

## **Sensibilité et spécificité à l'échelle des troupeaux des stratégies de dépistage de la paratuberculose ovine basées sur l'analyse de mélanges de fèces ou de sérums**

MATHEVON Y. (1), FOUCRAS G. (1,2), FALGUIERES R. (3), CORBIERE F. (1,2)

(1) INRA-ENVT, UMR 1225 IHAP, 31076 Toulouse, France

(2) ENVT, 23 chemin des Capelles, 31076 Toulouse, France

(3) CAPEL Ovilot, 237 avenue Pierre Semard, 46000 Cahors, France

### **RESUME**

L'objectif de ce travail était d'évaluer la sensibilité et spécificité à l'échelle des troupeaux de différentes stratégies de dépistage de la paratuberculose ovine basées sur l'analyse de mélanges de fèces ou de sérums. Nous avons premièrement évalué en laboratoire les performances relatives de la sérologie ELISA et de la qPCR réalisées sur des mélanges de 5 ou 10 échantillons de sérums ou de fèces. Les résultats indiquent que la qPCR permet de détecter systématiquement les animaux fort excréteurs de *Map* et de manière satisfaisante (68% à 89%) les animaux faibles excréteurs. Après adaptation des seuils d'interprétation, l'utilisation de la sérologie ELISA sur des mélanges de 5 ou 10 échantillons de sérums était associée à une sensibilité diagnostique relative comprise entre 62% et 100% en fonction de la composition des mélanges. Ces résultats, ainsi que les distributions des valeurs individuelles S/P (sérologie ELISA) et de Ct (qPCR sur fèces) obtenues dans 17 élevages ovins allaitants du Lot, infectés (n=14, 1097 brebis), et non infectés (n=3, 387 brebis) ont servi de base à un travail de simulation visant à évaluer les performances épidémiologiques à l'échelle des troupeaux de stratégies de dépistage basées sur des analyses de mélanges. Les résultats obtenus conduisent à ne pas recommander l'utilisation de la sérologie ELISA appliquée à des mélanges en raison d'un défaut majeur de spécificité, lié à une spécificité non parfaite à l'échelle individuelle. L'utilisation de la qPCR sur des mélanges de fèces semble plus prometteuse pour identifier de manière spécifique les troupeaux infectés, mais nécessiterait un nombre élevé d'animaux prélevés (plus de 100) pour permettre la détection dans plus de 90% des cas, des élevages à prévalence d'infection inférieure à 5% ou pour établir un statut « indemne de paratuberculose ».

### **Flock sensitivity and specificity of pooled fecal qPCR and pooled serum ELISA for screening ovine paratuberculosis**

MATHEVON Y. (1), FOUCRAS G. (1,2), FALGUIERES R. (3), CORBIERE F. (1,2)

(1) INRA-ENVT, UMR 1225 IHAP, 31076 Toulouse, France

(2) ENVT, 23 chemin des Capelles, 31076 Toulouse, France

(3) CAPEL Ovilot, 237 avenue Pierre Semard, 46000 Cahors, France

### **SUMMARY**

This study aimed at assessing the flock sensitivity and specificity of ovine paratuberculosis screening strategies based on pooled fecal or serum samples. The relative performances of serum ELISA and fecal qPCR were first evaluated for pools of 5 or 10 samples. Results indicate that qPCR consistently detects high shedder sheep and satisfactorily (68% to 89%) low shedder ones. When modifying the cut-off threshold, the relative sensitivity of pooled serum ELISA was estimated between 62% and 100% depending on the composition of the pools. These results, as well as the distributions of the individual S/P values (serum ELISA) and Ct values (qPCR on feces) obtained in 14 infected (1097 ewes), and 3 uninfected (387 ewes) meat sheep flocks sampled in Lot, France, were used as a basis for a simulation study that aimed at evaluating the flock-level epidemiological performances of screening strategies based on pooled sample analysis. Our results lead us not to recommend the use of pooled serum ELISA at a large scale because of its lack of specificity (linked to a non-perfect specificity at the individual level). The use of pooled fecal qPCR seems more promising in order to specifically identify infected herds, but would require a large number of tested animals (more than 100) to allow the detection of flocks with infection prevalence lower than 5% with a high confidence level (>90%) or to establish a 'free from paratuberculosis' status.

