proportion (in percentage) of positive responses for each test was calculated by dividing the number of positive responses for the test by the

total number of goats tested in the population. For each of the 6 diagnostic tests, chi-squared tests ( $\chi^2$ ) were used to compare the proportion of positive responses relative to herd origin (A–L) and to age of animals.

In the 4 age categories, specificity and sensitivity of the 6 tests were calculated using Bayesian methods with conditional dependence between tests, according to Dendukuri et al. (2009). Serological tests which measure the same biological phenomenon (antibodies production) are correlated. Faecal tests are also correlated because they both measure faecal excretion of *Map*. Two latent variables are defined: AB (antibodies) and FE (faecal excretion). AGID and ELISA tests were assumed to be dependent on AB and faecal culture and scopy were assumed to be dependent on FE. Non-informative priors were used. Sensitivities and specificities were estimated with BLCM version 1.3 (BayesLatentClass-Models), <http://www.medicine.mcgill.ca/epidemiology/Dendukuri>.

Agreement among the results obtained for these tests was determined by calculating the kappa statistic. The interpretation of values of the kappa statistic is based on Landis and Koch (1977):  $\kappa < 0.00$  is "poor",  $0.00 < \kappa < 0.20$  is "slight",  $0.21 < \kappa < 0.40$  is "fair",  $0.41 < \kappa < 0.60$  is "moderate",  $0.61 < \kappa < 0.80$  is "substantial", and  $0.81 < \kappa < 1.00$  is "almost perfect" agreement. Agreement was considered as "good" when kappa statistic was more than 0.60 and "low" in other situations.

Statistical analysis was performed with Winepiscope 2.0 for kappa statistics (Thrusfield et al., 2001) and Systat (version 9.01, SPSS Inc., 1998) for chi-squared tests ( $\chi^2$ ), with Yates correction in case of low cell frequencies. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

Among the 480 sampled goats, only those for which all data were available (412) were included in the analysis.

### 3.1. Tests results according to herd

The distribution of positive responses according to herds is given in Table 1. The proportion of positive responses by at least 1 test was 19%. The apparent prevalence varied from 0% to 50% depending on herds, as estimated by the proportion of goats with at least 1 positive test (0–28% according to 1 test).

With the exception of AGID, the proportions of positive responses differed significantly ( $p < 0.05$ ) between herds.

### 3.2. Tests results depending on age

Proportions of positive responses for the different tests according to age category are displayed in Table 2, together

**Table 1**  
Frequency and proportion of positive responses according to each test among the 12 herds.

Herds	Identification	$n^a$	Number of positive responses						At least 1 positive test
			AGID	ELISA A	ELISA B	ELISA C	Scopy	FC <sup>b</sup>	
A		21	0	0	2	0	3	0	4 (19.0%)
B		40	1	2	2	2	0	5	6 (15.0%)
C		22	0	0	0	0	0	0	0 (0.0%)
D		36	1	1	2	1	0	2	3 (8.3%)
E		40	0	0	0	0	0	0	0 (0.0%)
F		40	1	7	8	10	1	11	20 (50.0%)
G		40	0	0	2	0	0	2	2 (5.0%)
H		30	0	0	1	2	2	0	4 (13.3%)
I		40	4	6	11	8	1	3	12 (30.0%)
J		40	2	6	6	7	6	6	12 (30.0%)
K		40	3	7	9	8	0	8	13 (32.5%)
L		23	0	0	0	0	3	1	3 (13.0%)
Total		412	12 (2.9%)	29 (7.0%)	43 (10.4%)	38 (9.2%)	16 (3.8%)	36 (8.7%)	79 (19.2%)
Differences between herds			NS	S	S	S	S	S	

<sup>a</sup> Number of goats with exhaustive results in the 6 tests.

<sup>b</sup> Faecal culture.

