

Université de Montréal

**Facteurs de risque d'introduction et diagnostic de**  
***Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis***

par Saray Julieth Rangel Valderrama

Département de sciences cliniques  
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire en vue de  
l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)  
en sciences vétérinaires option sciences cliniques

Avril, 2013

© Saray J Rangel V, 2013

## Résumé

*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) est l'agent causal de la paratuberculose, maladie entérique, chronique et incurable des ruminants, avec un impact économique important. Une meilleure compréhension des facteurs de risque associés à l'introduction de la maladie dans un troupeau est essentielle pour sa prévention. L'amélioration des tests diagnostiques est aussi importante pour son contrôle.

L'introduction des nouveaux animaux dans le troupeau et la présence et contact des différentes espèces sauvages et domestiques avec les vaches, semblent être des facteurs de risques d'introduction de la maladie. Nous avons réalisé une revue systématique dont l'objectif était de recueillir l'information pertinente pour répondre à la question sur l'importance de ces facteurs et leur impact sur l'introduction de la maladie dans un troupeau.

D'un autre côté, la détection de MAP dans les fèces par culture bactérienne demeure la méthode diagnostique de choix malgré les facteurs qui l'affectent. Une série de 3 étapes est requise afin de confirmer la présence du MAP : (1) culture (2) coloration, et (3) confirmation du MAP par PCR (si détecté à l'étape 2). Certains échantillons fécaux présentent une particularité en raison de leur forte charge de micro-organismes. Ces contaminants peuvent interférer avec la croissance et la détection de MAP. Une étude

visant à : a) estimer l'impact des certain covariables sur les résultats de la culture de MAP parmi l'analyse rétrospective d'un banque des données et b) évaluer la possibilité d'optimiser le processus de diagnostic du MAP en effectuant l'analyse PCR sur les cultures déclarées comme contaminées a été réalisée.

**Mots-clés** : Paratuberculose, contamination, transmission, prévention, diagnostic, culture, PCR.

## **Abstract**

*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) is the causative agent of paratuberculosis an enteric, chronic and incurable disease of ruminants, with a major economic impact. A better understanding of the risk factors associated with the introduction of the disease in a herd, is essential for its prevention. Improving diagnostic tests are also important for the control.

The introduction of new animals into the herd and the presence and contact of wild and domestic species with cattle, appear to be a risk factor for disease introduction. We conducted a systematic review to obtain relevant information to answer the question about the importance and impact of these factors on the introduction of the disease into a herd.

On the other hand, the detection of MAP in feces by bacterial culture remains the diagnostic method of choice despite of the factors that can affect it. A series of 3 steps are required to confirm the presence of MAP: (1) culture (2) acid fast stain (3) MAP confirmation by PCR (if detected in step 2). Some fecal samples exhibit a particularity due to their normal heavy load of micro-organisms. These contaminants can interfere with the growth and detection of MAP. A study to: a) assess the impact of some covariables on the culture results by a retrospective analysis of a databank and b) to evaluate the possibility to

optimize MAP diagnostic process by performing a PCR analysis on cultures declared as contaminated was realized.

**Keywords:** paratuberculosis, contamination, transmission, prevention, diagnosis, culture, PCR.

# Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des sigles et des abréviations.....	ix
<i>Dédicace</i> .....	x
Remerciements.....	xi
Introduction.....	1
Recension de littérature.....	5
Volet 1: Facteurs de risque associés à la contamination d'un troupeau.....	6
Volet 2 : Présence de contaminants dans la culture de MAP.....	13
Article.....	23
Abstract.....	25
Résumé.....	26
Introduction.....	27
Materials and Methods.....	29
Results.....	33
Discussion.....	38
References.....	55
Matériels et Méthodes.....	59
Résultats.....	72
Discussion.....	82
Conclusion.....	95
Bibliographie.....	97

## Liste des tableaux

**Tableau I** : Valeurs de sensibilité et spécificité de la culture fécale chez les bovins selon la phase de la maladie et le type de milieu de culture.

**Tableau II** : Tableau comparatif des caractéristiques de performance des milieux de culture.

**Tableau III** : Sélection des échantillons selon la distribution des résultats de culture.

**Tableau IV** : Tableau comparatif du mélange antibiotique et cocktails additifs utilisés dans les processus de culture de MAP.

**Tableau V** : Distribution de résultats selon les différentes possibilités dans la culture de MAP au LEAQ.

**Tableau VI** : Distribution des échantillons traités par mois.

## ARTICLE

**Tableau 1** : General data extracted from the articles included in the analysis.

**Tableau 2** : Study appraisal results.

**Tableau 3** : Results of manuscripts that studied the risk factors concerning purchase of cattle (question 1).

**Tableau 4** : Results and conclusions of manuscripts that studied the risk factor concerning wildlife and other domestic animal exposures (question 2).

## Liste des figures

**Figure 1 :** Graphique sur l'évolution de la paratuberculose.

**Figure 2 :** Diagramme d'association entre les différentes covariables associées au processus de culture de MAP.

**Figure 3 :** Protocole de traitement de fèces pour le système BACTEC™MGIT™960 ParaTB.

**Figure 4 :** Protocole de culture et confirmation de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

**Figure 5 :** Distribution des échantillons contaminées (n : 269) et des positifs (n : 61) selon le temps de détection.

**Figure 6 :** Distribution des cultures contaminées par ferme et mois.

**Figure 7 :** Effet de la ferme selon la distribution de la proportion de contamination et des limites de l'intervalle de confiance 95%.

## ARTICLE

**Figure 1 :** Flowchart of article selection process.



## Liste des sigles et des abréviations

AAR : alcool - acido résistant

AND : acide désoxyribonucléique

BACTEC<sup>TM</sup> MGIT<sup>TM</sup> : nom commercial système de culture *Mycobacterium growth index tube*

BHI : de l'anglais *Brain heart infusion*

ELISA : méthode immuno-enzymatique de l'anglais *enzyme-linked immunosorbent assay*

ESPII : nom commercial system de culture

EV : environnement

HEYM : milieu de culture *Herrold's egg yolk medium*

HPC : chlorure de hexadecylpyridinium

IC : intervalle de confiance

IS900 : nom de la famille d'une séquence d'insertion de MAP

FI : fèces individuels

LEAQ : Laboratoire d'épidémiosurveillance animale du Québec

LJ : milieu de culture Lowenstein- Jensen

MAP : *Mycobacterium avium* spp *paratuberculosis*

MAPAQ : Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et l'Alimentation du Québec

OR : Odds ratio

PCR : amplification en chaîne par polymérase

USDA : de l'anglais United States Department of Agriculture

## *Dédicace*

Je dédie cet ouvrage à mon époux Jairo  
qui a accepté de quitter sa terre natale pour entreprendre cette aventure  
et me permettre de réaliser mon rêve avec sa compagnie.

À mes parents Nancy et William, à mon frère Joshua  
et à tout ma famille, pour leur constant encouragement,  
leur soutien inconditionnel et pour toujours croire en moi.

Merci pour tout!

## Remerciements

Je tiens remercier Dr. Gilles Fecteau, mon directeur de recherche pour sa confiance, sa compréhension, son support et ses nombreux conseils toujours visant un travail de qualité et une ambiance agréable. Aussi à toute l'équipe de travail, Dre. Julie Paré, Dre. Elizabeth Doré, Dre. Geneviève Côté, Dr. Sébastien Bucksinski, Dr. Jean-Philippe Roy Dre. Olivia Labrecque, Dre. Julie-Hélène Fairbrother et Vincent Wellemans pour son aide et ses nombreuses connaissances qui ont enrichi mon expérience, et à tout le groupe de la faculté et le département qui m'ont accueilli très chaleureusement. Je souhaite remercier Dr. Olimpo Oliver qui a aidé à orienter ma carrière et a toujours eu à cœur de partager ses connaissances et sa passion pour cette belle profession.

Je tiens remercier le Ministère d'éducation, sport et loisir du Québec pour me octroyer la bourse qui m'a permis de développer mes études de maîtrise. Le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation de Québec, le Programme de Soutien à l'Innovation en Agroalimentaire et Pfizer Animal Health pour le financement de ces projets.

## Introduction

La paratuberculose est une maladie entérique chronique, incurable et contagieuse des ruminants domestiques ou sauvages. Le *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) est l'agent causal de la paratuberculose aussi bien connu comme maladie de Johne. MAP est une bactérie intracellulaire qui infecte les cellules du système immunitaire reliées à l'appareil digestif principalement, mais qui peut aussi infecter plusieurs tissus. Celle-ci va se loger dans la sous-muqueuse intestinale pour se multiplier. L'évolution clinique de la paratuberculose est lente (voir figure 1). MAP est excrété dans les fèces d'un animal infecté (phase sub-clinique). L'excrétion va devenir de plus en plus importante avec l'évolution de la maladie jusqu'à la phase clinique (de 2 à 7 ans plus tard) où l'excrétion de MAP pourra atteindre jusqu'à 100 millions de bactéries par gramme de matière fécale<sup>1</sup>. C'est dans le fait d'une évolution lente et une détection tardive que réside la nature insidieuse de la maladie. La plupart des animaux infectés vont excréter le MAP dans l'environnement et être éliminés du troupeau avant de démontrer les signes cliniques de la maladie : diminution des performances, diarrhée abondante, intermittente à chronique, amaigrissement malgré un appétit normal et pertes protéiques entraînant des œdèmes en parties déclives.

