

Evaluation de deux techniques d'ELISA pour le diagnostic de la paratuberculose bovine

Autor(en): **Meylan, Mireille / Nicolet, J. / Oppliger, A.**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires**

Band (Jahr): **136 (1994)**

Heft 11-12

PDF erstellt am: **19.05.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-592587>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

¹ Clinique des Animaux de rente et des Chevaux de l'Université de Berne, ² Institut de Bactériologie vétérinaire de l'Université de Berne, ³ Institut Galli-Valerio, Lausanne

Evaluation de deux techniques d'ELISA pour le diagnostic de la paratuberculose bovine

Mireille Meylan¹, J. Nicolet², A. Oppliger³, A. Burnens², J. Martig¹

Résumé

Lors de l'évaluation de deux méthodes sérologiques pour le diagnostic de la paratuberculose, on a obtenu pour l'une d'elles (ELISA commercial absorbé des Commonwealth Serum Laboratories, Parkville, Australie) dans une population formée de vingt troupeaux infectés, suspects et négatifs de la région du Plateau de Diesse une sensibilité de 50% et une spécificité de 98%. Un autre ELISA non-absorbé, testé en parallèle, a révélé une sensibilité de 30% et une spécificité de 91%.

Mots clés: paratuberculose – diagnostic – ELISA – sensibilité – spécificité

Evaluation of two techniques of ELISA for the diagnosis of bovine paratuberculosis

A sensitivity of 50% and a specificity of 98% were obtained in the evaluation of a serological method (commercial absorbed ELISA, Commonwealth Serum Laboratories, Parkville, Australia) for the diagnosis of paratuberculosis. The population used in the study consisted of 20 infected, suspect and non-infected herds from the region of the Plateau de Diesse. Another evaluated non-absorbed ELISA test had a sensitivity of 30% and a specificity of 91%.

Key words: paratuberculosis - diagnosis – ELISA – sensitivity – specificity

Introduction

La paratuberculose (maladie de Johne) est une infection chronique de l'intestin des ruminants qui se manifeste cliniquement par des diarrhées profuses et un amaigrissement marqué. Les animaux s'infectent généralement avant l'âge d'une année, mais la maladie se déclare cliniquement à l'âge adulte, donc après une période d'incubation de plusieurs mois à plusieurs années. La paratuberculose résiste à tout traitement et conduit invariablement à la mort de l'animal atteint. Le germe responsable est *Mycobacterium paratuberculosis*, un bâtonnet acido-résistant (Chiodini et al., 1984).

Le diagnostic est au centre de la problématique de la paratuberculose. En l'absence d'une thérapie efficace, le seul moyen de lutter contre la maladie est d'identifier les animaux infectés et de les éliminer pour éviter qu'ils ne contaminent l'environnement et les autres animaux, perpétuant ainsi l'infection à l'intérieur d'une exploitation. On ne dispose cependant à l'heure actuelle d'aucune

méthode de diagnostic satisfaisante pour la paratuberculose, particulièrement sous sa forme subclinique. Or, lorsqu'un cas de paratuberculose clinique peut être diagnostiqué dans une exploitation, c'est généralement déjà 38 à 42% du cheptel qui est infecté de façon subclinique (Kreeger, 1991). Les méthodes actuellement en usage (mise en évidence de l'immunité humorale ou cellulaire, mise en évidence du germe par frottis ou culture de matières fécales) donnent un pourcentage variable de résultats faux-positifs ou faux-négatifs. En ce qui concerne les méthodes de sérologie, des réactions croisées suite à un contact avec d'autres mycobactéries jouent un rôle particulièrement important. Cette difficulté peut être circonvenue par l'absorption préalable des sérums avec des extraits mycobactériens, généralement à partir de *M. phlei* (Yokomizo et al., 1985). D'autre part, la méthode la plus fiable, la culture bactériologique de matières fécales est extrêmement fastidieuse et demande quatre mois d'incubation avant l'obtention d'un résultat définitif.

Il est donc important de connaître les limites des tests utilisés pour le diagnostic de la maladie de Johne, afin de pouvoir interpréter les résultats en conséquence dans une situation épidémiologique donnée. C'est dans cette optique que nous avons étudié l'ELISA commercial des Commonwealth Serum Laboratories (ELISA CSL) ainsi que celui de l'Institut Galli-Valerio (ELISA GV) dans une région où la paratuberculose est endémique.