**Table 2**  
Frequency and proportion of positive responses according to each test within age categories.

Age	n <sup>a</sup>	Number of positive responses						At least 1 positive test
		AGID	ELISA A	ELISA B	ELISA C	Scopy	FC <sup>b</sup>	
<1 year	104	0	0	2	0	4	8	12 (11.5%)
1–2 years	104	5	10	14	13	3	13	26 (25.0%)
2–3 years	101	6	14	13	16	6	12	22 (21.8%)
>3 years	103	1	5	14	9	3	3	19 (18.4%)
Total	412	12 (2.9%)	29 (7.0%)	43 (10.4%)	38 (9.2%)	16 (3.8%)	36 (8.7%)	79 (19.2%)
Differences ( $p < 0.05$ )		S	S	S	S	NS	S	NS

<sup>a</sup> Number of goats with exhaustive results in the 6 tests.

<sup>b</sup> Faecal culture.

with the distribution of goats. In category 1, only scopy, faecal culture and ELISA B gave positive responses (4% (4/104), 8% (8/104) and 2% (2/104) respectively) whereas all tests gave positive responses in age categories 2, 3 and 4.

In the aggregate, the distribution of positive responses for each test was significantly ( $p < 0.05$ ) different among age categories for serological tests (AGID, ELISA A, ELISA B and ELISA C), with higher proportions in categories 2 and 3 and lower proportions in age category 1. Proportions of positive responses to AGID were lower than proportions of positive responses to ELISA tests. The distribution of positive responses to faecal culture was also significantly ( $p < 0.05$ ) different among age categories, with higher proportions in categories 2 and 3 and lower proportion in age category 4. For scopy, the proportions of positive responses according to the age category were lower than for faecal culture and not significantly ( $p < 0.05$ ) different among age categories.

Among age categories 1, 2, 3 and 4, the proportion of goats with at least one positive response in the 6 tests did not differ significantly (11.5%, 25.0%, 21.8%, 18.4% respectively).

### 3.3. Sensitivity and specificity of the 6 tests in each age category

Sensitivities and specificities of the 6 tests were very different according to age categories (Table 3). Specificities were higher than sensitivities.

The highest values in sensitivity were obtained in age category 3, with the best value for ELISA C (76.6%, 95% CI of

46.1–96.1%). In the other age categories, sensitivities of the 6 tests were very low (all were lower than 10%, except the sensitivity of ELISA B in age category 4). In age category 1, the highest value in sensitivity was obtained for faecal culture, while in age categories 2 and 4, the highest value for sensitivity was obtained for ELISA B. Except for age category 4, sensitivity of faecal culture was higher than sensitivity of scopy.

In age categories 1, 3 and 4, the highest value for specificity was obtained for AGID, while in age category 2, the highest value for specificity was obtained for scopy. The highest values for specificity of AGID, ELISA A and ELISA C were obtained in age category 1, while the highest values for specificity of ELISA B, scopy and faecal culture were obtained in age category 3.

### 3.4. Comparison between tests

Table 4 displays the agreement between pairs of tests within each age-category.

For age category 1, due to a very small number of positive responses, agreement between pairs of tests was 0 or could not be determined (indicated as ND in Table 4).

Agreements between AGID and the 3 ELISA tests were “low” for goats in age categories 2–4.

Agreements between the 3 ELISA tests were “good” for goats in age categories 2 and 3. The best agreements were between ELISA A and ELISA B in age category 3, and between ELISA A and ELISA C in age category 2. For goats in age category 4, agreement was “good” between ELISA A and ELISA