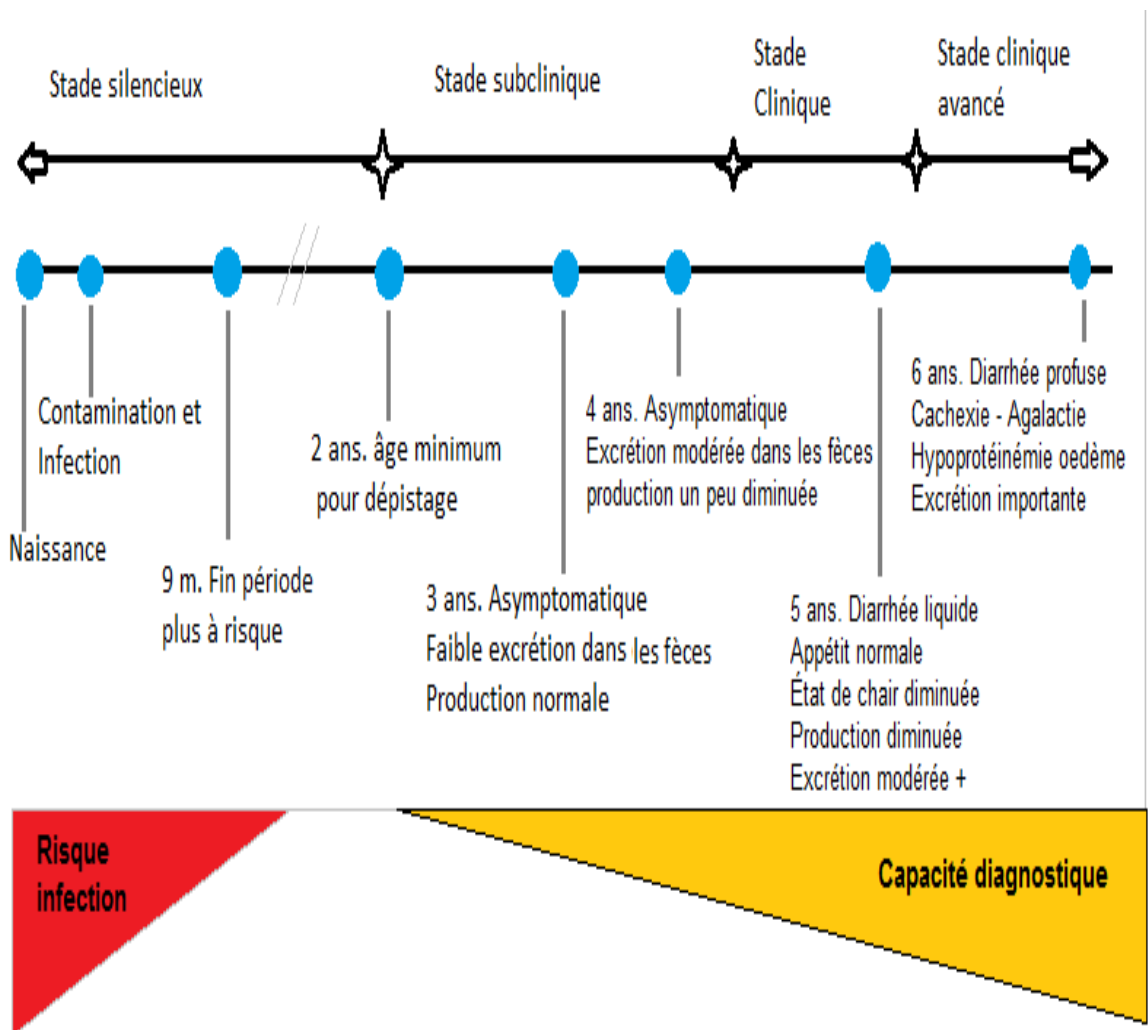
Les pertes économiques reliées à la maladie, ne sont pas faciles à estimer étant donné la progression lente de la maladie, la difficulté à estimer la prévalence et parce que la plupart des animaux infectés restent sub-cliniques longtemps<sup>2</sup>. Plusieurs études ont identifié les

principales causes des pertes, comme la diminution de la production laitière<sup>3,4</sup>, la diminution du prix de la carcasse<sup>4</sup>, taux de réforme plus élevé<sup>5, 6</sup>, la diminution de la performance reproductive<sup>7</sup> et les coûts liés au diagnostic et aux traitements<sup>4</sup>. Par exemple dans l'étude de McKenna et al<sup>8</sup>, ils ont estimé que étant donné une valeur réduite à l'abattoir et une réforme prématurée contribuaient aux pertes annuelles de \$1330 CAD par troupeau de 50 vaches. L'impact négatif sur la rentabilité des entreprises laitières, les barrières commerciales non tarifaires et les craintes d'une éventuelle zoonose (maladie de Crohn) maintiennent un intérêt pour la paratuberculose au Québec et ailleurs dans le monde.

Le volet 1 de ce document consiste essentiellement en la mise en évidence des facteurs de risque de transmission de la paratuberculose, plus spécifiquement ceux reliés à la contamination d'un troupeau indemne (l'introduction de la paratuberculose) spécialement dans les productions laitières. L'objectif était de recueillir l'information pertinente pour répondre à la question sur l'importance de ces facteurs et leur impact sur l'introduction de la maladie dans un troupeau. Afin de mieux comprendre la transmission de la paratuberculose entre les troupeaux pour dresser des stratégies de contrôle et prévention plus efficaces. Pour cibler les facteurs associés à l'introduction de la maladie ou le statut d'un troupeau, la recherche bibliographique a été orientée vers les facteurs reliés à l'achat de nouveaux animaux et la présence d'autres animaux domestiques ou sauvages sur la ferme.

Le volet 2 est dirigé vers le processus diagnostique de MAP avec l'analyse rétrospective des données pour évaluer les processus et la distribution des résultats des différents tests diagnostiques appliqués, aussi comme les covariables qui peuvent influencer les résultats. Le volet 2 est aussi dirigé vers la problématique que pose la présence de contaminants dans les cultures bactériennes et l'évaluation de l'application d'outils diagnostiques (comme la PCR utilisé comme méthode de confirmation), qui pourraient aider à obtenir de l'information des échantillons contaminés. L'objectif étant d'estimer l'impact des certain covariables sur les résultats de la culture de MAP et d'évaluer l'application de la technique PCR sur les cultures déclarées comme contaminées, afin d'améliorer le processus diagnostique de MAP qui est déjà difficile et dispendieux.

**Figure 1.** Graphique sur l'évolution de la paratuberculose (Courtoisie Dr. Gilles Fecteau)



## Recension de littérature

Le *Mycobacterium avium* spp *paratuberculosis* (MAP) est la bactérie responsable de la maladie connue comme paratuberculose ou maladie de Johne ainsi nommée pour John McFadyean en 1906 en reconnaissance du travail accompli par le Dr. Heinrich Albert Johne en 1894 sur les premières descriptions de la maladie et de son agent causal<sup>9</sup>. La paratuberculose est une entérite chronique des ruminants autant domestiques que sauvages. Les souches de MAP peuvent être divisées en deux grands groupes ou types de souches, qui peuvent être définis en fonction de leurs caractéristiques de croissance, la préférence de l'hôte et de la pathogénicité<sup>10</sup>. Historiquement, ces types de souches ont d'abord été nommées en fonction de l'espèce dont ils ont d'abord été isolées, et ont été désignés comme « Cattle » (C) pour le bétail et type « sheep » (S) pour les moutons. Cependant, comme le typage des souches est devenu plus largement appliqué, il est évident que le MAP a pu être isolé à partir de nombreuses espèces et que l'espèce d'origine n'est pas nécessairement un indicateur précis du type de souche<sup>10</sup>. Donc, les bovins, les chèvres, les cerfs, les camélidés et d'autres espèces d'animaux sauvages et aussi les moutons peuvent être infectés par le type C, tant que les moutons sont infectés par le type S.



## **Volet 1: Facteurs de risque associés à la contamination d'un troupeau**

Étant donné que la paratuberculose est une maladie incurable et difficile à diagnostiquer, l'outil principal pour son contrôle est la prévention de la contamination des troupeaux sains et la diminution de la dissémination de la maladie dans les troupeaux déjà infectés.

Les veaux sont considérés comme plus susceptibles à l'infection<sup>11</sup> et la période néonatale est considérée importante dans le risque d'infection. Une étude récente sur les facteurs de risques associés à la transmission de la paratuberculose dans les troupeaux<sup>12</sup> a identifié la voie féco-orale comme la principale route de transmission, suivi de la consommation de colostrum ou lait de vaches sub-cliniques ou cliniquement infectées<sup>13, 14</sup>. Il faut considérer aussi la possibilité d'une infection *in utero*<sup>15</sup>. Toutefois, les facteurs de transmission à l'intérieur du troupeau ne sont pas les seuls à considérer. Avant de contrôler la contagiosité dans le troupeau, il est pertinent d'explorer la façon dont le troupeau devient contaminé. L'achat ou l'introduction des animaux<sup>16, 17</sup> semble être le principal facteur de risque associé à l'introduction de la maladie dans un troupeau indemne. L'animal introduit est généralement infecté de façon sub-clinique<sup>18</sup> et excrétera des bactéries dans l'environnement pendant plusieurs années avant d'être détecté<sup>19</sup>. Il deviendrait une source importante de MAP pour les autres animaux. La principale raison pour l'achat des animaux est l'expansion du troupeau et l'acquisition des animaux de remplacement (parfois causé

par le haut taux de réforme associé à la paratuberculose). À travers l'Amérique du Nord et l'Europe, la taille des troupeaux laitiers est en expansion depuis 2 ou 3 décennies<sup>2</sup>. Plusieurs troupeaux ne peuvent pas accomplir cette croissance en produisant leurs propres génisses, et ils doivent acheter des animaux. En plus, l'achat des animaux est nécessaire pour réapprovisionner une ferme qui a souffert de dépopulation causée par une autre maladie, ou pour acquérir des animaux de grande valeur génétique. Par exemple, au Québec, selon une enquête réalisée en 2002, 46% des producteurs ont affirmé avoir acheté des animaux au cours des douze derniers mois<sup>20</sup> et en 2010 ce chiffre a augmenté jusqu'à 54,3%<sup>21</sup>. Aux États-Unis, 45.7% des troupeaux ont introduit des nouveaux animaux<sup>22</sup>. L'achat des sujets est donc fréquent et en croissance dans les troupeaux laitiers.

