



La paratuberculose est une maladie due à *Mycobacterium avium paratuberculosis* (Map). Elle affecte les ruminants domestiques et sauvages et se traduit chez les caprins par un amaigrissement chronique apparaissant généralement sur des animaux de plus de 2 ans (cf fiche L'égide n° 17, décembre 1999).

Un amaigrissement sans fièvre et avec un appétit conservé évoque une suspicion de paratuberculose qu'il convient de confirmer. Différents tests, utilisables soit au niveau individuel, soit au niveau du troupeau, sont disponibles.

MISE EN ÉVIDENCE DE LA BACTÉRIE

Les prélèvements utilisables sont les crottes et le lait sur les animaux vivants, les organes (intestin et ganglions mésentériques) sur les animaux morts.

Bactérioscopie

Il s'agit de colorer les bactéries présentes dans les prélèvements (coloration de Ziehl-Neelsen) et de les observer au microscope : les bacilles regroupés en amas apparaissent roses sur un fond bleu. C'est un test bon marché (8 à 12 €) et rapide, mais la sensibilité et la spécificité sont très variables selon le stade clinique; elles sont très mauvaises au stade préclinique (où l'excrétion fécale est intermittente) puis s'améliorent lorsqu'on approche de la phase terminale (il y a plus de bactéries).

Culture

Les prélèvements sont mis en culture sur un milieu spécifique jusqu'à l'apparition de colonies visibles. Des lectures sont faites à 4, 8, 12 et 18 semaines.

Variantes

La culture radiométrique nécessite un milieu de culture spécifique contenant des éléments radioactifs et on mesure le CO₂ radioactif émis. La sensibilité de la technique est meilleure, la détection du bacille est plus précoce (2 à 6 semaines). Cependant il convient d'identifier systématiquement la bactérie par PCR ou par culture. De plus, la présence d'un élément radioactif est très contraignante pour une utilisation de ce test en routine.

Avantages

La culture est considérée comme la technique de référence en raison d'une spécificité élevée. Cette technique permet de détecter les animaux excréteurs. Le résultat peut être exprimé de façon qualitative (positif/négatif) ou semi-quantitative en précisant le délai d'apparition des souches et le

nombre de colonies ; on peut ainsi définir les animaux excréteurs beaucoup et les réformer en priorité.

Inconvénients

L'excrétion fécale est intermittente. De plus, le niveau d'excrétion doit être de 10² germes/g pour que des colonies apparaissent. Cette technique n'est donc pas très sensible. Map est un germe à croissance lente ; le résultat de la culture n'est donc disponible que 4 à 6 mois après le début de la culture. Cette méthode reste chère (20 € TTC environ par prélèvement).

PCR

Il s'agit de repérer un fragment d'ADN, l'IS900, présent en nombreux exemplaires chez Map. Il existe des variantes telles que la PCR en temps réel, la PCR nichée et la PCR immunomagnétique.

Avantages

Ces techniques permettent une identification rapide (délai inférieur ou égal à 3 jours). On peut analyser des échantillons même s'ils sont contaminés par d'autres bactéries ou par des champignons. Elle permet également la confirmation du diagnostic en cas de résultat douteux suite à l'utilisation d'une autre méthode.

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%.

Inconvénients

La présence d'inhibiteurs a été évoquée. Cette technique détecte aussi les bactéries mortes ce qui engendre quelques faux-positifs.

Cette technique nécessite un équipement spécifique et du personnel qualifié. Le traite-

ment de grandes quantités d'échantillons est complexe.

Des réactions faussement positives ont parfois lieu lors de contamination des échantillons par des produits d'amplification provenant des tests précédents notamment si le matériel est souillé.

Le coût d'une PCR classique est de 30 à 45 € par prélèvement environ.

MISE EN ÉVIDENCE DES RÉACTIONS IMMUNITAIRES CELLULAIRES

Il s'agit de mettre en évidence les réactions immunitaires à médiation cellulaire qui apparaissent suite au contact avec la bactérie. Ces réactions sont considérées comme précoces.

Intradermotuberculation (sur animal vivant)

Il s'agit de l'injection intradermique d'un antigène. Le résultat est donné par une mesure de la réaction locale après 3 jours.

Il existe 2 modalités :

L'intradermoréaction simple (IDR) :

L'injection d'un antigène spécifique, extrait de Map, la Johnine (PPDj), est réalisée dans le derme, soit au niveau de l'encolure, soit au niveau du pli sous-caudal, soit au niveau du pli palpébral. La réaction se traduit par un épaissement au point d'injection. L'épaisseur de la peau au point d'injection est mesurée avec un cutimètre à J0 et à J+72h et on compare ces 2 valeurs. Si l'écart est supérieur à 4mm le résultat est positif.

L'intradermoréaction comparative (IDC) :

On injecte les 2 antigènes non spécifiques de Map (issus de *M. bovis*, PPD_b et de *M. avium*, PPD_a) chacun sur une face de l'encolure. Le pli de peau est mesuré au niveau des sites d'injection préalablement tondus, avant l'injection et 72 h après.

Avantages

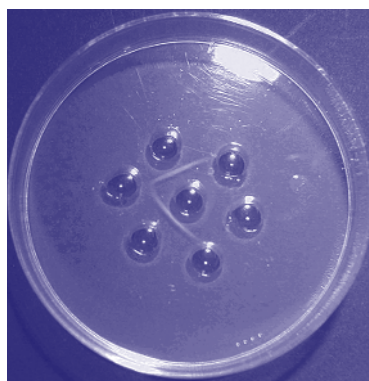
Elle est très bon marché.

Inconvénients

La finesse de la peau des caprins rend l'injection délicate.

Il faut faire une contention des animaux 2 fois à 72h d'intervalle.