Animaux, matériel et méthodes

Organisation du projet

Nous avons examiné 595 vaches et génisses de race tachetée rouge âgées de plus de dix-huit mois d'une à trois fois sur une période d'une année. Ces animaux provenaient de vingt troupeaux (comptant de treize à quatre-vingt-huit têtes de bétail) de la région du Plateau de Diesse, Jura bernois, à l'exception d'une exploitation connue pour être infectée dans une autre région du canton de Berne. Dès le début du projet, ces troupeaux ont été répartis arbitrairement en trois groupes, positifs, suspects et négatifs, selon une anamnèse fournie par le vétérinaire local.

Après un échantillonnage initial où toutes les bêtes ont été testées par sérologie uniquement, les animaux des exploitations positives (deux troupeaux) ont été soumis simultanément à une analyse sérologique par ELISA et à une recherche de *M. paratuberculosis* dans les matières fécales, la culture conventionnelle servant de méthode de référence pour l'évaluation des méthodes sérologiques. Dans les exploitations suspectes (neuf troupeaux), tous les animaux ont été testés par sérologie, ceux s'étant avérés positifs à l'ELISA en plus par culture fécale. Sur la durée de l'étude, toutes les bêtes des exploitations négatives (neuf troupeaux) ont été soumises une fois à la recherche du germe dans les matières fécales parallèlement à la sérologie afin de comparer les résultats de la culture avec ceux de l'ELISA dans le cadre de l'évaluation de la spécificité de la méthode sérologique; lors des autres échantillonnages, la surveillance des troupeaux négatifs s'est bornée à une sérologie sur huit animaux adultes, dans la mesure du possible toujours les mêmes.

Prises d'échantillons

Les échantillons de sang et de matières fécales ont été recueillis en trois séries, en novembre 1991, janvier-février et avril-mai 1992.

- *Prises de sang*: 10 ml de sang ont été récoltés par ponction, chez les bovins adultes, de la veine à lait (Vena epigastrica cranialis superficialis), et, chez les jeunes animaux, de la veine jugulaire.
- *Matières fécales*: environ 50 g de fèces ont été prélevés du rectum avec un gant jetable et transportés dans des récipients stériles de matière plastique.

Sérologie

Nous avons comparé les deux méthodes suivantes:

1. ELISA (CSL) absorbé

Les échantillons de sérum ont été testés à l'Institut de Bactériologie vétérinaire de l'Université de Berne (IVB) par l'ELISA commercial des Commonwealth Serum Laboratories (CSL), Parkville, Australie, qui comprend une étape d'absorption des sérums avec *M. phlei*, selon les instructions du fabricant. Ce test utilise un antigène protoplasmique de la souche VRI 316/102-2 de *M. paratuberculosis* (Socket et al., 1992).

La valeur-seuil lors de l'interprétation des résultats est la moyenne des valeurs des deux contrôles négatifs plus 0,100.

2. ELISA (GV) non-absorbé

L'examen des sérums a été effectué selon une méthode développée dans les laboratoires de l'Institut Galli-Valerio. Il s'agit d'un ELISA non-absorbé utilisant comme antigène la souche de *M. paratuberculosis* NCTC 8578 cultivée en milieu liquide de Middlebrook 7H9, puis soniquée pour en extraire l'antigène selon une méthode modifiée décrite par Milner et al. (1990) et reprise par Bech-Nielsen et al. (1992). Les microplaques sont incubées avec les sérums dilués à 1:20 et la présence d'anticorps contre *M. paratuberculosis* est mise en évidence par une réaction de la peroxidase de raifort conjuguée à des IgG anti-bovins.

Les résultats sont dans un premier temps exprimés en % de l'extinction moyenne des deux témoins positifs, puis transposés en unités semi-quantitatives -, +/-, +, ++, +++.

Cultures bactériologiques

Les cultures bactériologiques ont été effectuées selon une méthode standardisée (Whipple et al., 1991) légèrement modifiée:

Lors de la fabrication du milieu d'Herrold, l'adjonction d'œufs frais est remplacée par une suspension commercialisée (Egg Yolk Suspension Oxoid), et l'on y ajoute un mélange d'antibiotiques (MB-Check Supplement Roche, List Nr. 07 2823 3). Les cultures sont incubées à 37° C durant 18 semaines. Une lecture est effectuée toutes les quatre semaines. Toute colonie apparaissant après un mois sur le milieu contenant de la mycobactine est identifiée comme *M. paratuberculosis* par repiquage sur milieu dépourvu de mycobactine et par PCR avec comme amorce la séquence d'insertion spécifique IS900 (Vary et al., 1990).

Evaluation des résultats

Pour l'évaluation des performances des deux ELISA, nous avons comparé leurs résultats avec ceux des cultures fécales, mais en prenant pour référence une population différente pour l'estimation de la sensibilité ou de la spécificité (Socket et al., 1992).

