

Enfin ! Une méthode applicable pour **diagnostiquer la paratuberculose** dans les troupeaux ovins

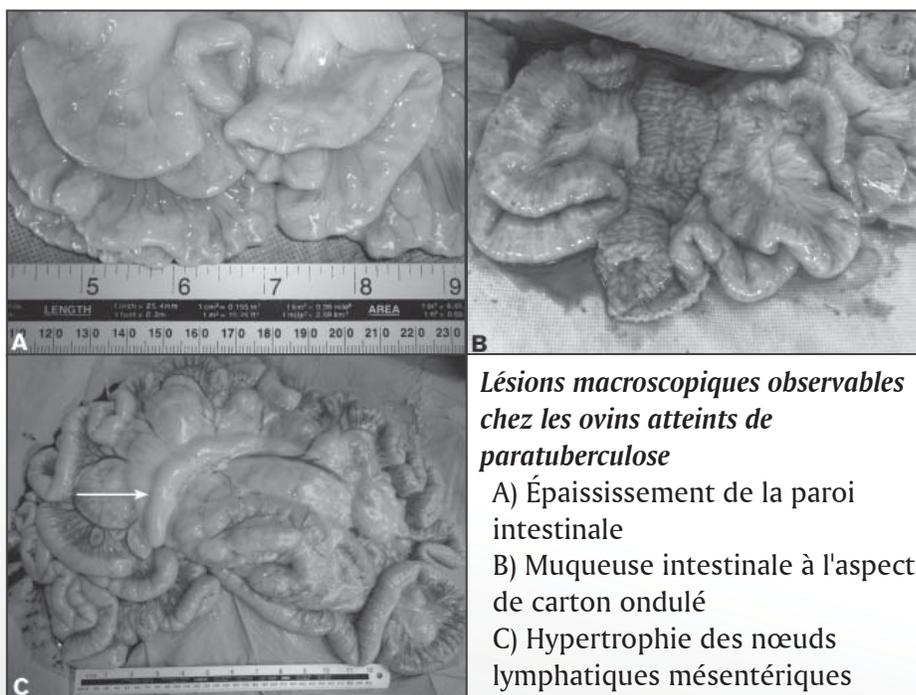
La paratuberculose est une maladie incurable affectant le système digestif des ruminants. Elle se développe lentement, amenant un dépérissement progressif, une perte de productivité et une réforme précoce. Elle est causée par la bactérie *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP). Si on connaît bien cette maladie du côté des bovins, il en va tout autrement chez les petits ruminants où la paratuberculose est une maladie méconnue et négligée, quoique bien présente. Une des causes de cette méconnaissance est l'absence de méthodes diagnostiques accessibles et suffisamment sensibles pour les ovins. Cet article présente la maladie en survol (cause, facteurs de risque, transmission, prévalence, impact et diagnostic) et les premiers résultats d'un projet qui a permis le développement d'un bon outil de diagnostic. Un deuxième article suivra dans quelque temps pour exposer comment cet outil peut être utilisé au profit du bien-être animal et de l'industrie.

La communauté scientifique suspecte que MAP pourrait également être impliquée dans la maladie de Crohn (MC), une maladie intestinale chronique affectant les humains. En effet, MAP a été isolée des intestins de plusieurs patients atteints de la MC, et les lésions intestinales de ces patients présentaient certaines similitudes avec les lésions présentes lors de paratuberculose.

Par contre, ces études ne permettent pas de conclure si MAP est une cause réelle du développement de la MC. La communauté scientifique demeure donc prudente et reconnaît qu'il existe une association entre MAP et MC sans que l'on parle d'une relation causale, tout en préconisant le principe de précaution.

La maladie chez l'animal

Suite à l'ingestion, MAP se localise dans la partie terminale du petit intestin (iléon) et les nœuds lymphatiques mésentériques. La bactérie s'y multiplie et provoque éventuellement une réponse immunitaire de l'animal (inflammation), qui se traduit par un épaississement de la paroi intestinale. Cet épaississement mène à une malabsorption des aliments et à un dépérissement progressif; en réalité, lors des stades plus avancés de la maladie, l'animal est en train de mourir de faim même s'il continue à manger normalement. Il devient très maigre malgré un appétit souvent normal et peut être léthargique. L'évolution est lente et la



Lésions macroscopiques observables chez les ovins atteints de paratuberculose

- A) Épaississement de la paroi intestinale
- B) Muqueuse intestinale à l'aspect de carton ondulé
- C) Hypertrophie des nœuds lymphatiques mésentériques

* Cette photo a initialement été publiée dans The Canadian Journal of Veterinary Research dans l'article Transabdominal ultrasonographic findings in goats with paratuberculosis par les auteurs suivants : M. Tharwat, F. Al-Sobayil, M. Hashad, S. Buczinski. Son utilisation dans le présent article de l'Ovin Québec est possible avec la permission de The Canadian Veterinary Medical Association. Son utilisation et sa reproduction sont interdites sans une nouvelle autorisation.