## INTRODUCTION

La paratuberculose est une maladie contagieuse des ruminants due à *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (*Map*) et à l'origine de pertes économiques importantes. Les valeurs informatives des tests diagnostiques ante-mortem limitent l'efficacité des plans de dépistage et de maîtrise basés sur la seule identification et élimination des animaux détectés positifs. Dans les troupeaux ovins, les grands effectifs et la faible valeur économique des animaux limitent par ailleurs l'utilisation de tests individuels de dépistage. Il apparaît donc important de développer des approches diagnostiques à l'échelle collective à moindre coût, permettant d'évaluer la situation sanitaire globale des troupeaux voire de préciser la prévalence intra-troupeau de l'infection. Dans cette étude nous avons évalué la possibilité d'utiliser la sérologie ELISA ou la qPCR sur fèces sur des mélanges d'échantillons, afin de définir à moindre coût le statut des troupeaux ovins vis à vis de la paratuberculose.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1 ELEVAGES, ANIMAUX ET PRELEVEMENTS BIOLOGIQUES

Les échantillons biologiques ont été recueillis lors d'une étude transversale dans 17 élevages ovins allaitants du Lot dont 14, en race Causse du Lot, étaient infectés par la paratuberculose et 3, en race Lacaune, étaient considérés comme indemnes. Des échantillons individuels de sang et de fèces ont été prélevés sur 1584 brebis (1197 dans les élevages infectés et 387 dans les élevages indemnes) âgées de 2 à 3 ans, selon le protocole déjà décrit (Mathevon *et al.*, 2017).

### 1.2 ANALYSES ECHANTILLONS INDIVIDUELS ET DES MELANGES

Nous avons fait l'hypothèse que les performances relatives des analyses de mélanges de sérums ou de fèces étaient influencées par la taille des mélanges et par le niveau de réponse des échantillons individuels composant ces mélanges, autrement dit que l'effet de dilution était d'autant moins marqué que les échantillons individuels avaient une réponse fortement positive (brebis forte excrétrice de *Map* dans les fèces, c'est-à-dire avec un Ct faible en qPCR, ou sérum fortement positif en sérologie, c'est-à-dire avec une valeur S/P élevée).

#### 1.2.1 Sérologie ELISA : analyses des échantillons individuels et des mélanges de sérums

Les analyses sérologiques des échantillons individuels et des mélanges de sérums ont été réalisées à l'UMR 1225 IHAP (trousse Idexx Paratuberculosis screening®, Montpellier, France). Pour les échantillons individuels, la limite de non-négativité est fixée, par le fabricant, à une valeur S/P supérieure ou égale à 45%. Pour la réalisation des mélanges, trois classes de sérums ont été définies selon leurs valeurs S/P individuelles : négatif (S/P < 45 %), positif faible (45 % ≤ S/P < 90%) et positif fort (S/P > 90%). Les mélanges ont été constitués en duplicata à partir de 20 µL de chaque sérum individuel. Des échantillons à valeur S/P très faible (<22.5%) ont servi de diluant négatif quand nécessaire. Des mélanges de 5 ou 10 échantillons, contenant exclusivement des échantillons négatifs, 1 ou 2 échantillons positifs faibles ou 1 échantillon positif fort ont été constitués pour chaque élevage et analysés avec la même trousse de sérologie. Au total 181 mélanges de taille 5 et autant de mélanges de taille 10 ont été constitués et analysés.

#### 1.2.2 qPCR sur fèces : analyse des échantillons individuels et des mélanges de fèces

Les analyses des échantillons individuels ont été réalisées à partir d'une prise de 10 g de fèces. Les mélanges de fèces de taille 5 ou 10 ont été constitués à partir de 10 grammes de

fèces individuelles, chaque mélange contenant un échantillon considéré comme faiblement positif (Ct individuel >30) ou un échantillon considéré comme fortement positif (Ct <28), complété par des fèces négatives issues d'un troupeau indemne de paratuberculose (troupeau ovin Lacaune, INRA La Fage, France). Au total, 195 mélanges de taille 5 et 210 mélanges de taille 10 ont été constitués et analysés.