Analyse de sensibilité: le «gold standard» auquel on se réfère pour l'estimation de la sensibilité de ELISA est le résultat de la culture fécale. La méthode de référence est spécifique à 100%, par contre sa sensibilité est indifférente, puisqu'on ne considère que la population infectée, donc positive à la culture fécale, pour le calcul de la sensibilité.

La formule suivante permet de déterminer la sensibilité des ELISA étudiés (Martin et al., 1987):

$$\text{Sensibilité} = \frac{T +}{D +} = \frac{n \text{ ELISA} +}{n \text{ infectés}} = \frac{n \text{ ELISA} +}{n \text{ culture} +}$$

(T + = animaux positifs au test; D + = animaux atteints; n = nombre).

Nous avons inclu dans cette analyse tous les animaux pour lesquels nous disposions de résultats parallèles de sérologie et de culture fécale, en ne prenant qu'un résultat par bête, et, en cas de résultats discordants dans les différentes analyses, en partant du principe qu'une bête qui a réagi positivement, ne serait-ce qu'une fois, doit être considérée comme positive.

Analyse de spécificité: afin de s'assurer que tous les animaux pris en compte pour l'estimation de la spécificité des méthodes sérologiques étaient en effet exempts d'une infection à *M. paratuberculosis*, nous avons exclu de la population de référence tous les animaux positifs et suspects, à savoir:

- les animaux positifs à la culture fécale.
- les animaux négatifs à la culture, mais provenant d'exploitations comprenant des animaux positifs.
- les animaux provenant d'exploitations ayant connu des problèmes cliniques de paratuberculose confirmés ou non par culture.
- les troupeaux comprenant des animaux achetés d'exploitations positives.
- les troupeaux où la paratuberculose a été mise en évidence sur la base de méthodes de pathologie.
- les animaux ayant pâture avec des bêtes d'exploitations positives.

Après l'exclusion de tous les animaux correspondant à ces critères, il reste 5 troupeaux sur 20 qui peuvent être considérés comme non-suspects. De la sorte, dans une population reconnue, dans une marge de sécurité raisonnable, comme exempte de paratuberculose, tout résultat sérologique positif pourra être assimilé à un résultat faux-positif. Le calcul de la spécificité se fait selon la formule suivante (Martin et al., 1987):

$$\text{Spécificité} = \frac{T -}{D -} = \frac{n \text{ ELISA} -}{n \text{ non-infectés}} = \frac{n \text{ ELISA} -}{n \text{ culture} -}$$

Chaque animal est pris en compte une seule fois, même si l'on dispose pour certains de deux, voire trois résultats successifs, auquel cas un seul résultat positif suffit à classer l'animal comme positif.

Résultats

Les résultats des deux ELISA, CSL (Commonwealth Serum Laboratories) et GV (Galli-Valerio), ont été classifiés

semiquantitativement selon l'ampleur de l'extinction mesurée (tableau 1).

Pour la suite de l'interprétation, nous avons dichotomisé les résultats, c'est-à-dire que les valeurs - et +/- ont été considérées comme négatives, tandis que les valeurs +, ++, +++ formaient le groupe positif.

Tableau 1: Résultats des deux techniques d'ELISA (CSL et GV) sur l'ensemble des échantillons de sérum.

(n=965)		-	+/-	+	++	+++
Nombre	CSL	925	2	17	15	6
	GV	746	88	56	34	41
%	CSL	95,85	0,21	1,76	1,55	0,62
	GV	77,3	9,1	5,8	3,5	4,2

- = négatif
+/- = suspect
+ = légèrement positif
++ = positif
+++ = fortement positif

Analyse de sensibilité

Nous disposions pour 379 animaux de résultats parallèles de sérologie et de culture fécale. Les résultats comparatifs sont donnés dans le tableau 2.

On obtient donc pour les deux méthodes sérologiques étudiées les valeurs suivantes:

ELISA CSL: *sensibilité* = 50%.

ELISA GV: *sensibilité* = 30%.

Tableau 2: Comparaison des résultats des deux techniques d'ELISA (CSL et GV) avec ceux de la culture fécale.

Méthode	n=379	ELISA +	ELISA -
CSL	Culture +	18	18
	Culture -	5	338
GV	Culture +	11	25
	Culture -	37	306

Analyse de spécificité

Après l'exclusion des animaux suspects, il reste 100 animaux non-suspects, qui sont par définition tous négatifs à la culture fécale, pour la détermination de la spécificité des deux méthodes sérologiques. Les résultats sont donnés dans le tableau 3.