**Table 3**  
Sensitivities (Se) and specificities (Sp) of each test within age categories (95% CI).

Test	Age	Age			
		<1 year (n = 104)	1–2 years (n = 104)	2–3 years (n = 101)	>3 years (n = 103)
AGID	Se	1.5 (0.1;21.7)	3.4 (0.7;35.2)	34.3 (15.3;59.3)	2.7 (0.3;29.9)
ELISA A	Se	1.6 (0.2;21.8)	4.3 (0.6;70.4)	75.5 (44.5;96.2)	5.5 (0.8;68.8)
ELISA B	Se	3.4 (0.8;31.6)	9.3 (3.8;65.3)	70.0 (40.7;92.3)	14.7 (6.2;83.4)
ELISA C	Se	1.5 (0.2;21.6)	6.5 (1.3;79.9)	76.6 (46.1;96.1)	9.4 (2.2;83.3)
Scopy	Se	4.3 (0.2;80.1)	2.2 (0.1;30.6)	16.7 (3.3;43.2)	4.4 (0.5;51.6)
FC	Se	7.9 (0.6;81.3)	7.8 (0.8;69.4)	71.2 (39.9;97.1)	2.9 (0.1;85.1)
AGID	Sp	97.8 (67.4;99.8)	78.9 (49.0;98.1)	97.6 (93.3;99.5)	95.0 (64.6;99.6)
ELISA A	Sp	97.6 (66.0;99.8)	51.5 (12.7;98.2)	95.9 (88.8;99.4)	79.3 (22.6;98.9)
ELISA B	Sp	95.4 (55.7;99.1)	54.2 (18.4;93.6)	96.1 (89.6;99.5)	67.1 (11.9;93.4)
ELISA C	Sp	97.6 (67.6;99.8)	44.6 (7.1;96.9)	93.6 (86.2;98.1)	70.3 (11.6;97.4)
Scopy	Sp	88.2 (8.0; 99.6)	85.1 (45.9;99.6)	94.7 (88.5;98.3)	94.1 (38.7;99.7)
FC	Sp	82.3 (9.4;99.4)	53.3 (12.0;96.4)	97.3 (91.3;99.9)	82.1 (9.4;99.8)

**Table 4**

Agreement between pairs of tests: kappa statistic (95% CI).

Tests compared	Age			
	<1 year (n = 104)	1–2 years (n = 104)	2–3 years (n = 101)	>3 years (n = 103)
AGID vs ELISA A	ND <sup>a</sup>	0.50 (0.32;0.68)	0.56 (0.39;0.74)	0.32 (0.18;0.46)
AGID vs ELISA B	0.00 (–1.00;1.00)	0.38 (0.21;0.54)	0.60 (0.42;0.78)	0.12 (0.03;0.21)
AGID vs ELISA C	ND	0.40 (0.23;0.57)	0.50 (0.34;0.67)	0.19 (0.07;0.30)
ELISA A vs ELISA B	0.00 (–1.00;1.00)	<b>0.62<sup>b</sup></b> (0.44;0.81)	<b>0.96</b> (0.77;1.00)	0.49 (0.33;0.66)
ELISA A vs ELISA C	ND	<b>0.85</b> (0.66;1.00)	<b>0.92</b> (0.73;1.00)	<b>0.69</b> (0.51;0.88)
ELISA B vs ELISA C	0.00 (–1.00;1.00)	<b>0.62</b> (0.43;0.81)	<b>0.88</b> (0.69;1.00)	0.56 (0.38;0.75)
Scopy vs FC	0.12 (–0.06;0.30)	–0.05 (–0.19;0.10)	0.04 (–0.14;0.22)	–0.03 (–0.22;0.16)
Scopy vs AGID	0.00 (–0.96;0.96)	–0.04 (–0.22;0.15)	0.12 (–0.08;0.31)	–0.01 (–0.18;0.15)
Scopy vs ELISA A	0.00 (–0.96;0.96)	0.28 (0.12;0.43)	0.13 (–0.04;0.30)	–0.04 (–0.22;0.15)
Scopy vs ELISA B	0.32 (0.14;0.50)	0.07 (–0.07;0.22)	0.14 (–0.03;0.32)	–0.05 (–0.19;0.09)
Scopy vs ELISA C	0.00 (–0.96;0.96)	0.21 (0.07;0.36)	0.21 (0.04;0.37)	0.13 (–0.04;0.29)
FC vs AGID	0.00 (–0.67;0.67)	0.52 (0.35;0.69)	0.40 (0.22;0.58)	0.49 (0.33;0.66)
FC vs ELISA A	0.00 (–0.67;0.67)	0.27 (0.08;0.46)	<b>0.65</b> (0.46;0.84)	0.48 (0.30;0.67)
FC vs ELISA B	–0.03 (–0.18;0.12)	0.28 (0.09;0.47)	0.59 (0.40;0.78)	0.20 (0.06;0.34)
FC vs ELISA C	0.00 (–0.67;0.67)	0.38 (0.19;0.58)	0.59 (0.40;0.78)	0.30 (0.14;0.47)

<sup>a</sup> ND: not determined.<sup>b</sup> In bold: good agreement (kappa statistic >0.60).