Avec l'autorisation de l'auteur, Mme Susan Schoenian.



d'une brebis, contaminer également ses agneaux.

Les agneaux de moins de 6 mois sont reconnus comme étant les plus susceptibles de contracter la maladie. En effet, la plupart des infections se produisent en tout jeune âge suivant l'ingestion du colostrum ou du lait d'une brebis infectée, ou encore

d'aliments ou d'eau contaminés par des matières fécales provenant d'un animal infecté. Les jeunes agneaux peuvent aussi contracter la maladie par la tétée de mamelles contaminées par des matières fécales. MAP est une bactérie particulièrement résistante, qui peut survivre dans l'environnement de la ferme ou dans les champs pendant plusieurs mois, ce qui facilite sa propagation et favorise sa persistance dans l'élevage. D'une façon générale, les animaux âgés de plus de 2 ans qui sont infectés depuis leurs premiers mois de vie sont ceux qui sont les plus susceptibles de présenter des signes cliniques et d'excréter MAP de façon massive. Les animaux en phase clinique (dépérissement chronique) représentent donc d'importants réservoirs infectieux pour leur descendance et pour l'ensemble du troupeau et devraient être réformés.

Comment MAP entre dans un troupeau ?

L'introduction de MAP dans un élevage se fait généralement à l'insu du propriétaire par l'achat d'un animal infecté, mais ne présentant pas encore les signes de la maladie (porteur sain). Cet animal peut cependant excréter la bactérie dans ses fèces et commencer à contaminer l'environnement de la ferme et, s'il s'agit

de la maladie est bien installée dans un troupeau, on peut schématiser sa présence par l'image d'un iceberg (figure 1). Comme dans le cas d'un iceberg, la plus grosse partie (les animaux infectés, mais sans signes cliniques dans ce cas) est invisible à première vue et seule une fraction des animaux infectés expriment des signes cliniques évidents de paratuberculose. La grande majorité des animaux infectés (les porteurs sains et ceux au début de l'expression clinique) passent inaperçus, bien que leur potentiel de contagiosité soit réel, surtout quand ils sont au début de l'expression clinique. Lorsqu'un cas de paratuberculose est confirmé dans un troupeau, il est donc fort probable que plusieurs autres animaux du troupeau soient également infectés et infectieux, même s'ils apparaissent en bonne santé. ▶ ▶ ▶

Lorsque MAP est installée dans un troupeau

Lorsque la maladie est bien installée dans un troupeau, on peut schématiser sa présence par l'image d'un iceberg (figure 1). Comme dans le cas d'un iceberg, la plus grosse partie (les animaux infectés, mais sans signes cliniques dans ce cas) est invisible à première vue et seule une fraction des animaux infectés expriment des signes cliniques évidents de paratuberculose. La grande majorité des animaux infectés (les porteurs sains et ceux au début de l'expression clinique) passent inaperçus, bien que leur potentiel de contagiosité soit réel, surtout quand ils sont au début de l'expression clinique. Lorsqu'un cas de paratuberculose est confirmé dans un troupeau, il est donc fort probable que plusieurs autres animaux du troupeau soient également infectés et infectieux, même s'ils apparaissent en bonne santé. ▶ ▶ ▶