L'achat des animaux d'une source externe devient un problème étant donné que l'infection par le MAP peut être asymptomatique. Le MAP est souvent non détecté par les tests diagnostiques en particulier chez les sujets en phase sub-clinique. Le commerce des animaux avec statut présumé négatif ne donne pas un haut niveau de certitude que l'animal n'est pas infecté par le MAP. Par contre, la meilleure façon d'avoir une garantie plus raisonnable (le niveau d'assurance est relié à la sensibilité du test utilisé et à l'étape de la maladie) que les animaux ne soient pas infectés est le dépistage du MAP à l'échelle du troupeau d'origine<sup>18, 23</sup>. Cependant, le faible nombre de troupeaux avec un statut négatif connu (tests-négatifs répétés), ou au moins participants à un programme de contrôle pour déterminer son statut, fait de l'acquisition des animaux « sains » un objectif difficile à

accomplir<sup>18</sup>. Au Québec, 17.8% des troupeaux laitiers ont participé au programme volontaire de prévention et de contrôle de la paratuberculose en 2011<sup>24</sup>. Selon le USDA<sup>22</sup>, 11.2% de producteurs aux États-Unis ont participé dans un programme de contrôle de la maladie en 2002.

Différentes études ont démontré une association directe entre le comportement d'achat et la présence de la maladie dans le troupeau. Par exemple, Correia-Gomes et al<sup>25</sup>, dans leur étude ont trouvé que les variables comme « troupeaux qui ont acheté des bovins au cours des quatre dernières années » et « contact entre bovins provenant de différents troupeaux » ont été significativement associées avec le statut de MAP déterminé par un test ELISA sur le lait, OR = 2.12 (95% CI=1.23-3.68) et OR = 3.47 (95% CI=1.60-7.56) respectivement. Wells et al<sup>18</sup>, ont aussi trouvé que les fermes laitières dans lesquelles plus de 25% des vaches du troupeau sont nées sur d'autres fermes avaient 2,1 plus de chances (95% IC 1.3 – 3.5) d'avoir un statut de troupeau positif pour le MAP que les fermes laitières dans lesquelles aucune vache n'était née dans une autre ferme. Ils ont établi aussi que les fermes avec un pourcentage d'achat (vaches nées dans une autre ferme) entre 0 et 25% ont un risque intermédiaire d'avoir un statut positif (OR : 1,6; 95% IC 1.0 – 2.7).

Un autre facteur de risque important dans la prévention de la contamination d'un troupeau indemne est le contact des vaches ou veaux avec des excréments d'animaux infectés, y compris la faune sauvage. La paratuberculose clinique a été diagnostiquée chez plusieurs

espèces<sup>26</sup>, comme des cerfs<sup>27</sup> ou les lapins<sup>28</sup> et autres animaux domestiques comme les moutons<sup>29</sup>. MAP a été isolé à partir de différents espèces des ruminants et non-ruminants sauvages<sup>30-33</sup> (par exemple, renards (*Vulpes vulpes*), belettes (*Mustela nivalis*), souris de bois (*Apodemus sylvaticus*), rats (*Rattus norvegicus*), lièvre marron (*Lepus europaeus*), et corbeau (*Corvus corone*)), et chez certains animaux comme chats, raton-laveur et souris et aussi chez les moutons et les chèvres qui peuvent être fréquemment en co-pâturage avec des bovins infectés ou autour des troupeaux diagnostiqués positifs<sup>16</sup>. La principale souche de MAP infectant les animaux sauvages, spécialement les non-ruminants est la souche C (Cattle). C'est généralement la souche prédominante chez les ruminants dans la même région qui circule chez les animaux sauvages<sup>34</sup>. Dans l'étude de Stevenson<sup>35</sup> la souche isolée chez les animaux sauvages était la même que chez les vaches. Le rôle potentiel de la faune sauvage dans l'épidémiologie et la transmission de MAP (comme vecteur de la maladie) est évidente mais la question sur le risque que les bovins infectés posent sur les populations des animaux sauvages demeure ouverte. Les animaux sauvages sont-ils plus susceptibles d'être infectés par les bovins que vice-versa? Si l'infection persiste pour longtemps dans une population d'animaux sauvages, et qu'il existe une route de transmission possible entre l'hôte sauvage et le bétail, il faut donc inclure dans les stratégies de contrôle de la maladie les risques associés au contact entre le bétail et la faune sauvage<sup>34</sup>.

La relation entre la présence de MAP dans les espèces sauvages et la présence du MAP dans les troupeaux, suggère que la transmission inter-espèces est possible<sup>35, 36</sup>. La transmission surviendrait principalement par voie féco-orale, soit par ingestion de matière fécale des animaux sauvages infectés ou par consommation des aliments contaminés à la ferme. Les bovins qui vont au pâturage, ont tendance à éviter les pâtures contaminées avec des fèces provenant d'autres espèces domestiques ou sauvages. Par contre, les fèces de lapins sont ingérées sans discrimination par les bovins<sup>37, 38</sup>. Il a été démontré que les lapins spécialement en Europe présentent une haute prévalence d'infection par le MAP<sup>39</sup>. Donc, la possibilité de transmission inter espèces et l'implication de la faune sauvage (spécialement les lapins) dans l'épidémiologie de la paratuberculose a des implications très importantes pour le contrôle de la maladie<sup>39</sup>. Ce risque de contact et transmission entre les deux espèces (vaches et lapins) pourrait être étudiée pour établir des interactions similaires avec d'autres espèces sauvages.

L'autre mode de contamination d'un troupeau est à travers les matières fécales de rongeurs et oiseaux ou autres animaux sauvages qui peuvent contaminer les aliments pendant le storage à la ferme. Daniels et al<sup>40</sup>, dans une étude de quantification de la contamination fécale dans 4 fermes en Ecosse, ont calculé la charge de matière fécale dans les aliments stockés et ils ont trouvé une moyenne de 79.9 fèces de rongeurs / par m<sup>2</sup> d'aliment / mois et 24.9 fèces d'oiseau / m<sup>2</sup> d'aliment / mois. Aussi, ils ont estimé qu'un individu (vache) peut rencontrer 1626 fèces de lapin pendant l'hiver. Si on considère que les fèces peuvent être

contaminés avec MAP, la présence de fèces dans les aliments pourrait être un risque important pour la transmission de la maladie. Comme décrit dans l'étude de Corn et al<sup>41</sup>, des fèces de rongeurs infectés par MAP ont été aussi trouvées associés aux troupeaux laitiers au Wisconsin. En considérant que les vaches ne sont pas très discriminantes dans la préhension alimentaire et que les fèces de lapins ne sont pas évitées par les vaches, ce type de contamination peut maintenir l'infection dans un troupeau<sup>34</sup>. Ce type d'animaux (rongeurs, oiseaux, lapins) peuvent se promener d'une ferme à l'autre et contribuer à l'introduction de MAP dans des troupeaux indemnes.

Le contrôle des animaux (domestiques ou sauvages) et le contrôle du contact avec ces animaux, sont les deux outils pour réduire la possibilité de transmission inter-espèces. La réduction du contact entre espèces comme méthode de contrôle devient difficile et long à suivre<sup>34, 42</sup>. Pour les espèces de plus grand taille, l'utilisation de barrières physiques entre les animaux ou dans les endroits de conservation des aliments pourrait aider à prévenir des contacts. Mais avec des espèces de taille plus petite, le contrôle dépend de plusieurs facteurs reliés au comportement de l'espèce à contrôler et requerrait une analyse plus spécifique et détaillé de la situation.

En conclusion la haute prévalence de MAP chez plusieurs espèces sauvages et domestiques qui ont une interaction avec les vaches laitières, suggère que ces animaux jouent un rôle actif dans l'épidémiologie de la paratuberculose. Ce rôle est difficile à prouver en raison de

la longue période d'incubation de la maladie et de la présence concomitante d'autres facteurs de risque. Ces espèces peuvent représenter un défi important dans les efforts de contrôle.

Dans le but d'améliorer et enrichir la compréhension du rôle joué par ces facteurs de risque dans l'épidémiologie de la paratuberculose, nous avons réalisé une revue systématique de la littérature présentée dans l'article de ce mémoire.

## **Volet 2 : Présence de contaminants dans la culture de MAP**

### **Le diagnostic de la paratuberculose**

Les tests diagnostiques pour détecter la paratuberculose peuvent être classifiés en ceux qui identifient la bactérie de façon directe et ceux qui identifient la réaction immunologique contre la bactérie. Il est important de noter que l'efficacité du diagnostic de la paratuberculose dépend du test mais aussi du stade de l'infection.

### ***Détection directe de l'organisme***

#### **Culture**

Différents substrats et différents systèmes commerciaux sont utilisés pour la culture de MAP. Elle peut être faite à partir d'échantillons de tissus infectés, du lait<sup>43</sup> ou de matières fécales (individuelles, en groupe ou de l'environnement)<sup>44</sup>. La culture fécale individuelle peut être utilisée comme méthode standard. Plus d'information sur ce sujet se trouve plus bas dans ce volet.

#### **Amplification en chaîne par polymérase (PCR)**

Cette technique est beaucoup moins longue que la culture. Cependant elle est souvent moins sensible que la culture si fait directement dans les fèces, due à la présence d'inhibiteurs dans les matières fécales<sup>45</sup>. Cette technique est aussi utilisée pour confirmer des résultats positifs de culture fécale et sa performance devient plus importante. Ils



existent beaucoup des techniques PCR utilisés pour le diagnostic de MAP, soit PCR conventionnel, Nested-PCR, PCR en temps réel et PCR-Multiplex<sup>45, 46</sup>. Des différentes recommandations ont été établies quant à l'utilisation de ces tests pour le diagnostic de la paratuberculose<sup>45</sup>. La PCR peut apporter des résultats confondus due à la contamination des échantillons<sup>47</sup>.

### **Biopsie**

Cette technique permet de détecter MAP à partir de la biopsie de l'iléon principalement et des nœuds lymphatiques mésentériques ainsi que l'observation d'anomalies histologiques<sup>43</sup>.

### ***Détection basse sur la réponse immunitaire***

#### **ELISA**

Cette technique est fondée sur la mise en évidence de la réaction immunitaire suite à la présence de MAP et la détection de la densité optique des anticorps spécifiques à MAP dans le sérum ou le lait<sup>48</sup>. L'ELISA est fréquemment utilisé, vu la facilité d'obtenir les échantillons, la rapidité des résultats et le coût. Un des inconvénients des tests ELISA est sa sensibilité relativement faible (43-59%) par rapport à la culture fécale, menant à des résultats faux-négatifs qui dépend aussi du statut de la maladie. La spécificité du test est généralement en haut de 95%<sup>48</sup>.