C but neither between ELISA B and ELISA A nor between ELISA B and ELISA C.

Agreement between scopy and faecal culture was “low”, no matter the age of goats. Agreements between the indirect and the direct tests were “low” for goats in age categories 2 and 4. For goats in age category 3, ELISA A, ELISA B, ELISA C and faecal culture had a “good” or a quite “good” agreement.

#### 4. Discussion

The aim of the present study was to describe the performances of 6 tests, in absence of any gold-standard, to detect infection with *Map*, depending on age, as well as their degree of agreement. To our knowledge, this is the first study describing the compared test responses of serological and faecal tests as influenced by age in a large sample of goats ( $n=412$ ) without clinical signs of paratuberculosis. Sensitivity and specificity, as well agreement between tests, were not estimated in the whole sampled population because sampling was done in order to get almost equal number of goats in each age category and thus, the whole sampled population was not representative. As estimated by the responses to the tests, the between herd variation is large, ranging from 0% to 50%.

Except for age category 3, sensitivities of the 6 tests were low, which indicated that tests are not able to detect all animals infected with *Map*. For age category 3, ranking of tests based on their sensitivity was: ELISA C, ELISA A, faecal culture, ELISA B, AGID and scopy, with 76.6%, 75.5%, 71.2%, 70.0%, 34.3% and 16.7%, respectively. But these estimates were not very precise in relation to the large width of CI. The estimates of specificities were more precise. As previously reported by Lilenbaum et al. (2007), the current study confirmed that AGID and scopy are not sensitive methods. For ELISA tests sensitivities were good and agreements between these tests were “almost perfect” in this age category.

Sensitivities and specificities were estimated by Bayesian methods, with no test been used as reference. Sensitivities and specificities were estimated by comparison with a latent status. Latent class models were first developed by Hui and Walter (1980) for 2 independent tests. Tests were considered to be conditionally independent if they do not measure the similar biological phenomenon (Gardner et al., 2000). In the last years, Bayesian conditional dependence models were developed for tests which measured the same biological attribute. In the present study, the 4 serological tests were conditionally dependent and measured the antibodies level. The 2 faecal tests were also conditionally dependent and measured the faecal excretion of *Map*. The model developed by Dendukuri et al. (2009) was adapted to these 2 latent variables. For Bayesian methods, prior information on the parameters can be incorporated. These prior information can be informative (e.g. based on previous studies or expert opinion) or non-informative (or uniform). Selection of non-informative priors reflected our ignorance of the performances of tests according to age and induced a larger magnitude of CI.

To our knowledge, only two studies reported evaluations of ELISA and faecal culture by latent class approach, one for cattle (Nielsen et al., 2002) and one for goats (Kostoulas et al., 2006): sensitivity of faecal culture was estimated to 20–25% for cattle and 7% for goats, and specificity of faecal culture was estimated to be 98% for cattle and 97% for goats. There was no estimate for ELISA in cattle, while sensitivity was estimated to be 49% and specificity was estimated to be 94% for goats. In goats between 2 and 3 years, results of the present study were better for sensitivities and in the same range for specificities, both for ELISA and faecal culture.

Our results show that faecal culture can be positive in goats of less than 1 year (category 1), thus that *Map* shedding can take place and therefore that these goats are capable of transmitting the bacillus. Faecal shedding of *Map* in goats between 8 and 12 months was previously reported in experimentally infected goats (Munjal et al.,

2007; Storset et al., 2001; Stewart et al., 2006) as well as in experimentally infected calves before 1 year (McDonald et al., 1999). Faecal shedding of *Map* was also detected in naturally infected calves of less than 1 year (Antognoli et al., 2007; van Roermund et al., 2007). However these tests cannot discriminate the presence of *Map* in faeces passing through the intestine (passive shedding) from the active shedding due to infection (Antognoli et al., 2007; van Roermund et al., 2007).

