

La vaccination contre la paratuberculose ovine : développements méthodologiques et évaluation de son efficacité

MATHEVON Y. (1), LAFORT M-P. (2), TASCA C. (1), GALAN E. (3), FALGUIERES R. (3), CORBIERE F. (1,2), FOUCRAS G. (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

Afin d'évaluer l'efficacité et la pertinence de la vaccination contre la paratuberculose, nous avons réalisé une étude portant sur 19 cheptels ovins dans lesquels l'infection par *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) était démontrée. Parmi ces 19 élevages, les agnelles de renouvellement de 9 d'entre eux ont été vaccinées tous les ans depuis 2009, les 10 autres troupeaux n'ayant pas eu recours à la vaccination. L'excrétion fécale et la réponse sérologique vis-à-vis de *Map* ont été évaluées respectivement par PCR quantitative et ELISA anticorps. Pour cela, des prélèvements de fèces et de sérum ont été réalisés sur les cohortes nées entre 2010 et 2013. Une analyse préliminaire des résultats sérologiques dans 5 élevages vaccinés montre une réponse anticorps très élevée chez la quasi-totalité des animaux, sans décroissance avec l'âge. La sérologie n'apparaît donc pas utilisable pour le suivi du statut infectieux vis-à-vis de *Map* dans les troupeaux vaccinés. Les résultats de qPCR montrent une réduction, mais sans annulation, de la prévalence d'excrétion, suggérant un effet bénéfique de la vaccination sur la contamination de l'environnement. La mise au point d'une méthode pour qualifier le statut des élevages vis-à-vis de la paratuberculose permettra de rationaliser les choix en matière de vaccination.

Ovine Johne's disease vaccination: Methodological developments and efficiency measurement

MATHEVON Y. (1), LAFORT M-P. (2), TASCA C. (1), GALAN E. (3), FALGUIERES R. (3), CORBIERE F. (1,2), FOUCRAS G. (1,2)

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

SUMMARY

To assess ovine Johne's disease vaccination efficiency and relevance we conducted a study on 19 ovine flocks in which *Map* infection was already demonstrated. Nine of the 19 herds had vaccinated replacement female lambs each year since 2009, the other half did not change their control practices. Fecal shedding and serological response were evaluated respectively by quantitative PCR and ELISA. Faeces and serum samples were collected on cohorts born between 2010 and 2013. A preliminary analysis of ELISA results in five vaccinated herds shows that the immune response was high in almost all vaccinated sheep, without any decrease with ageing, proving that serology is useless to track the evolution of *Map* infection in vaccinated herds. qPCR results suggest a decrease of fecal shedding prevalence, indicating that vaccination may contribute to reduce environmental contamination. The development of a method to qualify the status of herds will streamline vaccination choices.

INTRODUCTION

La paratuberculose est une maladie infectieuse chronique provoquée par *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) qui affecte toutes les espèces de ruminants domestiques. L'absence de traitement, l'impossibilité d'obtenir un diagnostic de certitude et la longue période d'incubation rendent le contrôle de cette maladie difficile. Jusqu'alors les moyens de gestion se limitaient à des mesures de biosécurité (exclusion des animaux suspects ou cliniquement atteints) rarement mises en œuvre en élevage ovin. La vaccination, devenue possible à l'aide d'un vaccin inactivé (SILIRUM® pour les bovins, GUDAIR® pour les ovins et caprins), offre une alternative nouvelle et attractive. Cependant une évaluation de son efficacité en termes bactériologiques n'a pas encore été réalisée dans les élevages ovins français. Dans cette étude, nous avons cherché d'une part à mettre en évidence l'efficacité de la vaccination contre la paratuberculose en cheptels ovins et d'autre part à développer une méthode de suivi de l'infection dans les élevages vaccinés.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1 POPULATION ETUDIEE

Les 61 éleveurs adhérents à l'organisation de producteurs Ovilot (Lot, France) constituent la population étudiée.

L'échantillon d'étude est représenté par 19 élevages sélectionneurs (en race Causse du Lot) dans lesquels l'infection par *Map* était démontrée (sérologies positives ou résultats d'autopsie évocateurs confirmés par PCR et/ou histologie). La taille des troupeaux constituant l'échantillon d'étude varie de 500 à 1900 brebis adultes (moyenne 893+/-386). Dans 9 de ces élevages, généralement les plus affectés (mortalité, réformes précoces) une vaccination avec le vaccin Gudair® a été mise en œuvre depuis 2009 (millésime de naissance 2010). Le protocole vaccinal consiste en une injection sous-cutanée d'une dose entre 4 et 6 mois d'âge sur l'ensemble des agnelles de renouvellement chaque année.