Après une phase de concentration des fèces (kit Adiafilter, BioX, Rochefort, Belgique), de broyage et d'extraction d'ADN (automate Kingfisher Flex, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France et Kit NucleoMag 96 tissue Macherey-Nagel, Hoerdt, France), l'amplification de la cible IS900 a fait appel au kit Adiavet ParaTB Realtime® (BioX, Rochefort, Belgique) sur un LightCycler 480 (Roche, Life Science, Meylan, France). Les courbes d'amplification ont été analysées avec le package qpcR pour le logiciel R, avec un seuil de positivité fixé à 42 cycles de PCR.

#### 1.2.3 Sensibilité et spécificité relative des analyses de mélanges d'échantillons

Pour la sérologie ELISA et la qPCR sur fèces, les sensibilités relatives des analyses de mélanges ( $MS_{eELISA}$ ,  $MS_{ePCR}$ ) ont été définies par le nombre de mélanges donnant une réponse positive au seuil de décision fixé, divisé par le nombre total de mélanges contenant au moins un échantillon individuel positif. De même, la spécificité relative de l'ELISA a été définie par le nombre de mélanges donnant une réponse négative, divisé par le nombre total de mélanges ne contenant que des échantillons négatifs. Différents seuils de décision ont été évalués et le seuil retenu était celui permettant de maximiser la sensibilité relative, tout en assurant une spécificité relative de 100%.

Sur la base de l'analyse de 40 mélanges de fèces négatif, la spécificité relative de la qPCR ( $MS_{pPCR}$ ) a été considérée comme parfaite et fixée à 100%.

### 1.3 ETUDE PAR SIMULATION

Un travail de simulation a été réalisé afin d'évaluer les performances épidémiologiques à l'échelle des troupeaux de différentes stratégies de dépistage basées sur des analyses de mélanges de sérums ou de fèces. Des dépistages réalisés en troupeaux indemnes ont aussi été simulés afin d'évaluer la spécificité des différentes stratégies envisagées à l'échelle des troupeaux.

Les simulations ont été réalisées pour des prévalences d'infection variant de 0% à 30%, pour un nombre d'animaux prélevés compris entre 50 et la totalité de l'effectif présent (soit 300 animaux), et pour des mélanges aléatoires de 5 ou 10 échantillons. Les distributions marginales des valeurs S/P et de Ct observées dans les 14 élevages infectés et les 3 élevages indemnes investigués ont servi pour définir les paramètres des distributions Beta permettant de simuler le niveau de réponse individuelle (positif faible ou fort). Pour les élevages infectés, la sensibilité et la spécificité de la sérologie ELISA individuelle (respectivement  $IS_{eELISA}$  et  $IS_{pELISA}$ ) et de la qPCR individuelle sur fèces (respectivement  $Se_{PCR}$  et  $Sp_{PCR}$ ) ont été modélisées par des lois Beta, ajustées aux estimateurs bayésiens obtenus sur les mêmes échantillons et publiées par Mathevon *et al.* (2017) :  $IS_{eELISA} = 17.4\%$  [IC95% : 10.8-26.6] ;  $IS_{pELISA} = 94.0\%$  [IC95% : 91.8 – 95.6] ;  $IS_{ePCR} = 47.5\%$  [IC95% : 26.2 – 69.9] et  $IS_{pPCR} = 99.0\%$  [IC95% : 97.6-99.6]. Pour les élevages indemnes la spécificité de la sérologie ELISA a aussi été modélisée par une loi Beta, dont les paramètres ont été dérivés des observations réalisées dans les 3 troupeaux non infectés de la présente étude :  $IS_{pELISA} = 99.0\%$  [IC95% : 96.6 – 99.7] (cf infra). Pour la qPCR, la spécificité en élevage indemne a été considérée comme parfaite, sur la base d'arguments biologiques en faveur d'une très grande spécificité des amorces actuelles vis-à-vis de *Map* (Plain *et al.*, 2014) et de l'absence de résultat positif chez tous les animaux sains testés (cf. infra). Enfin les sensibilités et spécificités relatives des analyses de mélanges d'échantillons ont été modélisées

par des lois Béta dont les paramètres ont été dérivés des résultats de laboratoire de la présente étude.