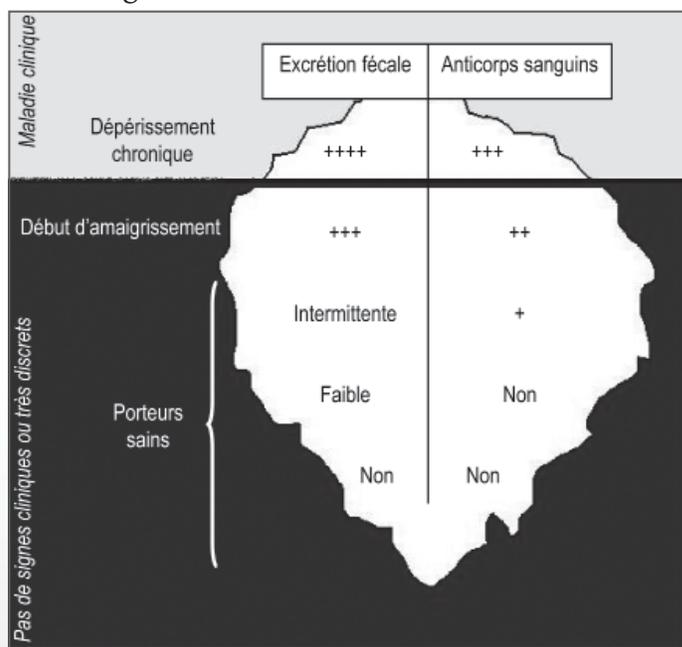


Figure 1. Répartition des animaux infectés en fonction du statut clinique et des possibilités diagnostiques



Les bovins, caprins et ovins peuvent-ils se transmettre MAP ?

Les espèces domestiques les plus fréquemment atteintes de paratuberculose sont les bovins, les ovins et les caprins. Les souches infectant les ovins sont généralement différentes de celles qui affectent les bovins et beaucoup plus difficiles à isoler en laboratoire, ce qui n'est rien pour aider le diagnostic. On les appelle les souches « S » pour *sheep*, alors que les souches normalement retrouvées chez les bovins sont les souches « C » pour *cattle*. Les ovins, caprins et bovins peuvent cependant s'échanger les souches « S » et « C » entre eux. Les chèvres peuvent être infectées par les souches « C » ou « S ». Plusieurs espèces sauvages, dont les cerfs et les lapins, peuvent également être porteuses de MAP et représenter des réservoirs potentiels d'infection pour les élevages.

La paratuberculose est-elle fréquente en élevage ovin ?

Étant donné la difficulté posée par le diagnostic d'une infection par MAP chez les animaux vivants, la prévalence de l'infection chez les ovins est inconnue au Québec et ailleurs en Amérique du Nord. On sait toutefois que l'infection par MAP est bien présente dans certains troupeaux québécois comme le démontrent nos travaux et certaines études moins récentes. Ainsi, dans une étude réalisée en 2001 dans 30 troupeaux ovins de l'Estrie et du Bas-Saint-Laurent (Arsenault et collaborateurs*) la paratuberculose s'est révélée

être la cause de mortalité la plus fréquente chez les animaux adultes. De plus, parmi 485 animaux de réforme échantillonnés en abattoir, près de 3 % avaient des lésions intestinales suggestives de la paratuberculose. Cependant, il est important de noter que la méthode diagnostique utilisée dans cette étude (histopathologie) est peu sensible et a probablement sous-estimé la prévalence réelle. Il est donc fort probable que l'infection soit répandue dans le cheptel québécois.

Impact économique négatif

L'impact économique négatif de la paratuberculose sur la productivité des élevages est de plus en plus reconnu chez les bovins, particulièrement pour les troupeaux fortement infectés. Des réformes précoces, des baisses de production laitière, une fertilité réduite, un risque accru de mammite, des retards de croissance et des mortalités élevées sont associés à la maladie. Cet impact est plus difficile à estimer en élevage ovin étant donné l'absence de tests diagnostiques efficaces et éprouvés, mais on peut émettre l'hypothèse que les pertes de productivité y sont aussi importantes. Selon certaines données, les troupeaux ovins infectés peuvent perdre jusqu'à 10 % de leurs animaux adultes à chaque année à cause de la paratuberculose.

Diagnostic

L'infection par MAP est difficile à diagnostiquer entre autres parce que la maladie progresse lentement et que les signes cliniques ne sont pas spéci-

fiques et ne deviennent visibles que tardivement. De plus, les animaux excrètent la bactérie en quantité variable et de façon intermittente, ce qui influence grandement la sensibilité des différents tests. Par ailleurs, la culture de la bactérie est particulièrement longue et fastidieuse, surtout pour les souches ovines (jusqu'à 8 mois en culture).

En simplifiant, deux approches diagnostiques sont disponibles :

- ✓ la détection de la bactérie ou de son ADN à partir d'un échantillon de selles ou de tissus (histopathologie, culture, PCR) ;
- ✓ la détection d'anticorps (sérologie) par diverses techniques (ELISA, fixation du complément, ...).