1.2 DONNEES COLLECTEES

1.2.1 Sondage sérologique préalable à la vaccination

Entre 2009 et 2014, un sondage sérologique annuel a été réalisé dans les élevages suivis. Après la mise en place de la vaccination, seuls les élevages non vaccinés étaient concernés. Le sérum d'une cinquantaine d'animaux de 3 ans était prélevé dans chaque élevage. Au total 2791 résultats individuels étaient disponibles dans les 19 élevages suivis permettant une évaluation de la prévalence sérologique observée vis-à-vis de *Map*.

1.2.2 Sondage sérologique et excrétion fécale post-vaccinale

Dans les 9 élevages vaccinés, un objectif de 50 animaux prélevés dans les classes d'âge de 1 à 4 ans a été fixé

(n=1589 au total). Dans les 10 élevages non vaccinés, seuls les ovins de 3 ans ont été prélevés, éventuellement complétés par des animaux de 2 ans afin d'atteindre 100 brebis par élevage (n=906 au total). Chaque animal inclus a fait l'objet d'une prise de sang sur tube sec et d'un prélèvement de fèces directement dans le rectum à l'aide de gants à usage unique. Après identification, les prélèvements ont été congelés à -20°C jusqu'à leur analyse.

1.3 ANALYSE BIOLOGIQUES ET TRAITEMENT DES DONNEES

1.3.1 Analyses sérologiques

Les analyses sérologiques de sondage avant la vaccination ont été réalisées par le Laboratoire Départemental d'Analyses Vétérinaires du Lot à l'aide du kit Idexx Paratuberculosis Screening Ab Test®. La limite de positivité est fixée, par le fabricant, à une valeur S/P égale à 55%. Les analyses sérologiques post-vaccinales ont été réalisées à l'UMR 1225 IHAP à l'aide du kit ID Screen Paratuberculosis Indirect® (ID.Vet, Montpellier, France). La limite de positivité est fixée, par le fabricant, à une valeur S/P égale à 70%.

1.3.2 qPCR quantitative sur fèces

L'extraction d'ADN a été réalisée à partir de 10 g de fèces à l'aide du kit d'extraction (Macherey Nagel). La quantification à l'aide d'Adiavet Paratb Realtime® a été réalisée par comparaison à une gamme de 4 points de concentration de 10^4 à 10^1 équivalents génomes sur chaque plaque préparée à partir d'ADN purifié de *Map*, ainsi qu'un contrôle positif. Le seuil de positivité a été fixé à 40 cycles de PCR, correspondant à la détection d'une copie d'ADN dans la réaction, c'est-à-dire, en moyenne, à une charge d'excrétion de 2.3 bactéries par gramme de fèces.

1.3.3 Analyses statistiques

Afin d'évaluer l'effet de la vaccination sur la persistance de la réponse sérologique, la prévalence observée des ovins séropositifs (rapport S/P >70%) ainsi que la valeur moyenne du rapport S/P ont été calculées et comparées pour chaque cohorte de naissance dans 4 élevages des 9 élevages vaccinés ayant fait l'objet de d'analyses sérologiques.

Afin d'évaluer de manière indirecte l'efficacité de la vaccination, nous avons effectué des comparaisons de prévalences sérologiques et des quantités de *Map* excrétées observées, entre les troupeaux vaccinés et non vaccinés avant et après la mise en place de la vaccination. La situation initiale a été établie à partir de la séroprévalence observée calculée avec les données du sondage sérologique. Au vu de la réponse sérologique post-vaccinale (cf infra), nous avons utilisé les résultats d'excrétion pour comparer les deux populations de troupeaux. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R.

2. RESULTATS

2.1 SITUATION DES CHEPTELS PREALABLEMENT A LA VACCINATION

La séroprévalence observée estimée à partir des données du sondage sérologique variait de 0 à 46% (médiane = 7,8%). La séroprévalence observée dans les troupeaux ayant été ultérieurement vaccinés était significativement plus élevée que celle des cheptels n'ayant pas mis en place la vaccination (test de Mann-Whitney-Wilcoxon $p < 0,001$) (Figure 1).

Dans un premier temps, les analyses sérologiques ont été réalisées dans 4 des 9 troupeaux vaccinés. La séroprévalence observée chez les ovins vaccinés était très élevée, comprise entre 92% et 100% selon les cohortes de naissance et les élevages. Aucune différence significative du niveau de séroprévalence observée n'a pu être mise en évidence entre élevages ou entre cohortes de naissance.