Pour chaque combinaison de prévalence d'infection, 1000 élevages de 300 animaux ont été simulés, chaque élevage étant soumis 1000 fois à chacune des 6 stratégies de dépistage : stratégie A : 10 mélanges de 5 échantillons ; stratégie B : 5 mélanges de 10 échantillons ; stratégie C : 20 mélanges de 5 échantillons ; stratégie D : 10 mélanges de 10 échantillons ; stratégie E : 60 mélanges de 5 échantillons et stratégie F : 30 mélanges de 10 échantillons. Un élevage était considéré comme détecté dès lors qu'au moins un mélange donnait un résultat positif. La sensibilité de détection à l'échelle des élevages ( $F_{Se_{ELISA}}$  et  $F_{Se_{PCR}}$ ) a été calculée pour chacune des prévalences d'infection simulées. La spécificité de la sérologie ELISA appliquée à des mélanges de sérums ( $F_{Sp_{ELISA}}$ ) a été calculée comme 100 - le pourcentage d'élevages indemnes détectés. Par construction, la spécificité à l'échelle des élevages de la qPCR sur des mélanges de fèces ( $F_{Sp_{PCR}}$ ) était de 100%. Le nombre de mélanges positifs était par ailleurs enregistré pour chaque élevage et chaque stratégie de dépistage simulée afin de mettre en relation le nombre de mélanges positifs et la prévalence d'infection.

## 2. PRINCIPAUX RESULTATS

### 2.1 SEROLOGIES ELISA ET qPCR SUR FECES : ANALYSES INDIVIDUELLES

Sur les 1197 animaux prélevés dans les 14 élevages infectés dans le cadre de l'étude transversale, 105 (8.78%) étaient positifs en qPCR sur fèces, avec une très faible minorité (5.7%) d'animaux fortement excréteurs ( $Ct < 28$ ) (tableau 1). En sérologie ELISA, 93 ovins (7.8%) avaient un résultat non-négatif ( $S/P \geq 45\%$ ), dont seulement 13 étaient considérés comme positifs forts ( $S/P \geq 90\%$ ). Dans les 3 troupeaux indemnes tous les résultats de qPCR sur fèces étaient négatifs, alors que 2 sérums sur 211 testés en sérologie ELISA étaient faiblement positifs ( $45 \leq S/P < 90\%$ ).

**Tableau 1** : distribution des résultats individuels de sérologie ELISA et de qPCR sur fèces chez 1197 ovins issus 14 élevages infectés par la paratuberculose et 387 ovins issus de 3 élevages indemnes

Technique	Résultats	Ovins des élevages infectés	Ovins des élevages indemnes
Sérologie ELISA	Négatif	1104	209
	Positif faible	80	2
	Positif fort	13	0
qPCR sur fèces	Négatif	1092	387
	Positif faible	99	0
	Positif fort	6	0

### 2.2 SEROLOGIES ELISA ET qPCR SUR FECES : ANALYSES DE MELANGES D'ECHANTILLONS

#### 2.2.1 Sérologie ELISA sur des mélanges de sérums

Aux seuils de décision retenus ( $S/P \geq 25\%$  pour les mélanges de 5 sérums et  $S/P \geq 15\%$  pour les mélanges de 10 sérums) tous les mélanges composés d'échantillons négatifs demeuraient négatifs (spécificité relative,  $M_{Sp_{ELISA}} = 100\%$ ) (tableau 2). Pour ces mêmes seuils, tous les mélanges de 5 sérums contenant un échantillon positif fort ou 2 échantillons positifs faibles étaient détectés positifs (sensibilité relative,  $M_{Se_{ELISA}} = 100\%$ ). En revanche, pour les deux tailles de mélanges seuls 62.2% des mélanges contenant un seul échantillon faiblement positif étaient détectés.

#### 2.2.2 qPCR sur des mélanges de fèces

Sur les 122 mélanges de 5 fèces et 125 mélanges de 10 fèces contenant 1 échantillon fortement positif ( $Ct < 28$ ), la quasi-totalité a donné en résultat positif. En revanche seuls 89.0% des mélanges de taille 5 et 68.2 % des mélanges de taille 10 pour les mélanges contenant un échantillon faiblement positif ( $Ct > 30$ ), étaient détectés (tableau 2).