On obtient ainsi après calcul de la spécificité les valeurs suivantes:

ELISA CSL: *spécificité* = 98%.

ELISA GV: *spécificité* = 91%.

En résumé, nous obtenons pour les deux ELISA étudiés les caractéristiques suivantes:

<i>ELISA CSL:</i>	<i>sensibilité = 50%.</i>
	<i>spécificité = 98%.</i>
<i>ELISA GV:</i>	<i>sensibilité = 30%.</i>
	<i>spécificité = 91%.</i>

Tableau 3: Résultats des deux ELISA pour les groupes d'animaux définis comme suspects et non-suspects.

Méthode	n=595		ELISA +	ELISA -
CSL	Suspect	oui	27	468
		non	2	98
GV	Suspect	oui	126	369
		non	9	91

Discussion

L'importance et les retombées économiques de la paratuberculose sont mal connues et, de fait, souvent sous-estimées en Suisse. Souvent des animaux sont éliminés suite à des diarrhées chroniques sans que l'on ait établi de diagnostic étiologique précis. Le but de notre étude était donc de valider l'utilisation d'un ELISA pour la Suisse, à savoir d'établir des valeurs de sensibilité et de spécificité applicables dans notre contexte épidémiologique, de sorte à disposer d'un outil diagnostique dont les caractéristiques soient connues pour la surveillance de la maladie dans nos régions.

Puisque c'est surtout le dépistage de la paratuberculose subclinique qui est d'importance capitale dans la lutte contre cette maladie, et non le diagnostic de cas cliniquement manifestes, c'est dans cette optique que nous avons étudié l'application de deux méthodes sérologiques. La population de référence utilisée comprenait donc des animaux cliniquement sains, mais dont une partie était infectée subcliniquement par *M. paratuberculosis*.

Nous avons étudié d'une part un ELISA absorbé destiné au dépistage de la paratuberculose. Il s'agit d'un test

commercial ayant déjà été largement évalué et utilisé en Australie, où il a été développé dans les laboratoires des Commonwealth Serum Laboratories (CSL), et aux USA (Cox et al., 1991; Collins et al., 1991; Ridge et al., 1991; Sockett et al., 1992). D'autre part, nous avons procédé, à partir des mêmes échantillons, à l'évaluation d'un autre ELISA, non-absorbé, mis au point dans les laboratoires de l'Institut Galli-Valerio à Lausanne.

Le «gold standard» auquel nous avons comparé les résultats de nos méthodes de sérologie pour évaluer leur sensibilité et leur spécificité est une méthode de culture fécale standardisée, très proche de celles décrites dans la littérature (Whipple et al., 1991).

Il est généralement admis que la mise en évidence de *M. paratuberculosis* par culture fécale est une méthode spécifique à 100% et que tout animal positif à la culture fécale peut être considéré comme infecté.

En comparant les résultats des deux méthodes sérologiques avec ceux de la culture fécale, nous avons obtenu pour l'ELISA CSL des valeurs de sensibilité et de spécificité de 50% et 98% respectivement, pour l'ELISA CSL aux valeurs citées dans la littérature: 65% et 99,8% (Cox et al., 1991), 47,3% et 99,0% (Collins et al., 1991), 47,3% et 99,0% (Ridge et al., 1991), 43,4% et 95,4% (Sockett et al., 1992). Les variations constatées sont probablement imputables à la méthode de référence par rapport à laquelle sont calculées la sensibilité et la spécificité. Dans presque tous les cas, il s'agissait dans les publications citées d'échantillons provenant du «Repository for Paratuberculosis Specimens» (Sockett et al., 1992), une «banque» de matériel (échantillons de sérum et de matières fécales provenant de bêtes dont le statut d'infection a été déterminé de façon précise) constituée pour servir de référence lors de l'évaluation de nouvelles méthodes de diagnostic.

En ce qui concerne la détermination de la sensibilité, la population du «Repository» comprend, outre des animaux positifs à la culture fécale, des sujets infectés mais n'excrétant pas le germe, dont le statut d'infection a été déterminé post mortem par des méthodes histopathologiques et bactériologiques. Ceci explique donc les va-

Evaluation zweier ELISA-Techniken für die Diagnostik der bovinen Paratuberkulose

Bei der Evaluation einer serologischen Methode zur Diagnose der Paratuberkulose (absorbiertes ELISA der Commonwealth Serum Laboratories, Parkville, Australia) konnten in einer gemischten Population von 20 infizierten, verdächtigen und negativen Herden eine Sensibilität von 50% und eine Spezifität von 98% ermittelt werden.

