

Mise en place d'une démarche de diagnostic différentiel des maladies abortives de première intention chez les petits ruminants : premiers éléments d'évaluation en Midi-Pyrénées

Renée de Cremoux, Institut de l'Élevage. BP 89. La Milliassolle. 81003 ALBI CEDEX

Céline Pouget, FODSA-GDS12. Avenue des Ebénistes. ZA Bel Air. 12 032 RODEZ CEDEX

Christophe Lacz, FRGDS Midi-Pyrénées. 96, rue des Agriculteurs. BP 102. 81003 ALBI CEDEX

A la suite de la définition d'un protocole national harmonisé de diagnostic différentiel des maladies abortives de première intention, une étude a été initiée en région Midi-Pyrénées sous l'égide de la Fédération Régionale des Groupements de Défense Sanitaire. Les travaux engagés doivent permettre d'évaluer la faisabilité de la démarche diagnostique, d'en estimer la pertinence au travers notamment des taux d'élucidation obtenus et d'identifier les éléments organisationnels, analytiques ou méthodologiques pouvant nécessiter une évolution. Les résultats obtenus peuvent en outre apporter des informations d'ordre épidémiologique grâce à une estimation de la fréquence relative des étiologies abortives de première intention dans la région. Il s'agit de surcroît de s'appuyer sur cette étude pour sensibiliser l'ensemble des acteurs à l'importance de la déclaration des avortements (participation à la surveillance événementielle de la brucellose ou d'autres maladies d'intérêt d'état telle que la fièvre Q) et de leur diagnostic (enjeux sanitaires et économiques autant que de santé publique).

Cette étude, pilotée par la Fédération Régionale des Groupements de Défense Sanitaire (FRGDS) de Midi-Pyrénées et cofinancée par le Conseil Régional, a été initiée en octobre 2013 pour une durée de 2 ans. De premiers éléments d'évaluation sont désormais disponibles.

1. Définition du protocole d'étude

1.1 - Principes généraux

Le caractère réglementaire de la déclaration des avortements et ses évolutions récentes (Arrêté du 10 octobre 2013 fixant les mesures techniques et administratives relatives à la prophylaxie collective et à la police sanitaire de la brucellose ovine et caprine) ont été pris en compte dans la définition de la démarche diagnostique. En particulier a été considéré comme un avortement potentiellement infectieux toute expulsion d'un fœtus ou d'un animal mort-né ou succombant dans les douze heures suivant la naissance, à l'exclusion des avortements d'origine manifestement accidentelle. De même, seules les séries d'avortements rapprochés dans le temps ont été considérées. Le critère d'alerte retenu pour ce faire a été fixé à 3 avortements enregistrés sur une période de 7 jours ou moins.

Sur le plan étiologique, cinq maladies abortives prépondérantes ont été intégrées au diagnostic : fièvre Q, chlamydie, toxoplasmose, salmonellose à *Salmonella Abortusovis* et Border Disease. La démarche adoptée repose sur la réalisation d'un diagnostic de groupe : elle s'appuie sur un ensemble d'analyses conduites sur plusieurs animaux et est fondée sur l'interprétation d'une combinaison de résultats.

La conception des arbres décisionnels s'est appuyée sur quelques principes généraux. L'accent a ainsi été mis sur le diagnostic direct (analyses moléculaires par PCR ou analyses bactériologiques selon l'agent recherché). Le recours au diagnostic indirect a été conçu comme complémentaire au diagnostic direct. Les analyses sérologiques ont alors eu pour objectif essentiel d'établir le caractère récent de la circulation des agents infectieux dans les troupeaux. Elles ont donc reposé soit sur l'évaluation de séroconversions ou plus largement de variations de titres sérologiques (chlamydie, toxoplasmose), soit sur la mesure des IgM (méthode de séroagglutination appliquée à salmonellose), soit sur l'établissement de la séroprévalence chez les femelles ayant avorté (fièvre Q) ou chez des individus sentinelles (Virus de la Border disease). Dans le cadre de l'étude, elles ont été conduites de manière systématique de façon à disposer simultanément des informations relevant des diagnostics direct et indirect. Il s'agissait ainsi de déterminer leur intérêt relatif et de disposer de premiers éléments descriptifs pour préciser leur interprétation.

1.2 - Mise en œuvre

Le protocole est mis en place dans l'ensemble des départements de Midi-Pyrénées en s'appuyant sur des cabinets vétérinaires motivés et volontaires. Des boîtes de prélèvements sont fournies pour faciliter le recueil standardisé des échantillons. Elles permettent en outre de répondre à la réglementation concernant le transport du matériel biologique (Norme UN 3373, triple emballage). L'acheminement sous froid est réalisé par Chronopost ou en recourant à un dispositif de navette lorsque celui-ci est mis en place localement.