## **La culture fécale et les contaminants**

La nature insidieuse de cette maladie et l'interaction entre l'agent pathogène et l'hôte sont des facteurs qui limitent le diagnostic, surtout en phase sub-clinique. La détection de MAP dans les fèces par culture bactériologique demeure la méthode diagnostique de choix sur l'animal vivant malgré une sensibilité relativement faible et variable (39 à 94%)<sup>49, 50</sup> (voir tableau I) selon le type de culture, le type de milieu et la progression clinique de la maladie. Il y a deux types de milieu de culture, le milieu solide : moins dispendieux, requérant moins d'instrumentation, identification de MAP plus facile, mais temps d'incubation plus long 12-20 semaines et moins sensible (39-82%), et le milieu liquide : incubation plus rapide (8-12 semaines), plus sensible (54-90%), mais plus dispendieux, plus sensible à la contamination et requérant instrumentation spéciale et méthodes additionnelles pour la confirmation de MAP<sup>49, 50</sup> (Tableau II).

**Tableau I.** Valeurs de sensibilité et spécificité de la culture fécale chez les bovins selon la phase de la maladie et le type de milieu de culture.

		Sensibilité	Spécificité
<b>Milieu Solide</b>	Valeurs générales	39% <sup>49</sup> - 82% <sup>49</sup>	98% <sup>51</sup> - 100% <sup>49</sup>
	Phase sub-clinique	45% <sup>52</sup> - 72% <sup>51, 53</sup>	98% <sup>51</sup> - 100% <sup>52</sup>
	Phase clinique	91% <sup>51</sup>	100% <sup>51</sup>
<b>Milieu Liquide</b>	Valeurs générales	80% <sup>49</sup> - 94% <sup>49</sup>	95% <sup>51</sup> - 100% <sup>49</sup>
	Phase sub-clinique	54% <sup>52</sup> - 65% <sup>51</sup>	95% <sup>52</sup> - 99% <sup>51</sup>
	Phase clinique	93% <sup>51</sup>	95% <sup>51</sup>

**Tableau II.** Tableaux comparatif des caractéristiques de performance des milieux de culture

Milieu Liquide	Milieu Solide
Plus dispendieux (instrumentation)	Moins dispendieux (moins d'instrumentation)
Incubation plus rapide (8-12 semaines)	Incubation lente (10 -20 semaines)
Plus sensible <sup>49</sup>	Moins sensible <sup>49</sup>
Besoin d'identification formelle (coloration et/ou PCR)	Identification de MAP plus simple (visualisation des colonies)
	Dépendance au mycobactin identifiable

La culture traditionnelle de MAP comme pour les mycobactéries à croissance lente, comporte 4 étapes principales<sup>49</sup>:

1. La décontamination du prélèvement fécal, pour diminuer voire éliminer les microbes impertinents à croissance généralement plus rapide.
2. L'incubation prolongée dans un milieu approprié contenant des agents antimicrobiens pour supprimer les microbes (contaminants) encore présents.
3. La reconnaissance des colonies de MAP dans un milieu solide ou d'un signal particulier dans un milieu liquide.
4. L'identification de MAP de façon phénotypique ou génotypique.

La culture de fèces est considérée comme la méthode de référence pour la détection de MAP, mais la méthode est longue et imparfaite, aussi l'identification formelle ou le résultat final nécessite une confirmation par une autre technique comme la coloration et la PCR. Pour certains échantillons, la présence de contaminants, peut interférer avec la croissance de MAP et laisser l'échantillon avec un résultat sans valeur diagnostique : « Contaminé ». La définition de contamination n'est pas clairement établie dans la littérature, une croissance légère de d'autres microorganismes<sup>49</sup>, une culture mixte de MAP avec d'autres organismes<sup>54, 55</sup> ou une croissance démesurée de d'autres microorganismes<sup>56, 57</sup>. Les contaminants vont interférer avec la culture de différentes façons. Dans les milieux de culture solide la présence des colonies des contaminants nuisent à la reconnaissance des

colonies de MAP en changeant les caractéristiques ou parce qu'elles cachent les colonies. Les contaminants peuvent tout simplement empêcher la croissance de MAP (plus lente) par compétition pour les substrats. Finalement si on tient en compte de tous ces facteurs, la présence de contaminants compliquent, retardent et augmentent les coûts associés à la culture de MAP<sup>49</sup>.

La littérature rapporte des taux de contamination très variables selon le type de milieu et le protocole de décontamination utilisé. Par exemple, dans les milieux solides comme HEYM (Herrold's egg yolk medium) et LJ medium (Lowenstein Jensen) le taux de contamination varie entre 0.13% et 60%<sup>54, 56-58</sup>, de la façon suivante : 0.13% des échantillons traités avec un protocole de décontamination incluant la centrifugation de l'échantillon et l'utilisation de NaOH (hydroxyde de sodium) – OA (acide oxalique) dans un milieu LJ<sup>58</sup> ou 13-14% dans les milieux LJ et HEYM avec centrifugation et NaOH-OA<sup>56</sup>, ou 30% dans un milieu HEYM avec un traitement de sédimentation – centrifugation incluant HPC (Chlorure de hexadecylpyridinium) comme agent décontaminant<sup>57</sup>, ou encore 26% et 60% d'échantillons contaminés dans un milieu HEYM incluant sédimentation – centrifugation et HPC dans le protocole de décontamination<sup>54</sup>. En plus, dans les milieux liquides comme le BACTEC où les protocoles de décontamination utilisent la sédimentation et le HPC comme agent décontaminant, le taux de contamination est aussi très variable entre 3.9% et 63%<sup>47, 55, 59</sup>. Donc, on ne peut pas seulement attribuer les taux de contamination aux types de milieux de

culture et protocoles de décontamination. Cette variation met en évidence qu'il y a d'autres facteurs qui vont influencer la présence de contaminants dans la culture de MAP.

La présence des contaminants dans la culture de MAP est un problème fréquent étant donné la haute charge des microorganismes dans les fèces ou dans un échantillon de l'environnement. Tous les protocoles de culture incluent un processus de décontamination afin d'éviter la croissance des microorganismes autres que le MAP. La décontamination a aussi un effet délétère sur la viabilité et la survie de MAP, environ 99% des organismes de MAP viables peuvent être tués ou perdus pendant le processus<sup>49</sup> soit pour l'utilisation des antibiotiques ou pour l'effet des différentes étapes de sédimentation et/ou centrifugation. Par exemple, les protocoles incluant NaOH peuvent réduire la concentration de MAP dans des fèces bovines en 1-4 logs dans 4 h; cependant, les solutions de HPC jusqu'à 1% semblent ne pas affecter la viabilité du MAP<sup>44, 49, 60</sup>.

Whittington en 2009<sup>47</sup> a étudié les facteurs affectant la procédure d'isolement de MAP, la fréquence de croissance de micro-organismes non pertinents et l'effet de ces derniers sur l'identification de MAP chez les moutons (souche S). Environ 15 000 échantillons de fèces et de tissus dans 1421 fermes sur une période de 10 ans ont été étudiés. Un taux de contamination variant de 1.7 à 11% avec une moyenne à long terme de 7% a été observé. Des groupes d'échantillons provenant de certaines fermes, endroits ou soumissions

semblent plus souvent contaminés que d'autres. La présence de ces contaminants peut varier selon la diète du troupeau, la localisation géographique, la saison ou encore avec le type de milieu de culture (milieu liquide plus sensible)<sup>47, 49</sup>. Whittington a conclu que pour diminuer les contaminants certains facteurs sont vraiment importants : 1) la période d'incubation dans la solution antibiotique, 3 jours étant plus efficace que 2 jours. 2) diminuer la présence des particules fécales (sédimentation plus longue) dans le milieu de culture. 3) l'addition d'ampicilline au milieu de culture a réduit significativement le taux de contamination de 26% dans les cultures fécales sans ampicilline à 8% dans les cultures où l'ampicilline a été ajoutée ( $P < 0.001$ ). Un autre élément important dans son étude a été l'évaluation de l'utilisation de la PCR comme méthode de confirmation. Les contaminants ont interféré avec la PCR pour l'inhibition de l'amplification d'IS900. Les cultures contenant des bactéries non pertinentes étaient deux fois plus susceptibles d'avoir besoin d'une étape additionnel de purification de l'ADN, effectué à partir du lysat sur une colonne de silice pour éliminer les inhibiteurs de la PCR résiduels afin d'obtenir un résultat fiable.

La PCR comme méthode diagnostique est disponible depuis quelques années<sup>45</sup>. La reconnaissance de la séquence d'insertion IS900 (appelé comme ça pour le numéro de la famille de séquence d'insertion) comme étant unique à MAP a permis de créer plusieurs tests associés à l'identification et amplification de ce séquence en particulier. À son début, la PCR comme méthode de détection de MAP directe dans les fèces n'avait pas une performance acceptable pour être une alternative aux tests diagnostiques classiques comme

la culture<sup>43, 50</sup>. Auparavant l'application directe de la PCR sur le matériel de l'échantillon (fèces) conduit à l'inhibition de la réaction de la PCR et montre des résultats faux-négatifs<sup>50</sup>. Depuis quelques années la recherche sur la PCR a progressé considérablement quant à la technique et les méthodes d'extraction d'ADN<sup>45, 46, 61-63</sup>. Plusieurs études ont comparé la performance de la PCR avec la culture<sup>61, 62, 64, 65</sup> mais les résultats sont souvent contradictoires, certains ont conclu que la culture demeure plus sensible que la PCR et d'autres semblent suggérer que la PCR démontre la même sensibilité et spécificité que la culture. Toutefois, quand la PCR est appliquée directement sur des colonies bactériennes provenant de culture pour confirmer l'identité des bactéries AAR cultivés, la sensibilité et la spécificité du test sont près de 100%<sup>45, 50</sup>.