ELISA B gave also positive results in goats of less than 1 year but the proportion of positive responses was very low. In experimentally infected goats, some studies have shown positive responses to ELISA tests on goats between 8 and 12 months (Munjal et al., 2007; Storset et al., 2001; Sigurdardottir et al., 1999). In naturally infected calves, Antognoli et al. (2007) showed that some calves had positive ELISA results before 8 months. As ELISA B showed a poor agreement with faecal culture, no conclusion can be drawn about active or passive shedding of scopy or faecal culture positive-tested goats. For this category of goats, detection of cell-mediated immune response by skin test or interferon gamma test, which can be detected at early stages, is recommended.

The agreements between the 3 ELISA tests were “good” in age category 3. Our results are consistent with those of most studies carried out in cattle (Collins et al., 1991, 2005; Clark et al., 2008): agreement between ELISA tests is substantial to almost perfect (kappa between 0.77 and 0.85). However, McKenna et al. (2006) found a slight to fair agreement between 3 commercial ELISA tests with a lack of agreement mainly on positive samples. These findings show that detection of *Map* infected goats in age category 3 may be indifferently conducted by only one of the 3 ELISA tests.

The proportions of positive responses in the group of goats of more than 3 years (category 4) were lower than in the other age categories for all the tests, except for ELISA B. Infected goats of this age category are more likely to be culled or naturally dead, as clinical signs of paratuberculosis appear mainly in goats of more than 2 years. Thus, the goats remaining in the herds were more likely to be uninfected and to give negative responses to tests.

Tests used in this study are more likely to detect progressed stages of infection. To detect early stages, the cell-mediated immune responses (skin test, interferon gamma test) would have been more adequate but are not yet suitable for routine testing. However, it would be interesting, in a forthcoming study, to measure the cell-mediated immune responses depending on the age of the goats.

## 5. Conclusion

Due to high sensitivity and specificity, detection of infection with *Map* was reasonably efficient, only in goats between 2 and 3 years, with an ELISA test. For goats in other age categories, no test was sensitive enough to detect goats infected with *Map*. In a *Map* infection control program, ELISA tests, preferably performed on goats between 2 and 3 years, can be used to define herd status and to estimate prevalence but, due to their low sensitivity, they cannot be used at goat level to select goats for culling. At goat

level, culling of ELISA-positive goats would not be suitable enough to remove all infected goats.

## Acknowledgements

We thank Idexx, Institut Pourquier and LSI for making available the ELISA kits. This study is a part of a PhD thesis conducted by PM and supervised by FB and XM from UMR INRA-Envn (BioEPAAR).