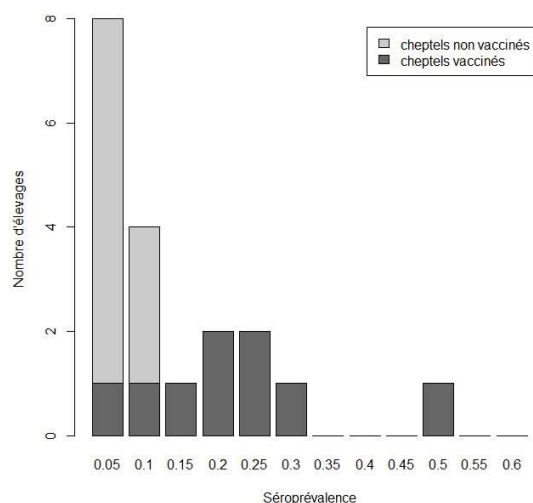


Figure 1 : Dispersion des séroprévalences observées avant vaccination (résultats des sondages sérologiques)

2.2 SEROLOGIE POST-VACCINALE

Dans tous les élevages, le rapport S/P des animaux vaccinés était très largement supérieur au seuil de positivité de 70% (moyenne = 158%) et aucune décroissance significative n'a pu être mise en évidence en fonction de l'âge des animaux (Figure 2). Ces résultats suggèrent une persistance forte et durable de la réponse sérologique post-vaccinale. A la vue de ces résultats, il a été décidé de ne pas réaliser (pour des raisons de coût) les analyses sérologiques sur les 5 autres élevages vaccinés.

2.3 EXCRETION DE MAP

2.3.1 Troupeaux non vaccinés

La prévalence observée dans la population ne vaccinant pas variait de 0 à 30% d'animaux excréteurs par troupeau (Figure 4). Sur les 75 brebis positives en qPCR dans ces troupeaux, la valeur médiane des charges d'excrétion estimées était de 13.2 bactéries/gramme de fèces (1^{er} quartile : 5.4 ; 3^{ème} quartile : 60.5).

2.3.2 Troupeaux vaccinés

La prévalence d'excrétion observée dans les troupeaux vaccinés variait de 1 à 7%. Les prévalences d'excrétion observée étaient globalement faibles ($\leq 4\%$).

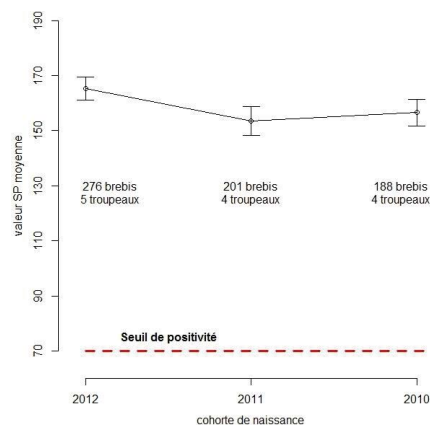


Figure 2 : Valeur S/P par cohorte de naissance dans les troupeaux vaccinés

La prévalence d'excrétion n'était par ailleurs pas significativement différente entre les cohortes de naissance (test $\chi^2=0.39$) (Figure 3). Sur les 35 brebis positives en qPCR dans ces troupeaux, la valeur médiane des charges d'excrétion estimées était de 7.6 bact/gramme de fèces (1^{er} quartile : 4.0 ; 3^{ème} quartile : 31.4).

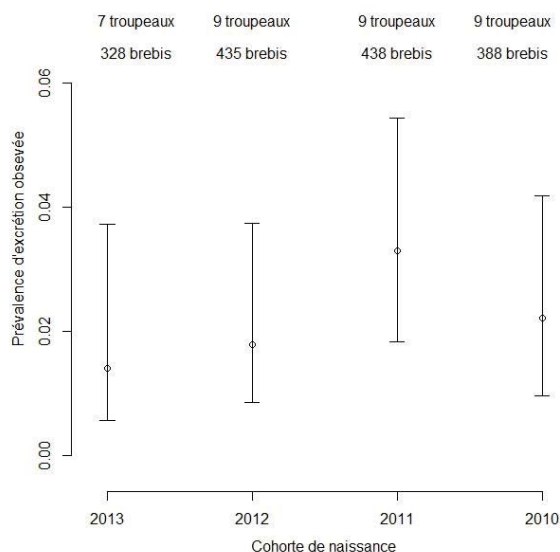


Figure 3 : Prévalence d'excrétion de *Map* observée par cohorte de naissance dans les troupeaux vaccinés