Kim et al<sup>66</sup> dans leur étude ont utilisé une PCR conventionnelle et une en temps réel sur la base de la séquence IS900 comme tests de confirmation pour *M. paratuberculosis* dans un milieu de culture liquide ESP II (Nom commercial du système de culture). Il n'y avait pas de différences entre les résultats des tests de PCR conventionnels et en temps réel. Au cours de la période d'incubation de 5 semaines, si bacilles acido-résistants (AAR) ont été détectés dans des échantillons de culture ESP positives, une IS900-PCR a été réalisées pour confirmer si celles bactéries sont de *M. paratuberculosis*. A la fin de 5 semaines d'incubation, une coloration AAR a été effectuée sur toutes les cultures ESP II-négatifs pour dépister les cultures faussement négatives; et des tests PCR IS900 ont été réalisés sur les cultures AAR-positifs. Finalement, pendant une période de 1 an, sur un total de 18,499



cultures ESP II, 2,814 (15,2%) tests de confirmation par PCR ont été réalisées. Parmi ces PCR, 2,259 (80%) étaient les deux ESP et PCR positive, 104 (4%) ont été ESP positifs mais négatifs à la PCR, 423 (15%) étaient ESP négatifs mais positives à la PCR, 28 (1%) étaient à la fois ESP et PCR négatif. L'étape de coloration AAR après 5 semaines d'incubation a produit 423 (15%) plus de cultures PCR-positives. Sur un total de 2,814 cultures AAR positifs, 132 (5%) n'ont pas été confirmé comme *M. paratuberculosis*, ce qui suggère la présence d'autres mycobactéries dans l'échantillon et souligne l'importance de la PCR comme outil additionnel pour l'identification spécifique de MAP.

Le diagnostic de MAP est en évolution et amélioration constante. Malgré tous ces avancements il reste encore un ou plusieurs défis, étant donné le long cours, le caractère insidieux de la maladie et aussi tous les facteurs qui affectent l'efficacité (performance globale) des tests diagnostiques et la détection précoce des animaux infectés pour améliorer le contrôle de la paratuberculose.

**Article**

Soumit à

**La Revue Vétérinaire Canadienne**

Le 8 Juillet 2013

## **A Systematic Review of Risk Factors Associated with the Introduction of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP) into Dairy Herds**

Saray J Rangel<sup>1\*</sup>, Julie Paré<sup>2</sup>, Elizabeth Doré<sup>1</sup>, Juan C Arango<sup>1</sup>, Geneviève Côté<sup>3</sup>, Sebastien Buczinski<sup>1</sup>, Olivia Labrecque<sup>3</sup>, Julie H Fairbrother<sup>3</sup>, Jean P Roy<sup>1</sup>, Vincent Wellemans<sup>1</sup>, Gilles Fecteau<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

<sup>2</sup>Agence Canadienne d'inspection des aliments, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

<sup>3</sup>Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

**Short title:** Paratuberculosis risk factors of introduction.

**Key words:** Johne's disease, Contamination, Transmission, Prevention.

**\*Corresponding author:** Saray Rangel, DMV, Département de Sciences cliniques, Faculté Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Pavillon 1500 des vétérinaires. C.P 5000, Saint-Hyacinthe, QC, Canada, J2S 7C6;

The work was done in Saint-Hyacinthe, Québec, Canada at the Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal.

This study was supported by the "Programme de Soutien à l'Innovation en Agroalimentaire du ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec.

### **Abbreviations:**

CI: Confidence interval

CR: Count ratio

HEYM: Herrold's egg yolk medium

IFC: Individual fecal culture

JD: Johne's disease

MAP: *Mycobacterium avium* spp. *Paratuberculosis*

MFR: Milk sock filter residue

MP: Mean probability

N/A: not applicable.

OD: Optical density

OR: Odds ratio

PCR: Polymerase chain reaction

PTB: Paratuberculosis

ZINB: Zero-inflated negative binomial model

## **Abstract**

A better understanding of the risk factors associated with the introduction of paratuberculosis is essential for its prevention. The objective was the systematic collection and appraisal of the scientific evidence related to risk factors associated with the introduction of MAP into a herd.

An electronic search was conducted to collect relevant references to address 2 specific questions. The screening was done based on titles, abstracts and selected studies were fully analyzed.

Seventeen manuscripts published between 1996 and 2011 were finally analyzed. Unit of interest was mainly the herd (n = 17). The specific description of the risk factors studied was variable between studies. The principal study design was cross-sectional (n = 15).

Purchase of animals is the most documented risk factor. On the other hand, this review did not find enough strong evidence to support that contact between wildlife/domestic animals and cattle is a significant risk factor for MAP infection.

## **Résumé**

La compréhension des facteurs de risque associés à l'introduction de la paratuberculose est essentielle pour sa prévention. L'objectif était la collecte et l'évaluation systématique des preuves scientifiques liées à des facteurs de risque associés à l'introduction de MAP dans un troupeau.

Une recherche électronique a été réalisée pour trier des publications afin répondre à 2 questions. La sélection a été effectuée en se basant sur les titres, les résumés, et les études choisies ont été entièrement analysés.

Dix-sept manuscrits publiés entre 1996 et 2011 ont été sélectionnés. L'unité d'intérêt a principalement été le troupeau. Les descriptions des facteurs de risque étudiés étaient variables entre les études.

L'achat d'animaux est un facteur de risque bien documenté confirmant l'introduction de la paratuberculose dans le troupeau. Par contre, il n'y a pas suffisamment de preuves pour soutenir que le contact entre animaux domestiques / sauvages et le bétail est un facteur de risque important.

## Introduction

*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) is the causative agent of paratuberculosis, also called Johne's disease (JD). Paratuberculosis is an enteric, chronic and incurable disease of ruminants that occurs most commonly in dairy cattle(1) and causes significant economic loss(2). Besides, an association between Crohn's disease in humans has been described, although causality remains to be proven(3),(4).

Transmission of MAP is primarily through the feco-oral route(5), although the infection can also occur *in utero*(6) or via ingestion of contaminated colostrum or milk(7),(8). However prior to control the in-herd contagiousity, it is relevant to explore how a herd becomes infected. We postulate that purchasing cattle or introducing animals could be a risk factor. Purchase or introduction of cattle(9, 10) seems to be the major risk factor associated with the introduction of the disease. The animal introduced is usually subclinically infected(11) and will shed the bacteria and contaminate the environment for several months to years before the clinical signs appear.

The contact with feces of infected animals including wildlife, such as rabbits(12), is also considered a risk factor for the introduction of MAP into herds. MAP has been isolated from different ruminant and non-ruminant wild-species(13-16) and in some domestic animals like sheep and goats(4) that may be co-grazing with infected cattle or around positive diagnosed herds(9). In one study, the strain isolated in wild animals was the same

as in cattle(17) showing the potential role of wildlife in the epidemiology and transmission of MAP to livestock. We would like to clarify if the presence of wildlife or domestic animals on the farm/pasture is a risk factor.

Due to the long course of the disease and the difficulty of early definitive diagnosis(4), the prevention of the introduction of MAP combined with the reduction of the risk of transmission through adequate herd management practices seem the most important keys to control the disease. The objective of this study was to systematically collect and appraise the scientific evidence related to 2 specific risk factors associated with the introduction of MAP into a herd: 1) *Is purchasing cattle or introducing animals a risk factor?* And 2) *Is the presence of wildlife or domestic animals (deer, rabbit, sheep, goat, cat, etc.) on the farm/pasture a risk factor?*.

## **Materials and Methods**

The systematic review was conducted based on the guidelines from “Systematic Reviews”(18); “The process of systematic review and its application in agri-food public-health”(19) and “Systematic reviews to support evidence-based medicine”(20).

### **Search strategy**

The search was conducted in July 2011. Four online databases were selected: CAB from 1973 to 2011, Medline including PubMed from 1948 to 2011, Embase from 1980 to 2011 (all 3 through OVID platform) and Web of Science from 1979 to 2011. Those databases were selected because they were considered to be relevant and with important impact on the worldwide veterinary research.

The search addressed 2 specific questions related to the risk of a dairy herd of being MAP infected, and a specific search strategy was designed for each question, databases apply the search strategy to screen on titles, abstracts and keywords of manuscripts:

1. Is purchasing cattle or introducing animals a risk factor?

**Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis OR Paratuberculosis OR Johne’s disease AND Cattle OR Bovi\* OR Cow\* OR Dairy OR Ruminant\* OR Calf OR Calves OR Bull\* OR Heifer\* AND Contaminat\* OR Transmi\* OR Epidemiolog\* AND Risk factor\* OR Hazard\* AND Purchas\* OR Buy\* OR Acquire\* OR Introduc\* OR Rent\* OR Borrow.**



2. Is the presence of wildlife or domestic animals (deer, rabbit, sheep, goat, cat, etc.) on the farm/pasture a risk factor?

**Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis OR Paratuberculosis OR Johnne's disease AND Cattle OR Bovi\* OR Cow\* OR Dairy OR Ruminant\* OR Calf OR Calves OR Bull\* OR Heifer\* AND Contaminat\* OR Transmi\* OR Introduc\* OR Epidemiolog\* AND Grass\* OR Pasture\* OR Ensilage\* OR Silage\* OR Forag\* OR Hay OR Grazing OR Water AND Wildlife OR Sheep\* OR Goat OR Deer\* OR Rabbit\* OR Hare\* OR Cat OR Cats OR Dog OR Dogs OR Bird\* OR Mammals OR Domestic\* animal\* OR Cross-species OR Wildlife reservoir OR Inter species AND Faec\* OR Feces OR Fecal OR Dropping\* OR Dung OR Urine.**

### **Identification of relevant studies**

Rules for including studies in the analysis were: papers published in peer-reviewed journals; studies that answer the specific question with scientifically elements or describe any relation with the risk factor studied and quantify or measure the risk; manuscripts in English, French and Spanish. A first screening was done by one author (S.R.) based on the titles; and rules for excluding studies from the analysis were: first, studies related with economic impact, genetics, diagnostic test, prediction models, human medicine, vaccine, embryo transfer and nutritional studies which were not related with the risk factors we were looking for; studies in species other than cattle were excluded if they did not show any

relation with bovine paratuberculosis. The second selection was done by reading the abstracts and more papers were discarded (S.R.). The studies that met the inclusion criteria were fully and independently reviewed by 3 authors (S.R., G.F., J.A.), to assess their relevance according to the information (evidence) provided to answer the questions.