## References

- Antognoli, M.C., Hirst, H.L., Garry, F.B., Salman, M.D., 2007. Immune response to and faecal shedding of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in young dairy calves, and the association between test results in the calves and the infection status of their dams. *Zoonoses and Public Health* 54, 152–159.
- Branscum, A.J., Gardner, I.A., Johnson, W.O., 2005. Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modeling. *Preventive Veterinary Medicine* 68, 145–163.
- Clark Jr., D.L., Koziczowski, J.J., Radcliff, R.P., Carlson, R.A., Ellingson, J.L.E., 2008. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: comparing faecal culture versus serum Enzyme-linked Immunosorbent Assay and direct faecal polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science* 91, 2620–2627.
- Collins, M.T., Sockett, D.C., Ridge, S., Cox, J.C., 1991. Evaluation of a commercial Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Johne's disease. *Journal of Clinical Microbiology* 29, 272–276.
- Collins, M.T., Wells, S.J., Petrini, K.R., Collins, J.E., Schultz, R.D., Whitlock, R.H., 2005. Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 12, 685–692.
- Dendukuri, N., Hadgu, A., Wang, L., 2009. Modeling conditional dependence between diagnostic tests: a multiple latent variable model. *Statistics in Medicine* 28, 441–461.
- Dreier, S., Khol, J.L., Stein, B., Fuchs, K., Gutle, S., Baumgartner, W., 2006. Serological, bacteriological and molecular biological survey of paratuberculosis (Johne's disease) in Austrian cattle. *Journal of Veterinary Medicine B* 53, 477–481.
- Gardner, I.A., Stryhn, H., Lind, P., Collins, M.T., 2000. Conditional dependence between tests affects the diagnosis and surveillance of animal diseases. *Preventive Veterinary Medicine* 45, 107–122.
- Geisbauer, E., Khol, J.L., Wassertheurer, M., Damoser, J., Oesterreicher, E., Dunser, M., Revilla-Fernandez, S., Baumgartner, W., 2007. Longterm investigation in an Austrian dairy herd with low prevalence of paratuberculosis. Detection of antibodies in blood and milk. *Veterinary Quarterly* 29, 138–148.
- Hui, S.L., Walter, S.D., 1980. Estimating the error rates of diagnostic tests. *Biometrics* 36, 167–171.
- Institut de l'élevage, 2008. Résultats de contrôle laitier des espèces bovine et caprine (campagne 2007) (Results of national milk recording scheme for cattle and goats, year 2007), 107 pp.
- Kostoulas, P., Leontides, L., Enøe, C., Billinis, C., Florou, M., Sofia, M., 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.
- Landis, J.R., Koch, G.G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33, 159–174.
- Lilenbaum, W., Marassi, C.D., Oelemann, W.M.R., 2007. Paratuberculosis: an update. *Brazilian Journal of Microbiology* 38, 580–590.
- Malher, X., Beaudeau, F., Poupin, B., Falaise, G., Losdat, J., 1999. Réforme et renouvellement dans les grands troupeaux laitiers caprins de l'Ouest de la France. *INRA Productions Animales* 12, 123–133 (Culling and replacement in large dairy goats herds in western France).
- Malher, X., Seegers, H., Beaudeau, F., 2001. Culling and mortality in large dairy goat herds managed under intensive conditions in western France. *Livestock Production Science* 71, 75–86.
- Martinson, S.A., Hanna, P.E., Ikede, B.O., Lewis, J.P., Miller, L.M., Keefe, G.P., McKenna, S.L.B., 2008. Comparison of bacterial culture, histopathology and immunochemistry for the diagnosis of Johne's disease in culled dairy cows. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20, 51–57.
- McDonald, W.L., Ridge, S.E., Hope, A.F., Condron, R.J., 1999. Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in young cattle. *Australian Veterinary Journal* 77, 113–119.
- McKenna, S.L.B., Barkema, H.W., Keefe, G.P., Sockett, D.C., 2006. Agreement between three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle. *Veterinary Microbiology* 114, 285–291.

- Moss, M.T., Sanderson, J.D., Tizard, M.L.V., Hermon-Taylor, J., El-Zaatari, F.A.K., Markesich, D.C., Graham, D.Y., 1992. PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* in long term cultures from Crohn's disease and control tissues. *Gut* 33, 1209–1213.
- Munjal, S.K., Tripathi, B.N., Paliwal, O.P., Boehmer, J., Homuth, M., 2007. Application of different methods for the diagnosis of experimental paratuberculosis in goats. *Zoonoses and Public Health* 54, 140–146.
- Nielsen, S.S., Grønbaek, C., Agger, J.F., Houe, H., 2002. Maximum-likelihood estimation of sensitivity and specificity of ELISAs and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis. *Preventive Veterinary Medicine* 53, 191–204.
- Nielsen, S.S., Toft, N., 2008. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon- $\gamma$  assay and faecal culture techniques. *Veterinary Microbiology* 129, 217–235.
- OIE, 2004. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 1178 pp.
- Ott, S.L., Wells, S.J., Wagner, B.A., 1999. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Preventive Veterinary Medicine* 40, 179–192.
- Rosseels, V., Huygen, K., 2008. Vaccination against paratuberculosis. *Expert Review of Vaccines* 7, 817–832.
- Salgado, M., Manning, E.J.B., Collins, M.T., 2005. Performance of a Johne's disease Enzyme-Linked Immunosorbent Assay adapted for milk samples from goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 17, 350–354.
- Sherman, D.M., Markham, R.J.F., Bates, F., 1984. Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 185, 179–182.
- Sigurdardottir, O.G., Press, C.McL., Saxegaard, F., Evensen, O., 1999. Bacterial isolation, immunological response and histopathological lesions during the early subclinical phase of experimental infection of goat kids with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Pathology* 36, 542–550.
- Stabel, J.R., 2000. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology* 77, 465–473.
- Stehman, S.M., 1996. Paratuberculosis in small ruminants, deer and South American camelids. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 12, 441–455.
- Stewart, D.J., Vaughan, J.A., Stiles, P.L., Noske, P.J., Tizard, M.L.V., Prowse, S.J., Michalski, W.P., Butler, K.L., Jones, S.L., 2006. A long-term study in Angora goats experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: clinical disease, faecal culture and immunological studies. *Veterinary Microbiology* 113, 13–24.
- Storset, A.K., Hasvold, H.J., Valheim, M., Brun-Hansen, H., Berntsen, G., Whist, S.K., Djonne, B., Press, C.McL., Holstad, G., Larsen, H.J.S., 2001. Subclinical paratuberculosis in goats following experimental infection. An immunological and microbiological study. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 80, 271–287.
- Thomas, G.W., 1983. Paratuberculosis in a large goat herd. *Veterinary Record* 113, 464–466.
- Thrusfield, M., Ortega, C., de Blas, I., Noordhuizen, J.P., Frankena, K., 2001. WINEPISCOPE 2.0 improved epidemiological software for veterinary medicine. *Veterinary Record* 148, 567–572.
- Toft, N., Jørgensen, E., Højsgaard, S., 2005. Diagnosing diagnostic tests: evaluating the assumptions underlying the estimation of sensitivity and specificity in the absence of a gold standard. *Preventive Veterinary Medicine* 68, 19–33.
- van Roermund, H.J.W., Bakker, D., Willemsen, P.T.J., de Jong, M.C.M., 2007. Horizontal transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in an experimental setting: calves can transmit the infection to other calves. *Veterinary Microbiology* 122, 270–279.
- Yokomizo, Y., Yugi, H., Merkal, R.S., 1985. A method for avoiding false-positive reactions in an Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Japanese Journal of Veterinary Science* 47, 111–119.