**Tableau 2** : résultats des analyses de mélanges de sérums et de fèces

Technique	Taille et composition des mélanges	Nombre de mélanges	% de mélanges détectés positifs
Sérologie ELISA	5 /10 - sérums négatifs	2 x 102	0
	5/10 - 1 positif faible	2 x 37	62.2
	5 /10 - 2 positifs faibles	2 x 21	100.0
	5 /10 - 1 positif fort	2 x 21	100.0
qPCR fèces	5 - 1 positif faible	73	89.0
	5 - 1 positif fort	122	99.2
	10 - 1 positif faible	58	68.2
	10 - 1 positif fort	125	100.0

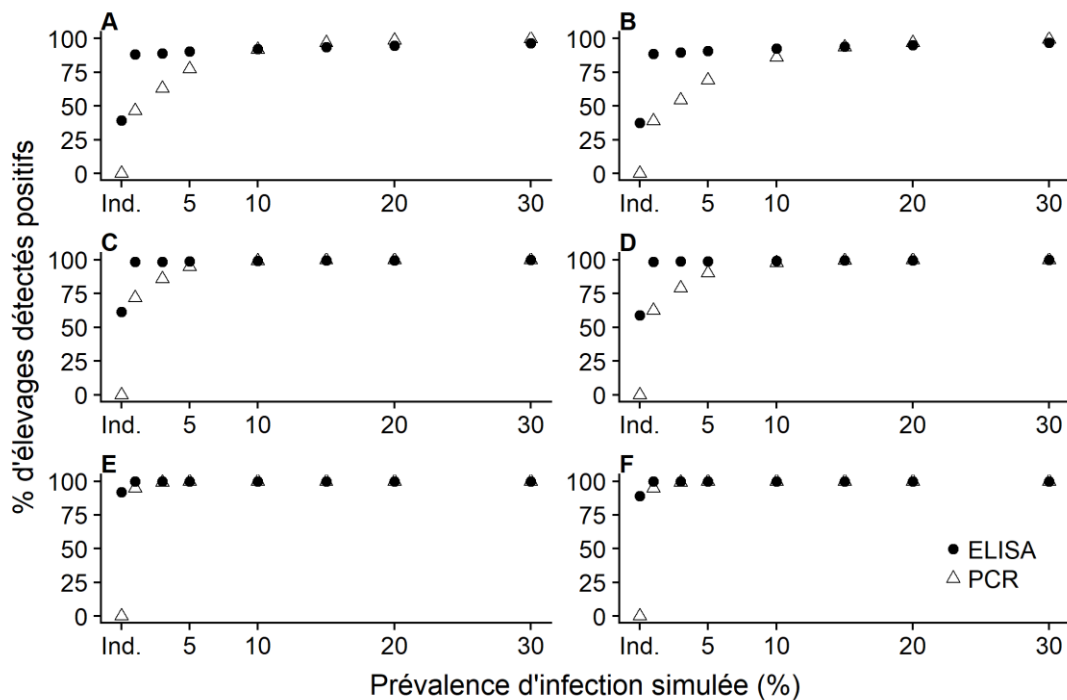
\* par soucis de place, les résultats des mélanges de 5 ou 10 sérums étant strictement identiques, ils ont été présentés ensemble.

### 2.3 PERFORMANCES A L'ECHELLE DES ELEVAGES

Les résultats des 6 stratégies de dépistage simulées sont présentés dans la figure 1. De manière logique, la sensibilité de détection était d'autant plus grande que la prévalence d'infection était élevée et que le nombre d'animaux prélevés était important. Quelle que soit la stratégie, la sensibilité de détection était supérieure à 95% dès lors que la prévalence d'infection était supérieure à 15%. Pour les faibles prévalences d'infection ( $< 5\%$ ) et pour 50 ou 100 animaux testés la sensibilité des stratégies basées sur la sérologie ELISA de mélanges demeurait élevée ( $F_{Se_{ELISA}}$  entre 89% et 99%) et supérieure à celle des stratégies basées sur la qPCR sur mélanges de fèces ( $F_{Se_{PCR}}$  entre 39% et 95%) Ces très bonnes performances de la sérologie ELISA de mélanges étaient en partie dues à un défaut de spécificité, comme l'indique la forte proportion des élevages indemnes détectés à tort ( $F_{Sp_{ELISA}}$  entre 62% et 8% selon les stratégies).

Pour une taille d'échantillon donnée (50 animaux testés : stratégies A et B ; 100 animaux testés : stratégies C et D ou 300 animaux testés : stratégies E et F) et pour une prévalence d'infection supérieure à 10%, la taille des mélanges (5 ou 10) n'influçait pas les performances des différentes stratégies de dépistage. Pour des prévalences d'infection inférieures à 10% et lorsque 50 ou 100 ovins étaient testés, l'analyse de mélanges de 5 fèces en qPCR apportait une légère amélioration de la sensibilité de détection par rapport à l'analyse de mélanges de taille 10 (+4.5 à +9.4 %).