### **Data extraction**

General information was collected from each article: author, year of publication, country where the study was performed, study design, unit of interest and number of subjects (animals or herds), definition of a case (positive animal or positive herd) and the diagnostic test used. The sampling strategy, risk factor studied, statistical analysis used, results and conclusions regarding significant or non-significant association related to the questions were also recorded.

### **Study appraisal**

Manuscripts that met the above inclusionary criteria were considered relevant in the final selection.

Based on the criteria used by Doré et al(5) derived from a qualitative checklist also used by Sanderson et al(21), we apply the following criteria for the study appraisal. In order to assess the internal validity, 3 factors were considered: the study design, the diagnostic test

reliability and the case definition. A qualitative score was given to study design: (+) case control and cross-sectional studies (studies for which time of exposure could not be ascertained), (++) longitudinal, follow-up prevalence and retrospective cohort studies, (+++) experimental and randomized-controlled clinical trial. To evaluate the diagnostic test used, the following scores were developed: (0) identification of a case with clinical signs (owner or veterinarian observation), (1) detection of humoral response on an individual animal, (2) more than one individual animal with positive humoral response (positive herd), (3) test used was aimed at detecting MAP directly (Culture or PCR). The case definition had to be clear and well described. In conclusion, integrating the evaluation of the factors above, internal validity was high for study design (++) or (+++), diagnostic test (3) and clear case definition; moderate if study design (+) and diagnostic test (3) or if study design (++) and diagnostic test (1) or (2). For all the other study designs a low internal validity classification was assigned.

To assess external validity, the sample strategy and the sample size (40 herds/cows as an *ad hoc* cut point)(5) were studied. Studies with less than 40 herds or cows enrolled in a voluntary control program were classified as low; studies with  $\geq 40$  enrolled herds/cows in voluntary control program or fewer herds/cows for which the sampling was done randomly were classified as moderate and studies having more than 40 herds/cows and a random sampling were classified as high(5).

## **Results**

Overall, a total of 17 manuscripts were kept for data extraction and analysis. The articles were published in 11 different journals and the studies were carried out in 9 different countries, mainly in Europe (n = 9) and the United States (n = 6). The unit of interest was the herd in all studies (n = 17) but some studies also examined the data at the individual level (n = 5). ELISA was most frequently used (n = 9) for diagnostics, there were 7 different types of ELISA tests, and the second test most frequently used was the bacteriological culture (n = 7). Some studies (n = 5) used more than one test to determine the infection status. The specific description of the risk factor studied was variable between studies. The principal study design was cross-sectional (n = 15). Extracted data are listed in Table 1. Qualitative study appraisal for internal and external validity is presented in Table 2. Studies were classified as low for internal validity (n = 9) or moderate (n = 8) while the majority were classified as moderate (n = 10) for external validity.

The search in all databases concerning purchase of cattle (Question 1) yielded 536 citations. These were screened based on the title and 425 were considered irrelevant. From the remaining 111 citations, 40 were discarded because they were duplicates between databases. Subsequently the abstracts of 71 manuscripts were read and 4 were discarded because they were in a language different from English, French or Spanish and 46 more were discarded because they did not answer or address the question. A total of 21 articles were fully read, 7 more were excluded because they did not measure the impact of the risk, finally 14(7, 9-11, 22-31) were selected for the analysis (see figure 1).

Of these 14 papers (Table 3), a significant association between the risk of being a MAP contaminated herd related to introducing cattle was found in 6 articles(7, 9, 11, 26, 29, 31). The proportion of purchased cattle in the herd(7) (>15%), the percentage of cows born at other dairies(11) ( $\geq 25\%$ ) and the annual importation rate(26) ( $\geq 8\%$ ), were found to increase the risk of a herd being classified as MAP infected. These proportions were measured by: the measure of MAP prevalence (OR: 3.8 in a 4 years period,  $P < 0.001$ ); herd status by prior diagnosis of JD infection (OR: 2.9, 95% CI: 1.6 – 5.1) and seropositivity by ELISA test (OR: 3.28, 95% CI: 2.15 – 5.03), respectively. A case control study conducted in Ireland by Barrett et al(9) found an increased risk of detection of MAP (19.22 times more likely, 95% CI: 2.87 -  $\infty$ ) in herds with direct cattle importation from the continental Europe. The variable “open heifers purchased during the last 12 months” was associated with having a greater count of MAP-seropositive cows (CR: 2.3, 95% CI: 1.2 – 3.5). However, the variable “bulls purchased during the last 12 months” was associated with fewer MAP-seropositive cows (CR: 0.6, 95% CI: 0.4 – 0.9), being the first report of a negative association for purchasing cattle in the scientific literature(29). Çetinkaya et al(31) reported that the purchase of replacement privately (from several sources) was associated with an increased risk of reporting the disease (OR: 4.19, 95% CI: 1.77 – 9.93).

All other studies regarding the percentage of purchased animals(10, 22-25, 27, 28, 30) despite the tendency of some results to show a positive association between the variables studied and the risk of MAP infection, were not able to find a statistically significant association. Nielsen(30) saw a tendency for purchasing cattle (OR 1.27, 95% CI: 0.65 –

2.9), or having more than 5% purchased cattle in herd (OR 1.34, 95% CI: 0.74 – 2.4), to be associated with MAP prevalence, but neither achieved statistical significance. This is possibly due to a general high variation between herds and the small sample size at the herd level (n = 97) in this study. Orpin et al(10) categorized the risk associated with purchasing replacement stock according to the number and frequency of purchases in the last 13 years in high, medium and low levels in relation with the risk of presence of disease. They found that a herd with a high risk score is approximately 3 times more likely to have clinical disease (OR: 2.6) compared to herds with lower risk, however, it was not statistically significant (95% CI: 0.4 -17.5).

The search in all databases for the question related to risk of presence of wildlife or other domestic animals (Question 2) yielded 967 citations. These citations were screened based on the title and 868 were considered irrelevant. From the remaining 99 citations, 55 were discarded because they were duplicates between the four databases. The 44 abstracts were read and 24 more were discarded because they did not answer or address the question or because they were not related with cattle. Twenty articles were fully read and 13 more were excluded because they did not apply any measure of the impact of the risk. Finally 7(9, 27, 28, 31-34) were selected for the analysis (Table 4), 4 of which were duplicates from question 1 (see figure 1).

A significant positive association between the presence of wildlife and domestic animals at the farm and the risk of MAP introduction in the herd was found in 4(9, 27, 31, 33) of the 7

manuscripts(9, 27, 31, 33)<sup>34</sup>. Daniels et al(27) found that farms with “more” wild rabbits have a mean probability (MP: 0.77,  $P = 0.018$ ) to have a greater chance to present the disease than farms with “few” wild rabbits. The variable “access of wildlife to stored feed (farm mix)” (MP: 0.899,  $P = 0.028$ ) was significantly associated with the probability of a farm reporting JD(27). Barrett et al(9) showed that cograzing of heifers with sheep and/or goats was associated significantly with the detection of MAP in the univariate analysis ( $P < 0.05$ ). In the study carried out by Greig et al(33), the analysis showed that a past or current problem of paratuberculosis in cattle was significantly associated with paratuberculosis in the wild rabbit population on the farm. This study also showed the similarity (morphologically and by molecular genetic typing) between the isolates from both species. Çetinkaya et al(31) found that presence of farmed deer could increase the risk of reporting disease with OR of 209 (95% CI: 13.47 – 3253 for 1 year of the 2 years studied) and suggest that deer could be a reservoir of JD when they graze in the same pasture with cattle. However, these results must be considered with caution as only 0.4% of the farms in the study reported having deer.

Muskens(28) and Corn(32) did not find a significant relationship between the variables and the outcomes: “presence of sheep/goats grazing the same pasture versus the serological status of cattle”, neither between “wildlife on the farms versus the test-prevalence on livestock”, respectively.

Raizman et al(34) found a significant association between the use of pasture by cattle and the risk of contact between cattle manure and deer (OR 5.4, 95% CI: 2.1 – 14.2) and also between cattle manure and rabbit (OR 3.6, 95% CI: 1.3 – 9.5). However, they did not find significant association between MAP in wildlife and infected herds. Most of the references identified for the second question(13-15, 17, 35-43) showed a potential risk for cattle if wildlife or another domestic species are in close contact. However, they were not kept for the analysis because in these studies, there was no measure of the risk and the emphasis of the studies was to report the possible transmission.



## **Discussion**

Our analysis indicate that the introduction of outside cattle is a common, well supported and confirmed risk factor to become infected with MAP. The principal reason to purchase animals is to accomplish herd size expansion and many herds cannot reach that growth by producing their own heifers internally. Another reason to introduce outside cattle is to acquire replacement stock, to restock a farm that suffers depopulation caused by another disease or to acquire a high genetic value animal. The animal could be infected and shedding MAP while showing no clinical signs. Unfortunately, due to the low number of certified free herds(11), the purchase of cattle from a safe source is a challenge and the primary preventive method should be to maintain a completely closed herd. Testing purchased cows before introduction is unrewarding because of the low sensitivity of tests on clinically healthy individual animals(11). Depending on the specific metric used in each study, the strength of association between purchase of replacement animals and risk of MAP infection, measured by Odds Ratios, was between 1.3 and 19.2. The wide range for such risk magnitude could be explained partly by differences in study design features, in the tests used and in the case definitions. Most of these studies were found to have low to moderate internal validity, probably due to the same factors that affects the variability of association listed above. It is important to consider the validity in order to identify the impact of the findings of each study.

Daniels et al(27) did not find any association between the presence of the disease and number of cattle bought in. A possible explanation is that 15% of the farms were taking

control measures by buying clean replacements; unfortunately, they did not define how replacement was considered “clean”.