Am gleichen Probenmaterial wurde ein nicht absorbierter ELISA vom Institut Galli-Valerio, Lausanne, geprüft; die Sensibilität dieses Tests betrug 30% und die Spezifität 91%.

Valutazione di due metodi diagnostici per la paratuberculosis bovini

La valutazione di un metodo diagnostico serologico per la paratuberculosis (commercial absorbed ELISA, Commonwealth Serum Laboratories, Parkville, Australia) ha reso possibile determinare all'interno di una popolazione di bovini infetti, sospetti e negativi del Plateau de Diesse una sensibilità del 50% e una specificità pari al 98%.

Un altro non-absorbed ELISA, sperimentato parallelamente, ha rilevato una sensibilità del 30% e una specificità del 91%.

leurs de sensibilité un peu plus basses que celle que nous avons obtenue dans notre population infectée, définie comme positive à la culture fécale.

Pour l'estimation de la spécificité, nous disposons d'une population de référence constituée d'animaux sélectionnés comme non-infectés selon des critères très stricts. Il s'agit donc d'une population négative représentative du cheptel local, de sorte que la valeur de spécificité obtenue de 98% est applicable spécifiquement à la population bovine suisse. Nous disposons ainsi pour ce test sérologique de valeurs spécifiques à la situation épidémiologique de la paratuberculose en Suisse, de sorte qu'on pourra désormais l'appliquer à notre population bovine en connaissance de cause, de façon à pouvoir interpréter en conséquence les résultats bruts obtenus lors d'études de séroprévalence dans nos régions.

La méthode sérologique de l'Institut Galli-Valerio, présentant une sensibilité de 30% et une spécificité de 91%, soit des valeurs inférieures à celles de l'ELISA CSL, paraît moins indiquée pour des études de séroprévalence à grande échelle.

Bibliographie

- Bech-Nielsen S., Berg Jorgensen J., Abrens P., Feld N.C. (1992): Diagnostic accuracy of a *Mycobacterium phlei*-absorbed serum enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of bovine paratuberculosis in dairy cattle. *J. Clin. Microbiol.* 30, 613-618.
- Chiodini R.J., van Kruiningen H.J., Merkal R.S. (1984): Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet.* 74, 218-262.
- Collins M.T., Sockett D.C., Ridge S., Cox J.C. (1991): Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.* 29, 272-276.
- Cox J. C., Drane D. P., Jones S.L., Ridge S., Milner A. R. (1991): Development and evaluation of a rapid absorbed enzyme immunoassay test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust. Vet. J.* 68, 157-160.

Kreeger J. M. (1991): Ruminant paratuberculosis - a century of progress and frustration. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3, 373-383.

Martin W. S., Meek A. E., Willeberg P. (1987): *Veterinary Epidemiology*, Iowa State University Press, Ames, pp: 48-76.

Milner A. R., Mack W. N., Coates K. J., Hill J., Gill I., Shedrick P. (1990): The sensitivity and specificity of a modified ELISA for the diagnosis of Johne's disease from a field trial in cattle. *Vet. Microbiol.* 25, 193-198.

Ridge S. E., Morgan I. R., Sockett D. C., Collins M. T., Condon R. J., Skilbeck N. W., Webber J. J. (1991): Comparison of the Johne's absorbed EIA and the complement fixation test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust. Vet. J.* 68, 253-257.

Sockett D.C., Carr D.J., Richards W.D., Collins M.T. (1992): A repository of specimens for comparison of diagnostic test procedures for bovine paratuberculosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 188-191.

Sockett D. C., Conrad T. A., Thomas C. B., Collins M.T. (1992a): Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1134-1139.

Vary P. H., Andersen P. R., Green E., Hermon-Taylor J., McFaden J. J. (1990): Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.* 28, 933-937.

Whipple D. L., Calliban D. R., Janargin J. L. (1991): Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and suggested standardized procedure. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3, 368-373.

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. *Jpn. J. Vet. Sci.* 47, 111-117.

Remerciements

Nous remercions Mme Margrit Krawinkler pour l'excellente assistance technique, ainsi que le Dr L. Hirschy, Neuchâtel, qui nous a fourni les anamnèses relatives aux exploitations incluses dans cette étude.

Ce travail a été effectué grâce à l'appui financier de l'Office Vétérinaire Fédéral (Projet no 012.91.1)

Adresse de l'auteur: Mireille Meylan, Department of Veterinary Clinical Sciences, Veterinary Hospital, 601 Vernon L. Tharp Street, Columbus, OH 43210-1089, USA

Manuskripteingang: 25. Juni 1993