2.3.2 Comparaison en fonction du statut vaccinal

La prévalence d'excrétion observée n'est pas différente entre troupeaux vaccinés et troupeaux non vaccinés (test de Mann-Whitney-Wilcoxon $p=0,17$). De même le niveau d'excrétion individuel estimé n'est pas différent entre les brebis issues d'élevages vaccinés et ne vaccinant pas (Test de Mann Whitney Wilcoxon $p=0,15$). La figure 5 montre la dispersion des animaux positifs en qPCR en fonction de leur niveau d'excrétion estimé. Nous retrouvons un profil similaire dans les troupeaux vaccinés ou ceux ne vaccinant pas avec environ la moitié des brebis faiblement excrétrices (moins de 10 bactéries par gramme de fèces). Les brebis fortes excrétrices (plus de 10000 bactéries par grammes de fèces) représentent 5% des individus excréteurs.

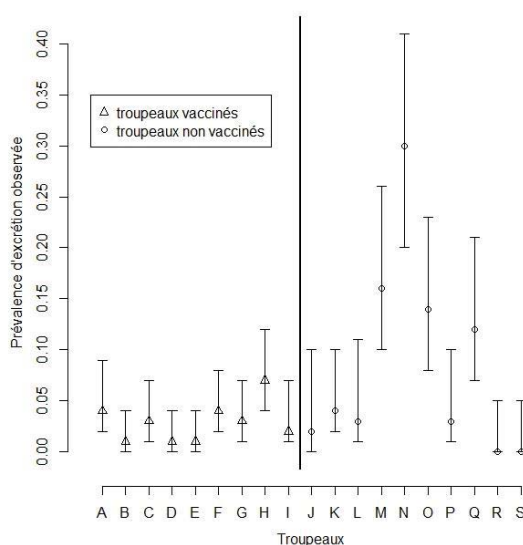


Figure 4 : Prévalence d'excrétion de *Map* observée et intervalle de confiance à 95%

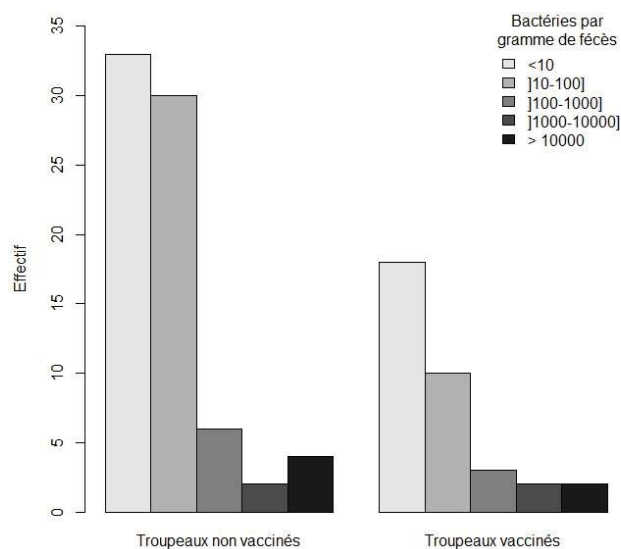


Figure 5 : Dispersion des niveaux d'excrétion en fonction du statut du troupeau

3. DISCUSSION ET CONCLUSION

Le premier objectif de cette étude était d'évaluer la pertinence de l'utilisation de la sérologie pour le suivi des élevages ovins vaccinés contre la paratuberculose. Nos résultats indiquent clairement une persistance à un niveau élevé et durable de la réponse sérologique post-vaccinale, rendant l'utilisation de l'outil sérologique non pertinente pour le suivi des nouvelles infections dans les troupeaux vaccinés. Ces résultats diffèrent quelque peu des observations d'autres auteurs (Reddacliff et al. 2006; Dhand et al. 2013; Windsor et al. 2014; Bastida et Juste 2011) selon lesquelles la séroprévalence baisse fortement après 2 ans chez les animaux vaccinés. La stabilité de la réponse sérologique et le maintien d'un rapport S/P élevé au cours du temps pourrait s'expliquer par le protocole de vaccination mis en place par Ovilot, où les agnelles ont été vaccinées entre 4 et 6 mois d'âge, soit entre 1 et 3 mois plus tard que pour les animaux inclus dans les études déjà publiées. Il pourrait en résulter une meilleure stimulation du système immunitaire expliquant les différences de niveau et de persistance des réponses anticorps post-vaccinales observées.