Point déterminant du suivi des dossiers et des échantillons, l'identification des prélèvements est réalisée à l'aide d'étiquettes pourvues de codes-barres fournies en même temps que les feuilles d'accompagnement des prélèvements et la fiche de commémoratifs.

2. Analyse des commémoratifs

2.1 - Caractérisation des épisodes abortifs

Début octobre 2014, 45 séries d'avortements avaient été recensées et enregistrées. Elles ont concerné des élevages ovins allaitants dans 31 % des cas (N=14), ovins laitiers dans plus de 62 % des cas (N=25) et plus rarement caprins (N=3 ; 6,7%). La taille moyenne des troupeaux était de 357 adultes pour une centaine de femelles de renouvellement (taux de renouvellement moyen estimé à 35,6%). Dans 24 exploitations (54,5 %), on a relevé la présence d'un autre atelier, bovin le plus souvent (79,2 % des exploitations : atelier viande: N=17 ou atelier laitier: N=2).

Les interventions ont eu lieu à la suite d'en moyenne $7,2 \pm 4,4$ avortements (minimum de 1 avortement, maximum de 20 avortements) ce qui témoigne d'une bonne réactivité de la part des éleveurs. Ces épisodes abortifs ont concerné indifféremment des jeunes ou des adultes. Ils sont survenus majoritairement dans le dernier tiers de gestation (68 % ; N=28), voire au cours du dernier mois de gestation (60,5 % ; N=26) ou plus occasionnellement à deux ou trois mois de gestation (11,6% ; N=5).

2.2 - Gestion des épisodes abortifs : stratégies vaccinales et thérapeutiques

Dans une majorité d'élevages (N=31/45 soit 68,9 %), une stratégie vaccinale a été mise en place, celle-ci incluant le plus souvent la prévention contre la chlamydie (N=28 ; 62,2 %) à l'aide d'un vaccin vivant.

A la suite des avortements, une antibiothérapie a été mise en place dans 23 exploitations (51 %) en recourant majoritairement (N=20) à de l'oxytétracycline longue action, utilisée seule (N=17) ou en association avec d'autres molécules (N=3). Dans trois élevages, l'antibiothérapie a visé les femelles ayant avorté ou présentant une rétention placentaire. Dans l'ensemble des autres cas, il s'est agi de traiter soit les femelles les plus jeunes (agnelles et brebis de 1 ou 2 ans), soit les femelles gravides, soit encore l'ensemble du lot de mise-bas, avec par conséquent un objectif métaphylactique.

3. Analyse des résultats de laboratoire

3.1 - Diagnostic vis-à-vis de la fièvre Q

Coxiella burnetii a été détectée dans 22 exploitations (48,9%) témoignant du caractère enzootique de la fièvre Q. Néanmoins, parmi les analyses, individuelles ou en mélange, traitées en PCR quantitative (PCR-TR), aucune n'a eu de résultat supérieur au seuil diagnostique retenu pour pouvoir imputer des avortements à la fièvre Q (seuils de quantification fixés à 10^4 *Coxiella* sur écouvillon individuel et 10^3 sur mélange d'écouvillons). Des résultats restent à confirmer dans 4 exploitations supplémentaires présentant des résultats positifs mais pour lesquelles la quantification n'a pas été réalisée. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus sur une base plus large dans l'Aveyron dans le cadre du dispositif pilote fièvre Q : sur 239 cheptels, seuls 19 ont été conclus cliniquement atteints soit 7%.

La séroprévalence a été estimée sur la base de 9 à 10 analyses. 52,4 % des élevages (N=22) ont présenté au moins un animal séropositif. Cependant, la séroprévalence est restée inférieure à 50 % dans plus de 90 % des troupeaux (N=38/42).

En synthèse, la fièvre Q est présente dans 80 % des élevages de l'étude (ADN détecté et/ou séropositivité) mais l'infection ne circule que dans une faible proportion des cas (à ce jour et en l'attente de consolidation des résultats dans les cheptels manquants, ADN détecté et quantifiable dans 15,6 % des cas (N=7)). Sur l'échantillon étudié, elle n'apparaît pas comme responsable des séries d'avortements.

3.2 - Diagnostic vis-à-vis de la chlamydie

La chlamydie est présente dans 82 % des élevages étudiés :

- 76,7 % (N=33/43) des élevages ont présenté au moins une sérologie positive,
- 40 % (N=18/45) ont eu au moins une PCR positive et 26,7% (N=12) au moins deux PCR positives.