Les tests disponibles jusqu'à maintenant pour le diagnostic des infections à MAP sont peu sensibles, surtout en ce qui concerne les animaux qui ne présentent pas encore de signes cliniques (en début d'infection). Les porteurs sains, qui sont les plus nombreux dans un élevage, n'excrètent pas ou peu de MAP et n'ont souvent pas commencé à produire des anticorps détectables. Les procédures diagnostiques disponibles avant le présent projet sont donc inadéquates pour détecter ces animaux. Aux stades plus avancés, à mesure que les signes cliniques progressent et que l'excrétion de la bactérie devient fréquente, le dépistage devient plus performant (voir **figure 1**).

* Arsenault, J., Girard, C., Dubreuil, P., Daignault, D., Galarneau, J. R., Boisclair, J., Simard, C. & Belanger, D. (2003). Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. *Prev Vet Med* 59, 67-81.



Le projet

Le projet avait pour but principal de développer un test diagnostique moléculaire appelé PCR afin de détecter la présence de MAP dans les matières fécales des ovins. La PCR pourra ensuite servir de pilier pour identifier les troupeaux hébergeant la bactérie causant la paratuberculose et élaborer des stratégies de contrôle de l'infection, mais aussi contribuer aux connaissances présentement fragmentaires concernant MAP en troupeaux ovins. Accessoirement, une épreuve ELISA qui permet la détection des anticorps contre MAP chez les animaux infectés a aussi été évaluée.

Méthodologie | La PCR détecte et identifie hors de tout doute l'ADN de la bactérie (l'ADN de la bactérie lui est unique, un peu comme les empreintes digitales pour chaque humain).

L'évaluation de la PCR s'est faite uniquement chez des animaux de 2 ans et plus étant donné qu'ils sont plus à risque d'excréter la bactérie dans un troupeau infecté.

Le projet s'est déroulé en deux phases.

PHASE 1 | Elle avait pour but d'identifier des troupeaux infectés et de développer les techniques de laboratoire pour la culture, la PCR et l'ELISA. Vingt-trois (23) animaux de réforme provenant de 8 troupeaux fortement suspectés d'être infectés par MAP ont été inclus dans l'étude. Les animaux choisis étaient ceux qui présentaient un amaigrissement marqué et étaient donc les plus susceptibles d'être atteints de paratuberculose. La paratuberculose fut confirmée dans 6 de ces 8 troupeaux. Toutes les analyses ont été réalisées au laboratoire de l'Agence canadienne d'inspection des aliments situé à St-Hyacinthe.

PHASE 2 | Quatre-vingts (80) brebis de réforme âgées entre 2 et 9 ans et provenant des 6 troupeaux positifs issus de la phase 1 et d'un troupeau présumé indemne ont été échantillonnées. Les échantillons ont été récoltés à l'abattoir et envoyés à la

Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal où les prélèvements de tissus intestinaux et de matière fécale furent réalisés. Ces animaux forment la base qui a permis l'évaluation de la PCR et d'un ELISA commercial, ce qu'on appelle la validation d'un test.

Comment valider un test ?

Afin de vérifier si la PCR développée peut être utilisée avec confiance dans les troupeaux ovins, on doit la comparer avec une méthode de référence (évaluation des performances

du test). Cette comparaison nous permet d'établir la sensibilité et la spécificité des tests. Dans le cas de notre étude, la culture des fèces et des tissus (**figure 2**) est la méthode de référence à laquelle la PCR et l'ELISA ont été comparés.

La sensibilité de la PCR (ou de l'ELISA) est estimée en calculant la proportion de brebis qui auront une PCR (ou un ELISA) positive parmi toutes celles considérées comme infectieuses ou positives avec la culture. La spécificité est ensuite estimée en calculant la proportion de brebis ayant une réaction négative à la PCR (ou à l'ELISA) parmi toutes celles considérées comme non-infectieuses ou négatives avec la méthode de référence (absence de croissance de MAP sur les milieux de culture ou de lésions spécifiques à la paratuberculose dans les tissus étudiés).

Ultimement, on cherche un test qui détecte un fort pourcentage des animaux infectés sans faussement déclarer positifs des animaux non infectés. ▶ ▶ ▶