Nous avons donc utilisé la qPCR pour répondre au second objectif de notre étude qui était d'évaluer l'efficacité de la vaccination vis vis-à-vis de l'excrétion fécale de *Map*. Cette méthode reste utilisable en milieu vacciné, rapide d'application et plus sensible que la culture sur fèces congelés (Kawaji et al. 2011); elle fournit en outre des résultats quantitatifs. L'analyse de 4 cohortes de naissance n'a pas montré de classes d'animaux à privilégier pour assurer le suivi des élevages vaccinés. A partir de deux populations d'élevages distinctes, qui présentent une séroprévalence significativement différente avant la mise en place de la vaccination, nos résultats indiquent que la prévalence d'excrétion n'était pas différente entre les élevages non vaccinés (faiblement infectés) et ceux vaccinés depuis 5 ans (ayant initialement des séroprévalences significativement plus élevées). En faisant l'hypothèse qu'une séroprévalence initiale plus élevée dans les troupeaux ayant mise en œuvre la vaccination correspondait à une prévalence ou un niveau d'excrétion aussi plus élevés, et en l'absence d'autres mesures de maîtrise, ceci suggère donc une réduction de la prévalence d'excrétion après la mise en place de la vaccination. Ce schéma d'analyse, imposé par les données disponibles (absence de données d'excrétion avant

la mise en place de la vaccination) repose cependant sur l'hypothèse selon laquelle la prévalence d'excrétion et la séroprévalence à l'échelle d'un élevage sont corrélées positivement. Une des prochaines étapes dans notre étude sera d'établir la forme de cette relation. Nos observations suggérant un bénéfice lié à la vaccination sont en accord avec le ressenti des éleveurs qui témoignent d'une forte réduction de la mortalité et des réformes précoces liées à la paratuberculose. Cependant malgré des prévalences faibles, des animaux excréteurs, dont certains à des niveaux élevés, ont été retrouvés dans tous les élevages vaccinés, supportant les résultats d'autres études (Reddacliff et al. 2006; Dhand et al. 2013) qui ont montré une réduction, mais pas d'extinction, de l'excrétion fécale de Map à la suite de la vaccination.

Dans ce contexte il apparaît essentiel, pour la maîtrise de la paratuberculose ovine dans les troupeaux infectés, de maintenir une vaccination sur le long terme, même après réduction ou disparition des troubles cliniques.

Le diagnostic de la paratuberculose repose sur des tests ayant une bonne spécificité (comprise entre 95 et 99%) avec une sensibilité médiocre et très variable selon l'espèce et la cible recherchée (Nielsen et Toft 2008). La prévalence observée sous-estime la prévalence réelle, empêchant une description précise de la situation des élevages d'Ovilot. Pour les mêmes raisons, il ne nous est pas possible de quantifier directement l'effet de la vaccination. L'évaluation des tests utilisés pour déterminer leurs caractéristiques nous permettra non seulement d'affiner notre estimation de la prévalence mais également d'analyser l'impact économique de la vaccination. Le coût d'une stratégie de gestion étant un frein majeur à sa mise en place, il est nécessaire d'évaluer le bénéfice de la vaccination retiré par les éleveurs, en cherchant également à diminuer les coûts liés au suivi.

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 bénéficie du financement conjoint de l'INRA (Métaprogramme GISA, projet PICSAR) et de la région Midi-Pyrénées (projet PAROVLOT).

Bastida, Felix, et Ramon A. Juste. 2011. *Journal of immune based therapies and vaccines* 9 (1): 8.

Dhand, Navneet K., Wesley O. Johnson, Jeff Eppleston, Richard J. Whittington, et Peter A. Windsor. 2013. *Preventive Veterinary Medicine* 111 (1-2): 81-91.

Kawaji, Satoko, Douglas J. Begg, Karren M. Plain, et Richard J. Whittington. 2011. *Veterinary Microbiology* 148 (1): 35-44.

Nielsen, S.S., et N. Toft. 2008. *Veterinary Microbiology* 129 (3-4): 217-35.

Reddacliff, L, J Eppleston, P Windsor, R Whittington, et S Jones. 2006. *Veterinary Microbiology* 115 (1-3): 77-90.

Windsor, Pa, J Eppleston, Nk Dhand, et Rj Whittington. 2014. *Australian Veterinary Journal* 92 (7): 263-68.