Between all studies we identified two<sup>28,30</sup> which found a result that was contradictory to the common knowledge. In Çetinkaya’s study<sup>30</sup>, purchasing replacement privately was associated with an increased risk of reporting the disease; however, purchasing replacement from known sources is in general considered a method to reduce the risk of introduction of disease. There is no clear explanation for this finding. Anyway we must consider that associations are blind to temporal sequence. If purchasing replacement from a known source is a management strategy to reduce disease burden, the causal sequence would be that already having MAP caused the management to start purchasing low risk animals through private agreements. In that case the effect of buying from a known source could be wrongly associated with increased MAP prevalence. Tiwari et al<sup>28</sup> found that purchasing bulls was associated with a lower count of seropositive cows (protective factor). However, they hypothesized that farmers keeping bulls were applying another measures to reduce MAP-seroprevalence. In other words, the variable could be a surrogate measure of some unmeasured preventive factor.

For the second question, we could only find 7 manuscripts<sup>9,26,27,31-34</sup> that measured the association between the presence of wildlife or other domestic species and presence of disease in cattle. However many references(13-15, 17, 35-43) were found showing the widespread prevalence of MAP in wild or domestic species (rabbits, birds, feral cats, rats,

raccoons, deer, opossums, mice, sheep and goats). In several references, MAP was cultured from some species but no evidence of true transmission was measured. The question remains if wildlife animals are passive shedders of MAP or if they truly become infected. The role of wildlife as vectors and reservoirs of MAP seems to be undisputable but the amplitude of the risk is not as well documented.

Raizman et al(34) estimated a significant association between the use of pasture by cattle and the risk of contact between cattle manure and both deer and rabbit. However, due to the low number of positive samples in wildlife in this study, the association between MAP in wildlife and infected herds was not significant.

In Stevenson's study(17), the diagnosis of paratuberculosis and the isolation of the same strain of MAP from different species on the same property were possible. In order to assess the relative risk of transmission they suggest that a distinction between passive shedding and active transmission should be made. They also studied the possible contact between species. Unfortunately in this study, like in others, they did not measure the relationship between the presence of paratuberculosis in cattle and wildlife.

There is still much to investigate concerning the role and the real risk that wildlife can pose to cattle. Further research on biosecurity control measures to prevent the contact and the interspecies transmission is needed.

We designed and applied a structured and repeatable search strategy, based on the most important concepts for each question and the keywords that best described them. The

search strategy was initially wide and flexible to obtain all possible studies related to the subject and then was more restrictive in order to select the studies regarding the specific risk factors and criteria we were looking for. There were 3 main concepts (for both questions) that led the general line of this review: “Paratuberculosis” “contamination” in “cattle” and for each question the appropriate concepts to make the search more specific to the question were added. It is important to say that all the studies considered irrelevant in the first selection steps were discarded because they were not related with what we were looking for and not because they were of poor quality or insufficient designed. The search was conducted in 4 databases considered the most important regarding medical and agricultural subjects.

The two questions formulated were related to the introduction of paratuberculosis into a herd. Even though conducting the search for each question could be laborious, we considered that both were relevant for the general objective of finding scientific evidence for the risk factors associated with the introduction of MAP into a herd.

We summarized the information qualitatively, due to the variable description of the risk factors and to the high variability in the expression of results to establish quantitative criteria for the evaluation. The appraisal remains subjective and potential bias may exist. Besides, the study appraisal classification (low – moderate - high) used by the authors did not take into account if the results were statistically significant or not.

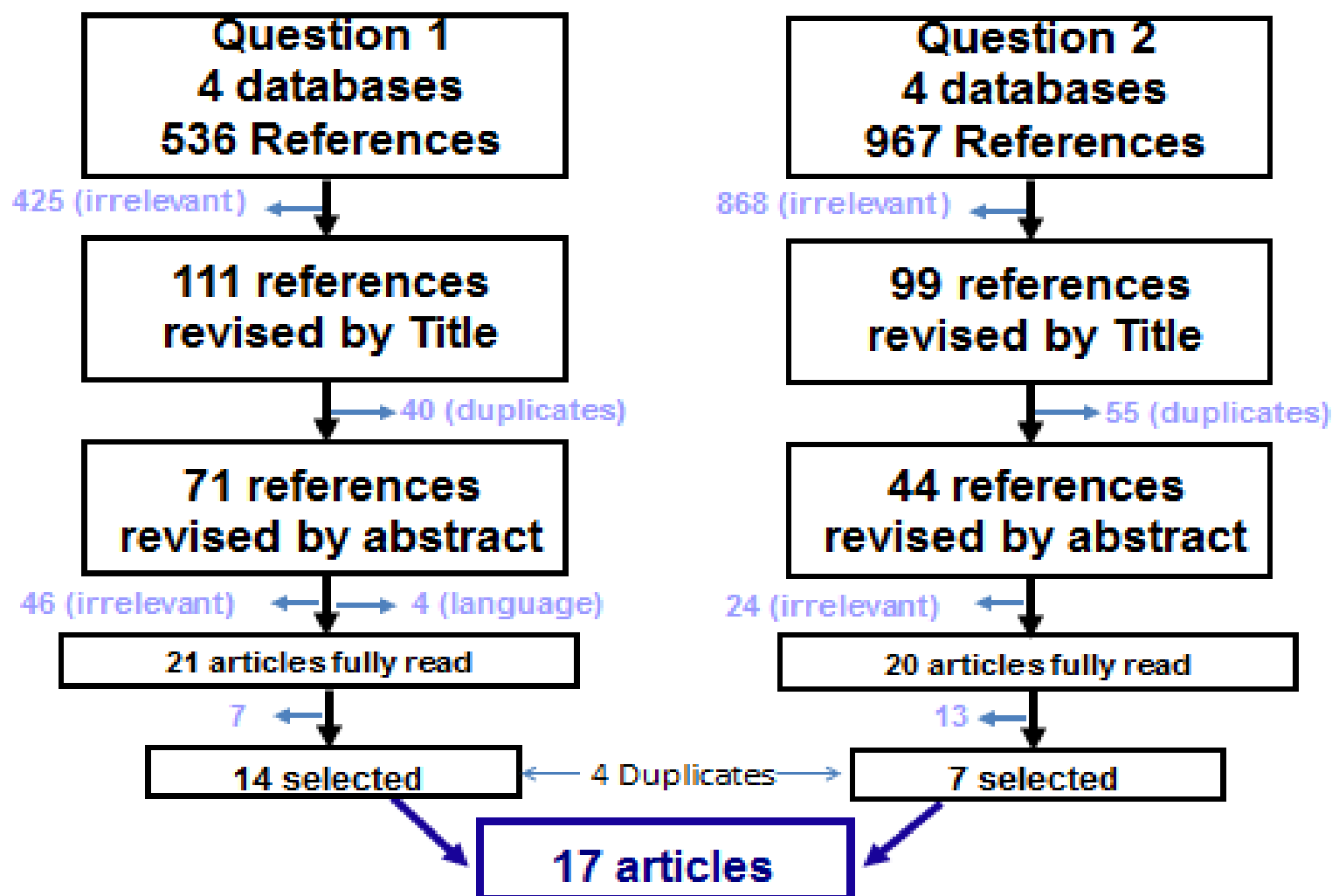
The most common study design was the cross-sectional study. It provides low confidence in causal association and a moderate relevance to real situations(44). It remains a challenge to prove a true association between the outcomes (prevalence) and, for example, a management factor, which is a time-variant exposure. Despite the disadvantages, this observational study is the most frequently used in veterinary medicine(44).

Another measure to be included in a paratuberculosis program is the control of the presence of wildlife or different domestic animals in the farm and their interaction with cattle.

Currently, despite the increased awareness of the disease and the fact that several countries are implementing control programs, there is still an incomplete understanding of the epidemiology of the disease. Control programs must consider the inter-herd transmission factors in order to prevent the introduction of the disease.

In summary, this systematic review confirmed that purchase of animals is a risk factor for the introduction of paratuberculosis into herd. This review did not find enough evidence to assess the importance of the potential risk factor: contact between wildlife/domestic animals and cattle.

Figure 1. Flowchart of article selection process



**Table 1.** General data extracted from the articles included in the analysis

QUESTION	AUTHOR	YEAR	COUNTRY	STUDY DESIGN	UNIT OF INTEREST NUMBER OF SUBJECTS	SAMPLE STRATEGY	CASE DEFINITION	DIAGNOSTIC TEST
1	Goodger <sup>22</sup>	1996	United States	Cross-sectional	26 herds	Convenience, positive herd history	Positive herd: 1 clinical case/year or 2 or more IFC (+) in the past year	ELISA serum IDEXX <sup>a</sup>
1	Obasanjo <sup>23</sup>	1997	Unites States	Cross-sectional	33 herds	Convenience from control program	Infected herd: 1 or more MAP (+) FC results	Fecal culture in HEYM <sup>b</sup>
1-3	Çetinkaya <sup>31</sup>	1997	England	Cross-sectional	3772 herds	Random, stratified regions 3	Cases reported in 1993/ 1994	N/A
3	Greig <sup>33</sup>	1999	Scotland	Cross-sectional	22 farms (210 rabbits)	Convenience, trapped animals	Farm history with or without PTB Rabbits MAP culture (+) or lesions at necropsy	Histopathology, fecal culture <sup>c</sup> , PCR
1	Wells <sup>11</sup>	2000	United States	Cross-sectional	1004 herds (32622 cows)	Stratified random sample from control program	Positive herds: more than 2 cows (+) or 1 cow (+) and ≥5% of culled cows with JD signs in the previous year	ELISA serum IDEXX <sup>a</sup>