Le nombre de mélanges de fèces détectés positifs en qPCR est présentée dans la figure 2 pour les différentes prévalences d'infection simulées. Lorsque seuls 5 ou 10 mélanges sont testés, la distinction entre les différentes prévalences d'infection sur la seule base du nombre de mélanges positifs apparait difficile. Ainsi, 2 mélanges positifs sur 10 peuvent être observés dans 18% des élevages avec une prévalence d'infection de 3%, mais aussi dans 22% des élevages avec une prévalence d'infection de 15% (panneau A, mélanges de 5 fèces). Cette distinction est encore plus difficile lorsque seuls 5 mélanges de 10 fèces sont testés (panneau B). Même lorsque 20 mélanges de 5 fèces sont testés, la séparation entre les différentes prévalences demeure grossière (panneau C).



Compte tenu de la faible spécificité des stratégies basées sur la sérologie ELISA, la distinction entre les différents niveaux de prévalence d'infection est quasi-impossible et n'est pas présentée ici.

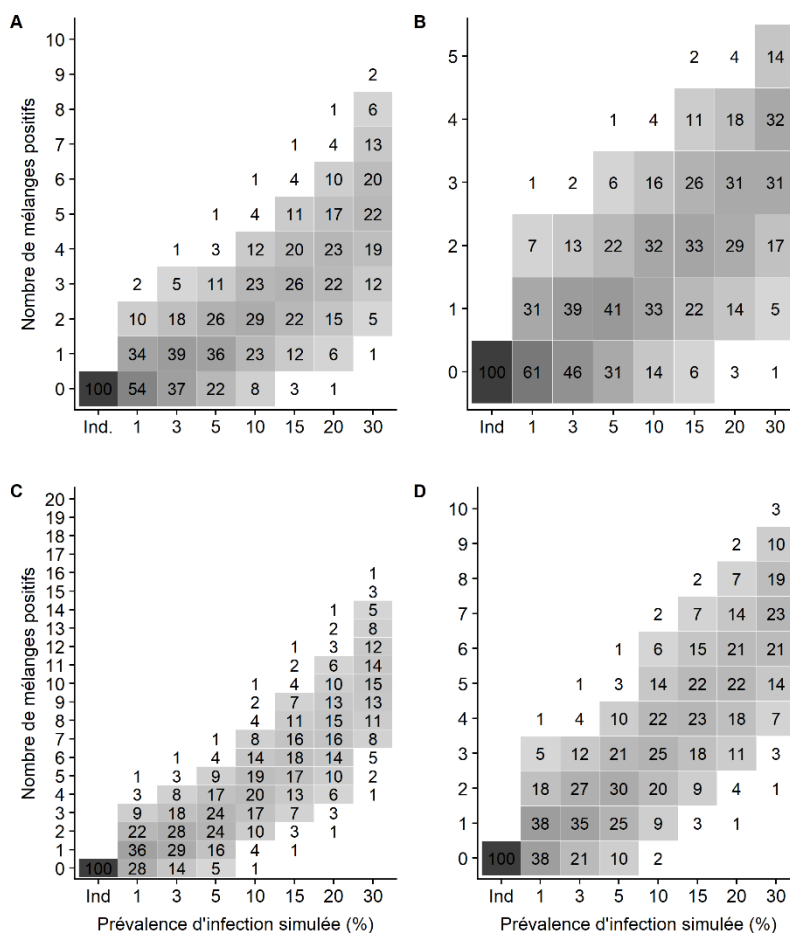


Figure 1 : probabilité de détection des élevages par utilisation de la sérologie ELISA sur des mélanges de sérums ou de la qPCR sur des mélanges de fèces en fonction de la prévalence d'infection pour différentes stratégies de dépistage. A : 10 mélanges de 5 échantillons ; B : 5 mélanges de 10 échantillons ; C : 20 mélanges de 5 échantillons ; D : 10 mélanges de 10 échantillons ; E : 60 mélanges de 5 échantillons ; F : 30 mélanges de 10 échantillons. (Ind : indemne : prévalence = 0%)