VU :

**Le Directeur de Thèse**  
MALHER Xavier

VU :

**Le Responsable de l'Ecole Doctorale**

**VU pour autorisation de soutenance**

**Rennes, le**

**Le Président de l'Université de Rennes 1**

**Guy CATHELIN**

**VU après soutenance pour autorisation de publication**

**Le Président du jury,**

PIERRE Jean -Sébastien

## RESUME

L'objectif était de produire des connaissances épidémiologiques descriptives pour la conception ultérieure de plans de maîtrise de l'infection des caprins par *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Une enquête sérologique a permis de confirmer que l'infection par Map était très répandue dans les troupeaux caprins français, avec une prévalence vraie estimée à 63%. La détection des animaux infectés peut être réalisée par un test ELISA, dont la sensibilité et la spécificité ont été estimées à respectivement 53 et 100%. Mais les qualités des tests varient en fonction de l'âge des animaux et les meilleures valeurs ont été obtenues pour les tests ELISA sur des animaux de 2-3 ans. Pour la détection des animaux excréteurs, la PCR est le test le plus précoce (à partir de 8 mois). Comparé à la détection des animaux par PCR, le test de dosage de l'IFN $\gamma$  a une sensibilité estimée à 49% et le test ELISA a une sensibilité estimée à 29%. Les apports et limites des résultats produits sont discutés dans la perspective de l'élaboration ultérieure d'actions de maîtrise et des perspectives de recherche complémentaires sont avancées.

**Mots-clés :** chèvre, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, test, épidémiologie

## English title

Epidemiological bases for the control of caprine paratuberculosis

## SUMMARY

This study aimed at providing descriptive epidemiological knowledge about the infection of goats by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, in order to design control schemes. A serological study confirmed that Map infection was widespread in goat herds in France (true prevalence estimated to 63%). Detection of infected animals can be made by ELISA, with a sensitivity of 53% and a specificity of 100%. Best values for ELISA tests were obtained for goats aged 2-3 years. For detection of infectious animals, PCR was the earliest test (from 8 months of age). With PCR as reference test, sensitivities for IFN $\gamma$  test and ELISA test were estimated to 49 and 29%, respectively. Specificities for the 2 tests were estimated to 100%. Lastly, results are discussed in the perspective of the implementation of infection control schemes and further research topics are proposed.

**Key-words :** goat, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, test, epidemiology