Il n'y a pas de PPDj, antigène issu de Map, commercialisé en France ce qui oblige à



Test AGID (Photo AFSSA LERC, Niort)

recourir à l'intradermoréaction comparative au lieu de ne faire qu'une injection de PPDj.

En cas de réaction fortement positive, un nodule volumineux se développe ce qui peut gêner l'animal pour entrer dans les cornadis. Cependant l'injection intra palébrale est très délicate, l'injection sur la face du thorax nécessite une contention plus sévère et le site d'injection au niveau du pli sous-caudal est souvent contaminé par les fèces.

Certains animaux réagissent au bout de 96h et sont donc considérés comme négatifs à 72h. De plus, l'injection d'antigène provoque une sensibilisation des animaux. Il faut attendre 60 jours pour renouveler ce test.

Spécificité

Au stade de la maladie clinique, la réaction cellulaire diminue et peut aller jusqu'à l'anergie donc il y a des faux-négatifs. Une réaction positive à PPDa indique un contact avec une mycobactérie du groupe avium mais n'est en aucun cas spécifique de Map.

Il existe également des faux-positifs chez les animaux vaccinés.

Dosage de l'interféron gamma (à partir d'un prélèvement de sang)

Il s'agit d'un test réalisé au laboratoire qui exploite la mémoire immunitaire des lymphocytes. Les lymphocytes présents dans un échantillon de sang de l'individu à tester sont stimulés avec un antigène. Si les cellules ont déjà été en contact avec cet antigène, elles produisent de l'interféron gamma. L'interféron produit est dosé à l'aide d'une technique ELISA. Les réponses obtenues par la stimulation sont comparées avec celle obtenue avec un antigène neutre.

Avantages

La sensibilité est bonne, elle varie de 72% à 100% en fonction du stade de la maladie.

De plus, d'un point de vue pratique, une seule prise de sang est nécessaire et il n'y a pas de sensibilisation.

Inconvénients

Le coût. Il est estimé à environ 10€ par animal. Les antigènes (PPDj) sont difficiles à se procurer.

Il existe des réactions croisées avec d'autres mycobactéries environnementales (faux-positifs).

Ce phénomène se traduit par de fortes variations de la spécificité, de 60 à 100%.

Aspect pratique : il faut stimuler les échantillons au laboratoire dans les 6 à 8 h suivant le prélèvement ce qui limite l'utilisation de cette technique sur le terrain.

Prolifération lymphocytaire (à partir d'un prélèvement de sang)

Principe

Les lymphocytes T, suite au contact avec l'antigène, induisent une hypersensibilité de type IV. Lors d'un second contact avec l'antigène, les LT mémoires prolifèrent, entraînant la synthèse de protéines et d'ADN. On place dans le milieu de culture un nucléotide radioactif entrant dans la composition de l'ADN. On mesure la radioactivité de l'échantillon avec un compteur à scintillation liquide. On compare le résultat obtenu avec celui d'un échantillon de contrôle, n'ayant pas été stimulé par des antigènes.

Inconvénients

Ce test est exclusivement réservé à la recherche ; aucun kit commercial n'est disponible. De plus, l'emploi de réactifs radioactifs est très contraignant pour une utilisation en routine.

MISE EN ÉVIDENCE DES RÉACTIONS IMMUNITAIRES HUMORALES (PRÉLÈVEMENT DE SANG)

Il s'agit de tests sérologiques ayant pour but de mettre en évidence des anticorps. Ces réactions sont considérées comme tardives.

Le test d'immuno-diffusion sur gel d'agarose (AGID)

Les anticorps anti-Map et les antigènes sont déposés en 2 points différents de gélose. Ils diffusent et lorsqu'ils se rencontrent, le complexe antigènes-anticorps forme un arc de précipité (photo).

Avantages

Le coût est faible, sa réalisation simple et la spécificité est bonne, même si le seul antigène commercialisé est dérivé de *M. avium* (PPA-3).

Inconvénients

Cette technique est moins sensible que l'ELISA et ne permet le diagnostic qu'à partir du début du stade clinique.

ELISA

Il existe plusieurs kits commerciaux utilisant cette technique. Certains kits prévoient une étape préalable de neutralisation des sérums. Les sérums à tester sont mélangés avec une suspension de *Mycobacterium phlei*, ce qui permet d'éliminer les anticorps non spécifiques de Map.

Avantages

Cette technique est pratiquée dans de nombreux laboratoires. Elle est rapide à réaliser, automatisable et bon marché. Sa spécificité atteint les 99-100%.

Inconvénients

Les animaux dont la séroconversion est récente ou qui ont été infectés *in utero* donnent des résultats négatifs. Sa sensibilité est faible (environ 50%) et varie suivant le stade clinique.

Le tableau ci-dessous récapitule les différentes utilisations des tests.

Contexte	Test	Commentaire
Confirmation d'un cas CLINIQUE	ELISA, AGID, coproscopie	Rapide, facile, bon marché
Confirmation d'un 1er test diagnostique positif	PCR coproculture	Rapide, fiable Long mais fiable
Estimation de la prévalence de la maladie dans le troupeau	ELISA	Rapide, facile, bon marché
Estimation de l'efficacité d'un plan d'assainissement	ELISA Coproscopie tous les 6 mois	Rapide, facile, bon marché Fiable si répété, semi-quantitatif
Contrôle des animaux destinés au renouvellement du cheptel (chèvres, boucs)	Interféron gamma	Précoce
Contrôle à l'introduction d'un nouvel animal	ELISA + AGID ELISA + PCR	Rapide, facile, bon marché Fiable, rapide mais cher
Contrôle avant l'export	IDG, ELISA PCR si urgent	Rapidité