Figure 2 : nombre de mélanges de fèces détectés positifs en qPCR en fonction de la prévalence d'infection simulée pour différentes stratégies de dépistage. Les valeurs chiffrées correspondent à la probabilité, pour chaque prévalence d'infection simulée, d'obtenir un nombre donné de mélanges positifs. **A** : 10 mélanges de 5 fèces ; **B** : 5 mélanges de 10 fèces ; **C** : 20 mélanges de 5 fèces ; **D** : 10 mélanges de 10 fèces. (Ind : indemne : prévalence = 0%)

### 3. DISCUSSION

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'intérêt et les limites de l'utilisation de mélanges de sérums ou de fèces pour le dépistage des élevages ovins infectés par la paratuberculose. En l'absence d'estimateur disponible dans la littérature pour les ovins il nous semblait pertinent de réaliser une évaluation en laboratoire des performances de l'analyse de mélanges d'échantillons que ce soit pour la sérologie ELISA ou la qPCR sur fèces.

Notre hypothèse selon laquelle la probabilité de détection des mélanges était influencée par le niveau de réponse des échantillons individuels composant les mélanges a été vérifiée pour les deux techniques. Ainsi lorsqu'un mélange contenait un échantillon fortement positif (sérum ou fèces), la probabilité de détection était proche ou égale à 100 %. A l'inverse, si seul un échantillon faiblement positif était contenu dans le mélange, alors la sensibilité de détection était dégradée, même si elle demeurait acceptable (entre 62.2% et 89.0%). La sensibilité de détection en qPCR des mélanges de 5 ou 10 fèces contenant un échantillon faiblement positif (Ct>30) était supérieure à celle obtenue par culture (milieu BACTEC 12B ou 7H10) de fèces d'ovins atteints de forme paucibacillaire de paratuberculose (sensibilité entre 15% et 60%) (Whittington *et al.*, 2000 ; Dhand *et al.*, 2010). Même si la stricte comparaison des performances entre ces deux techniques est difficile (échantillons différents), nos résultats militent pour l'utilisation de la qPCR, qui fournit un résultat beaucoup plus rapidement que la culture et peut être aisément mise en œuvre par la plupart des laboratoires départementaux d'analyses. Notons cependant que la généralisation des résultats obtenus dans notre étude doit se faire avec prudence, tant les étapes de préparation, d'extraction et d'amplification sont variables entre les trousses commerciales de qPCR.

Les estimateurs obtenus ont permis, au travers d'un travail de simulation, d'évaluer les performances de différentes stratégies de dépistage basées sur l'analyse de mélanges d'échantillons, variant selon le nombre et la taille des mélanges testés. A l'échelle individuelle, les paramètres des spécificités utilisés différaient entre les élevages infectés et les élevages indemnes. Bien que cette approche soit peu commune, elle paraît justifiée par différents arguments biologiques. En effet, alors que la spécificité analytique de la qPCR peut être considérée comme parfaite en élevage indemne (Plain *et al.*, 2014), sa spécificité épidémiologique a été estimée à 99.0% [97.6-99.6] en élevage infectés (Mathevon *et al.*, 2017). Ce défaut de spécificité vis-à-vis des animaux infectés par *Map* pourrait être lié à un phénomène de transport passif : des animaux ingèrent et excrètent le bacille présent dans l'environnement contaminé, peuvent être détectés par qPCR ou culture fécale, mais demeurent non infectés (Sweeney *et al.*, 1992, Moloney et Whittington, 2008). De même, certains animaux exposés à *Map* peuvent développer une réponse sérologique, sans pour autant être durablement infectés (de Silva *et al.*, 2018). Que ce soit pour la qPCR sur fèces ou pour la sérologie ELISA, ces résultats « faussement positifs vis-à-vis de l'infection » sont cependant le marqueur d'une exposition réelle à *Map*, est révéler l'infection de l'élevage. De ce fait, il nous semblait pertinent d'utiliser des paramètres de spécificité différents pour les élevages infectés et les élevages indemnes.