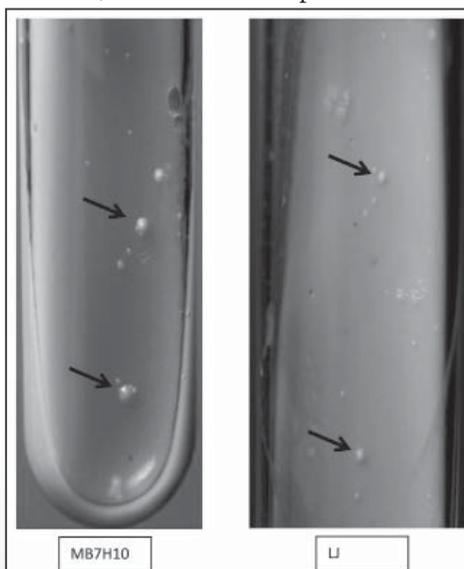


Figure 2. Colonies typiques de MAP sur milieu MB7H10 et LJ



Principaux résultats

Selon les résultats de la culture, 45 brebis étaient infectieuses pour MAP et 32 étaient non infectieuses (3 brebis ont été éliminées des analyses). Cette population a servi de base pour l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité des tests PCR et ELISA. Comme le montre le **tableau 1**, la PCR s'est montrée sensible (84 % des animaux « infectieux » ont été détectés par le test) et spécifique (93 % des animaux « non-infectieux » étaient négatifs à la PCR). L'ELISA quant à lui s'est montré très peu sensible (13 % seulement des animaux « infectieux » ont été détectés), mais très spécifique (100 % des animaux « non-infectieux » ont reçu un résultat négatif au test ELISA). L'utilisation de l'ELISA seul est donc fortement déconseillée chez les ovins étant donné sa très faible sensibilité.

Chez les animaux âgés de 2 ans et plus destinés à la réforme, la nouvelle PCR développée peut détecter 84 % des animaux infectieux pour MAP alors que l'ELISA ne peut en détecter que 13 %. Entre les 2, si un seul test est utilisé, le choix est assez simple.

Conclusion et pistes futures

Le projet a permis le développement d'un test PCR remarquablement sensible et spécifique.

Bien que la sensibilité ne soit pas parfaite, les résultats sont tout à fait acceptables (compte tenu des caractéristiques propres à la paratuberculose) et rendent envisageable l'utilisation de cet outil dans le futur. La PCR développée pourrait ainsi servir à déterminer la présence de MAP à l'intérieur d'un troupeau en ciblant les animaux âgés, maigres ou

destinés à la réforme (par exemple, avant leur envoi à l'abattoir). De plus, maintenant que cet outil est validé, une étude de la prévalence de paratuberculose dans les troupeaux ovins québécois devient possible. Une telle étude permettrait d'estimer l'ampleur du problème à l'échelle provinciale pour ensuite favoriser la mise en place de stratégies de contrôle individuelles et collectives.

Par ailleurs, afin d'optimiser l'utilisation de cette PCR par les producteurs et leurs médecins vétérinaires praticiens, différents scénarios diagnostiques doivent maintenant être élaborés à partir des valeurs de sensibilité et de spécificité estimées. Ces scénarios visent à préciser le nombre et la catégorie d'animaux (stratégie d'échantillonnage) qu'il est nécessaire de tester pour déterminer avec un maximum de certitude le statut d'un troupeau face à la paratuberculose.

Des résultats plus détaillés ainsi que les pistes et façons d'utiliser le test seront abordés lors d'une prochaine parution de l'*Ovin Québec*. 

Tableau 1. Sensibilité et spécificité de la PCR et de l'ELISA donnant un statut infectieux pour MAP chez des brebis de réforme.

	Sensibilité	Spécificité
Test évalué	Estimation	Estimation
PCR	84,4	92,6
ELISA	13,3	100,0



Une partie du financement de ce projet a été assurée par Agriculture et Agroalimentaire Canada, par l'entremise du Programme canadien d'adaptation agricole (PCAA). Au Québec, la part destinée au secteur de la production agricole est gérée par le Conseil pour le développement de l'agriculture du Québec.



Agriculture et Agroalimentaire Canada

Agriculture and Agri-Food Canada



Agence canadienne d'inspection des aliments

Canadian Food Inspection Agency



Remerciements. Une partie du financement de ce projet a été fournie par l'entremise des conseils sectoriels du Québec et de l'Ontario qui exécutent le Programme canadien d'adaptation agricole (PCAA) pour le compte d'Agriculture et Agroalimentaire Canada. Nous tenons à remercier les personnes suivantes qui ont été essentielles à la réalisation du projet :

Dr. Jagdip Singh Sohal (maintenant à Amity University, Inde), Dr. Pierre Hélie (FMV), Dr. Yves Robinson (ACIA), Dre Virginie Lachapelle (FMV), M. Mourad Ouardani (ACIA), Dre Fatima Belayat (ACIA), les gens du CEPOQ, le personnel d'inspection et les employés de l'abattoir Lafrance à Grand-Mère sans oublier les producteurs ayant participé au projet et leurs médecins vétérinaires praticiens.