Les cheptels avec au moins une PCR positive ont fréquemment (70,6% des cas) eu un (41,2%) ou plusieurs (29,4%) animaux fortement séropositifs lors de la première série de prélèvements réalisés par le vétérinaire. Ils se sont également fréquemment caractérisés par la présence d'un (35,3%) ou plusieurs (29,4%) animaux dont les titres anticorps ont augmenté. *A contrario*, les cheptels sans PCR positive (N=21) n'ont majoritairement eu aucune augmentation des titres anticorps (81% des cas) (ou une au plus : 19 % des cas) et peu ou pas d'animaux fortement séropositifs

Des infections ont pu survenir y compris dans des cheptels ayant vacciné. A titre d'illustration :

- Parmi les 28 élevages ayant vacciné (62 %), 11 ont eu des PCR positives (39,2%),
- Parmi les 17 élevages ne vaccinant pas, 7 ont eu des PCR positives (41,2 %).

Les souches impliquées ont été typées pour 5 cheptels vaccinés avec 3 PCR positives. Dans l'ensemble de ces cas, c'est la souche sauvage de *Chlamydia abortus* qui a été mise en évidence. Outre le fait que le vaccin ne présente de caractère protecteur que pour les animaux qui ne sont pas déjà infectés (problématique notamment des jeunes issus de mères infectées et pouvant déjà être contaminés), ces résultats montrent l'importance de revoir les modalités de mise en œuvre de la stratégie vaccinale sur le terrain (conservation du vaccin, période et cible de la vaccination, ...).

En synthèse, la chlamydie est très répandue et reste une cause majeure d'avortement. Elle a été considérée comme la cause des séries avortements de manière certaine dans 31,8 % des élevages (N=14) et de façon fortement probable dans 4,6% des élevages (N=2) soit une implication dans 36,4 % des cas.

3.3 - Diagnostic vis-à-vis de la toxoplasmose

La toxoplasmose est présente dans 83,7 % des élevages étudiés :

- 81,4 % (N=35/43) des élevages ont présenté au moins une sérologie positive,
- 21,9 % (N=9/42) ont eu une PCR positive.

Les cheptels associés à une PCR positive ont eu majoritairement (87,5 % ; N=7/8) plus de 50% des animaux fortement séropositifs lors de la première série de prélèvements. On n'a observé en revanche que peu d'augmentations des titres anticorps (pas d'augmentation dans 71,4 %) car les animaux sont souvent apparus d'emblée fortement séropositifs. Parallèlement, les cheptels sans PCR positive n'ont présenté plus de 50 % d'animaux fortement séropositifs que dans 22,6 % des cas (N=7/31) avec présence de 3 animaux ou plus fortement séropositifs dans 19 % des cas. Ces résultats incitent à considérer la présence de plus de 50 % d'animaux sérologiquement fort positifs comme un élément de suspicion d'une imputation des avortements à la toxoplasmose.

Des infections ont pu survenir y compris dans des cheptels ayant vacciné ce que l'on peut illustrer notamment au travers de l'analyse des résultats de PCR :

- Parmi les 8 élevages ayant vacciné et pour lesquels des résultats de biologie moléculaire sont disponibles, un a eu une PCR positive,
- Parmi les 33 élevages ne vaccinant pas, 8 ont eu une PCR positive (24,2 %).

Il faut rappeler à ce propos que le dossier d'AMM du vaccin stipule que dans les cheptels vaccinés, si on réalise une échographie à 90 jours de gestation, 80 % des animaux sont viables contre 15 % dans les cheptels non vaccinés. C'est donc une réduction du risque et non une protection totale.

En synthèse, la toxoplasmose est très répandue et reste une cause majeure d'avortement. Elle a été considérée comme la cause des séries avortements de manière certaine dans 34,8 % des élevages (N=15) et de façon fortement probable dans 13,9 % des élevages (N=6) soit une implication dans 48,8 % des cas.

3.4 - Diagnostic vis-à-vis de la salmonellose

Aucune analyse bactériologique n'a été trouvée positive vis-à-vis de la salmonellose. Les titres sérologiques obtenus ont par ailleurs été inférieurs au seuil de 1/1280 pour toutes les analyses sauf une. Dans ce dernier cas, la circulation de la salmonellose a été considérée comme possible.

3.5 - Diagnostic vis-à-vis de la Border Disease

Les mélanges d'organes ont systématiquement été trouvés négatifs en PCR. Les analyses sérologiques conduites chez les animaux sentinelles ont toutes été négatives dans 89,5 % des élevages (N=34/38). Dans 2 élevages, la séroprévalence a dépassé 50 % témoignant d'une circulation de la Border disease au sein des cheptels.