La spécificité analytique de la sérologie ELISA est connue pour être non parfaite, en raison de réactions croisées possibles avec d'autres Mycobactéries environnementales (McKenna *et al.*, 2005 ; Wells *et al.* 2006), ce que vient renforcer l'observation de 2 résultats positifs dans les

troupeaux indemnes investigués ici. Lors de l'utilisation d'un test dont la spécificité à l'échelle individuelle (ISp) n'est pas parfaite, la spécificité à l'échelle d'un troupeau (FSp) est d'autant plus faible que le nombre d'animaux testés est élevé (FSp = ISp<sup>n</sup>, avec n le nombre d'animaux testés). Il est assez fréquent d'obtenir quelques résultats de sérologie positifs dans des troupeaux de grande taille, par ailleurs considérés indemnes sur la base de techniques plus sensibles et plus spécifiques (Tavornpanich *et al.*, 2008, Brugel, 2014). Des conclusions similaires seraient obtenues pour des mélanges de sérums, comme le montrent les résultats des simulations que nous avons réalisées. De ce fait, l'utilisation dans un plan de dépistage à grande échelle de la sérologie ELISA sur des mélanges de sérums ne nous paraît pas être recommandable en l'absence de confirmation par des techniques plus spécifiques telles que la culture ou la PCR sur fèces. Ces analyses de confirmation rendraient cependant le coût global de ces stratégies de dépistage très élevé.

Selon nos résultats de simulation, l'utilisation de la qPCR sur des mélanges de fèces apparaît en revanche très prometteuse. Même si la sensibilité de détection pour des élevages à faible prévalence d'infection (entre 1 et 5%) est loin d'être parfaite (39-75%) lorsque seuls 50 animaux sont testés, elle augmente très rapidement dès lors que le nombre d'animaux testés ou que la prévalence d'infection augmente. Par ailleurs, pour des performances similaires ou très légèrement inférieures, l'analyse de mélanges de taille 10 (au lieu de 5) permettrait de réduire les coûts analytiques des stratégies de dépistage. Malgré tout, l'établissement d'un statut indemne de paratuberculose avec un niveau de confiance élevé (>95%), sur la base de l'analyse de mélanges des fèces, nécessiterait de prélever et de tester un très grand nombre d'animaux (la totalité des animaux présents pour un élevage de 300 ovins). Les coûts d'analyse à engager peuvent dès lors apparaître prohibitifs. Cependant l'accumulation de résultats négatifs dans le cadre d'un suivi longitudinal de plus faible ampleur (50 à 100 animaux testés par an) mais mené sur plusieurs années (3 à 6), pourrait permettre, si le statut réel de l'élevage ne change pas, d'atteindre cet objectif.

### CONCLUSION

L'analyse par qPCR de petits mélanges de fèces semble être une alternative prometteuse - plus performante et moins coûteuse - à l'analyse sérologique individuelle actuellement répandue pour le dépistage de la paratuberculose en élevage ovin. L'application de cette approche à l'espèce bovine semble possible, mais nécessite des résultats complémentaires pour en évaluer les performances.

*Nous tenons à remercier les éleveurs d'Ovilot, les techniciens d'élevage, les vétérinaires et les étudiants vétérinaires ayant contribué à la réalisation de cette étude. Cette étude a bénéficié du financement conjoint de l'INRA (Métaprogramme GISA, projet PICSAR) et de la région Midi-Pyrénées (projet PAROVLOT).*

**Brugel, C. 2014.** Thèse d'exercice, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - 129 p

**De Silva, K., Plain, K., Purdie, A., Begg, D., et al., 2018.** Vet Immunol Immunop., 195, 56-64

**Dhand, N.K, Sergeant, E., Toribio, J.A., Whittington, R.J. 2010.** Prev. Vet. Med., 95, 248-257

**Mathevon, Y., Foucras, G., Falguières, R., Corbiere, F. 2017.** BMC Vet. Res., 13, 230-241

**McKenna, S.L.B., Sockett, D.C., Keefe, G.P., et al., 2005.** J Vet Diagn Invest., 17, 463-466  
**Plain, K.M., Marsh, I.B., Waldron, A.M., Galea, F., et al., 2014.** J Clin Microbiol., 52,745-57  
**Tavornpanich, S., Munoz-Zanzi, C.A., Wells, S.J., Raizman, E.A., et al., 2008,** Prev. Vet. Med., 83, 65-82  
**Wells,S.J., Collins, M.T., Faaberg, K.S., Wees, C., et al., 2006.** Clin.Vaccine Immunol,13(10), 1125-1130  
**Whittington, R.J., Fell, S., Walker, D., McAllister, S., et al., 2000.** J. Clin. Microbiol ., 38(7), 2550-2556