3.6 - Synthèse

La procédure diagnostique a permis d'exclure *a priori* plusieurs des causes abortives recherchées :

- Pour les 32 séries d'avortements pour lesquelles une PCR quantitative a été réalisée, la fièvre Q a pu être exclue des étiologies suspectées en raison à la fois de résultats de PCR systématiquement inférieurs au seuil diagnostique voire inférieurs au seuil de quantification, et de séroprévalences majoritairement inférieures à 50 %. Des investigations restent à conduire pour 4 séries d'avortements avec PCR positives.

- La Border disease ne semble pas non plus en cause, avec des résultats majoritairement concordants entre diagnostics direct et indirect (séroprévalence élevée et circulation probable dans uniquement deux cheptels).

- Outre l'absence de signes généraux sur les femelles ayant avorté, l'absence de PCR positive vis-à-vis de la salmonellose et des titres sérologiques faibles à modérés, permettent d'exclure *a priori* la salmonellose abortive ovine.

Dans 7 élevages, une PCR négative accompagnée de sérologies toutes négatives à la fois au moment de l'intervention et 15 jours plus tard, permettent d'exclure la toxoplasmose.

Au total, dans l'échantillon étudié, **la chlamydie et la toxoplasmose ont constitué les principales causes abortives identifiées**. En plus de l'application des arbres décisionnels initiaux, la présence de plusieurs animaux fortement séropositifs a été analysée et prise en compte pour définir une hypothèse forte d'imputation de la série abortive à l'un ou l'autre de ces agents infectieux. De cette manière, on observe :

- une implication certaine ou fortement probable de la chlamydie comme seule cause abortive dans 12 élevages (26,7 %),
- une implication certaine ou fortement probable de la toxoplasmose comme seule cause abortive dans 17 élevages (37,8 %),
- une implication certaine ou fortement probable de la chlamydie et de la toxoplasmose dans 4 élevages (8,9 %).

Le taux d'élucidation est ainsi estimé à 73 %. Dans 9 des 12 élevages où aucune cause n'a réellement été identifiée, la circulation de différents agents abortifs a été mise en évidence : chlamydie (N=3), toxoplasmose (N=2), fièvre Q (N=4 dont 2 pour lesquels l'imputation de *Coxiella burnetii* reste à investiguer).

L'existence de co-infections ou co-circulations d'agents infectieux concerne plus de 30 % des élevages étudiés.

4. Conclusion

Bien qu'ils demandent à être consolidés, les résultats d'ores-et-déjà obtenus semblent montrer **qu'il est possible d'améliorer de manière tangible le taux d'élucidation des séries d'avortements sur une base de première intention** (taux estimé à 73 % sur les 45 séries étudiées) **en recourant à un protocole d'analyses rigoureux**. Les deux principales causes d'avortements ont été la chlamydie et la toxoplasmose, maladies abortives considérées comme prépondérantes chez les petits ruminants. La circulation parfois conjointe de plusieurs agents pathogènes a été observée dans de nombreux troupeaux (2 agents : N=10 ; 3 agents : N=4) et ne présage pas de l'étiologie de la série d'avortements. On confirme de fait le caractère enzootique de la chlamydie, de la toxoplasmose et de la fièvre Q dans les cheptels de petits ruminants de la région, et la possibilité de co-infections ou co-circulations (plus de 30 %).

Sur le plan des outils diagnostiques, les PCR apparaissent comme des outils pertinents. Une quantification et des grilles d'interprétation seraient intéressantes notamment pour la chlamydie. Les cinétiques d'anticorps sont apparues relativement peu pertinentes pour la toxoplasmose en raison d'un très fort niveau de séropositivité dès la première série d'analyses. En revanche, l'étude des titres anticorps et la fréquence des individus fortement séropositifs semblent intéressants à prendre en compte pour étayer ou confirmer l'hypothèse étiologique.

L'étude a en outre permis de rappeler l'importance de **ne pas exclure du champ des analyses, les maladies vis-à-vis desquelles l'éleveur a mis en place une stratégie vaccinale**. Outre le fait qu'une protection vaccinale n'est jamais acquise à 100 % et que la vaccination ne saurait protéger des femelles déjà infectées, ces résultats montrent qu'il est important de s'intéresser de manière précise à la mise en œuvre pratique de la vaccination : catégorie d'animaux concernés (en incluant boucs ou béliers), âge à la vaccination, rappels vaccinaux mais aussi conservation des vaccins, etc.

Au-delà de son intérêt pour préciser les protocoles diagnostiques, le travail engagé en Midi-Pyrénées devrait permettre également d'identifier, sur le plan logistique, les points critiques présidant à leur mise en œuvre en incluant les éléments de communication et de sensibilisation de chacun des acteurs.