1-3	<b>Daniels</b> <sup>27</sup>	2002	Scotland	Cross-sectional	86 herds	Convenience but effort to unbiased	History of clinical cases: herd with and without the disease	N/A
1-3	<b>Muskens</b> <sup>28</sup>	2003	Netherlands	Cross-sectional	370 herds	Random	Positive herd: one ELISA test (+)	<b>ELISA</b> serum IDEXX <sup>d</sup>
1	<b>Hirst</b> <sup>26</sup>	2004	United States	Cross-sectional	15 herds (10,280 cows)	Convenience, volunteers	Infected herd: $\geq 1$ individual fecal culture (+) or $\geq 1$ culled cow with histologic evidence of MAP infection	<b>ELISA</b> iDEXX <sup>a</sup> , modified <b>fecal culture</b> in HEYM, <b>PCR</b> , <b>histopathology</b>
1	<b>Orpin</b> <sup>10</sup>	2005	United Kingdom	Cross-sectional	23 herds	Convenience, target sampling	Clinical history: Heavily infected ( $\geq 2$ clinical cases/5 years); single positive (one isolated case in 5 years)	<b>ELISA</b> milk/serum Pourquier <sup>e</sup>
3	<b>Corn</b> <sup>32</sup>	2005	United States	Cross-sectional	9 herds (2752 wildspecies samples (feces, tissues))	Convenience, trapped animals/intensive sampling	Herd prevalence: consecutive FC and serologic tests	<b>Fecal culture</b> (Bactec), <b>genotyping</b> , <b>PCR-sequencing</b> <sup>f</sup> , <b>histopathology</b>
3	<b>Raizman</b> <sup>34</sup>	2005	United States	Case-control	80 case herds 28 control herds	Convenience from control program, cows/wildlife	Herd, environment, or wildlife positive if at least 1 sample was + to MAP culture	<b>Fecal culture</b> <sup>g</sup> <b>ELISA</b> serum IDEXX <sup>h</sup>



						fecal samples		
1	<b>Nielsen</b> <sup>30</sup>	2007	Denmark	Cross-sectional	97 herds	Convenience	Continuous optical density (OD) milk ELISA	In-house milk <b>ELISA</b> <sup>i</sup>
1	<b>Cashman</b> <sup>25</sup>	2008	Ireland	Cross-sectional	59 herds (2333 cattle serum samples)	Convenience, apparently clinical history	Positive herd = One culture or PCR (+) test of milk sock filter/6	<b>MFR culture, PCR ELISA</b> serum Pourquier <sup>e</sup>
1	<b>Tiwari</b> <sup>29</sup>	2009	Canada	Cross-sectional	315 herds	Random, stratified 2 stages	ELISA (+) = cow (+)	<b>ELISA</b> serum IDEXX <sup>h</sup> /BIOC OR <sup>j</sup>
1	<b>Ansari-Lari</b> <sup>24</sup>	2009	Iran	Cross-sectional	110 herds	Convenience	Positive herd = PCR (+) on bulk tank milk	<b>PCR</b> IS900 bulk tank milk
1	<b>Nielsen</b> <sup>7</sup>	2011	Denmark	Cross-sectional	1081 herds	Convenience from control program	High risk animal: Milk ELISA positive at least once within the last 3 test	<b>ELISA</b> milk ID Screen ID-VET <sup>k</sup>
1-3	<b>Barrett</b> <sup>9</sup>	2011	Ireland	Case-control	86 case herds 125 control herds	Convenience	Positive herd: 1 or more MAP (+) IFC results Control herd: no MAP(+)	<b>Fecal culture</b>

IFC: Individual fecal culture; FC: fecal culture; JD: Johne's disease; PTB: Paratuberculosis; OD: optical density; MAP: *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*; HEYM: Herrold's egg yolk medium; MFR: Milk sock filter residue; PCR: polymerase chain reaction; N/A: not applicable.

<sup>a</sup> *Mycobacterium paratuberculosis* antibody test kit, IDEXX Laboratories, Inc, Westbrook, Me. USA

<sup>b</sup> Cornell double incubation method.

<sup>c</sup> Middlebrook 7H11 agar supplemented with Mycobactin J (Allied Monitor, Fayette, Mo) and Selectatabs (code MS24, MAST Laboratories, Ltd., UK).

<sup>d</sup> Herdchek Mpt AB, Idexx Skandinavia AB, Sweden.

<sup>e</sup> Paratuberculosis ELISA kit, Institute Pourquier, Montpellier, France.

<sup>f</sup> 16S/IS900/IS1311 and L1/L9 integration site PCR.

<sup>g</sup> Wells SJ, Whitlock RH, Wagner BA. Sensitivity of test strategies used in the Voluntary Johne's Disease Herd Status Program for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in dairy cattle herds. J Am Vet Med Assoc 2002; 220:1053-1057.

<sup>h</sup> IDEXX Herdchek ELISA; IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA.

<sup>i</sup> Nielsen SS. Variance component of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgG antibodies in milk samples to *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* in dairy cattle. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2002 Oct;49(8):384-7.

<sup>j</sup> BIOCOR Paracheck ELISA; BIOCOR Animal Health Inc., Omaha, NE, USA.

<sup>k</sup> IDScreen, ID-Vet, Montpellier, France.

**Table 2.** Study appraisal results

		<b>INTERNAL VALIDITY</b> (Study design, diagnostic test, case definition)		
		<b>HIGH</b>	<b>MODERATE</b>	<b>LOW</b>
<b>EXTERNAL VALIDITY</b> (Sample size, sampling strategy)	<b>HIGH</b>			<b>Çetinkaya<sup>31</sup></b> <b>Tiwari<sup>29</sup></b> <b>Muskens<sup>28</sup></b> <b>Wells<sup>11</sup></b>
	<b>MODERATE</b>		<b>Corn<sup>32</sup></b> <b>Cashman<sup>25</sup></b> <b>Hirst<sup>26</sup></b> <b>Greig<sup>33</sup></b> <b>Barrett<sup>9</sup></b> <b>Ansari-lari<sup>24</sup></b> <b>Raizman<sup>34</sup></b>	<b>Daniels<sup>27</sup></b> <b>Nielsen<sup>30</sup></b> <b>Nielsen<sup>7</sup></b>
	<b>LOW</b>		<b>Obasanjo<sup>23</sup></b>	<b>Goodger<sup>22</sup></b> <b>Orpin<sup>10</sup></b>

**Table 3.** Results of manuscripts that studied the risk factor concerning purchase of cattle (question 1)

AUTHOR	RISK FACTOR STUDIED / STATISTICAL ANALYSIS	RESULTS AND CONCLUSIONS
<b>Orpin<sup>10</sup></b>	<p>1. Policy for purchasing replacement stock: high, medium, low risk related to the risk of having JD.</p> <p>Descriptive statistics.</p>	<p>A herd with a high risk score is more likely to have clinical disease compared to herds with low risk (OR 2.6; 95% CI: 0.4 – 17.5) but it was <b>not significant</b>.</p>
<b>Goodger<sup>22</sup></b>	<p>1. No purchased cattle in the previous year (replacement source).</p> <p>Multiple linear regression and logistic regression.</p>	<p>Scores on the replacement source category <b>did not influence</b> the variability of MAP apparent prevalence (results not significantly different).</p>
<b>Obasanjo<sup>23</sup></b>	<p>1. Clinical disease on purchased animals.</p> <p>Univariate / Multivariate stepwise logistic regression.</p>	<p><b>Not significant</b> at multivariate stepwise logistic regression (OR: 1.7; 95% CI: 0.1 – 31.9).</p>

<b>Nielsen<sup>7</sup></b>	1. Proportion of purchased animals in the herd (No purchased animals; 0 - 15% and > 15%).  Univariate / Multivariate analysis - linear mixed model.	The higher proportion of purchased animals (> 15%) <b>had more influence</b> on changes in prevalence ( $P < 0.001$ ).
<b>Ansari-Lari<sup>24</sup></b>	1. Purchase replacement animals (yes or no).  Univariate / Multivariate logistic regression.	<b>Not significant</b> in univariate analysis and not included in multivariate model.
<b>Cashman<sup>25</sup></b>	1. Purchased animals (and contact with imported or progeny of imported cattle).  Univariate / Logistic regression.	<b>None</b> of the risk factors related to purchase (biosecurity) was significantly associated with the probability of a positive MFR culture or PCR.
<b>Barrett<sup>9</sup></b>	1. Direct cattle importation.  Univariate / Multivariate logistic regression.	The variable was <b>associated significantly</b> ( $P < 0.05$ ) with detection of MAP in the univariate analysis and in the multivariate exact logistic regression analysis (OR: 19.22; 95% CI: 2.8 - $\infty$ ; $P = 0.001$ ).
<b>Hirst<sup>26</sup></b>	1. Annual importation rate (< 8% vs $\geq 8\%$ ) in preceding 5 years.  Logistic regression / Pearson correlation coefficients.	Positive correlation between importation rate and prevalence of seropositive cattle ( $r = 0.87$ ). Cows in herds with $\geq 8\%$ importation were <b>more likely</b> to be seropositive for MAP (OR: 3.28; 95% CI: 2.15 – 5.03; $P = 0.03$ ).

<b>Daniels<sup>27</sup></b>	1. Number of cattle bought in. 2. Change in number of cattle bought.  Univariate / Multivariate stepwise regression.	The presence of the disease was <b>not related</b> to the absolute numbers of livestock bought in.
<b>Muskens<sup>28</sup></b>	1. Purchased dairy cattle during the last 3 and 10 years.  Univariate / Multivariate analysis.	<b>No significant</b> differences were observed between the seronegative and seropositive groups.
<b>Wells<sup>11</sup></b>	1. Percentage of cows born at other dairies (0%; 0.1 - 24%; ≥ 25%).  Univariate / Multivariate logistic regression and $X^2$ .	Herds with ≥ 25% of cows born on other dairies were <b>more likely</b> to have a positive herd status (OR: 2.1; 95% CI: 1.3 – 3.5) and were also associated with prior diagnosis of JD (OR: 2.9; 95% CI: 1.6 – 5.1).
<b>Tiwari<sup>29</sup></b>	1. Open heifers purchased during the last 12 months. 2. Open bulls purchased during the last 12 months.  ZINB multivariate model.	The variable “open heifers purchased” was <b>positively associated</b> with the number of MAP seropositive cows (CR: 2.3; 95% CI: 1.2 – 3.5). “Bulls purchased” was associated with a lower count of MAP seropositive cows (CR: 0.6; 95% CI: 0.4 – 0.9).
<b>Nielsen<sup>30</sup></b>	1. Purchased cows in herd 2. More than > 5% purchased cows in herd.  Finite mixture model (multilevel Bayesian).	Purchased cows (OR: 1.27; 95% CI: 0.65 – 2.9) and more than 5% (OR: 1.34; 95% CI: 0.74 – 2.4) <b>were not statistically significant</b> .

<b>Çetinkaya<sup>31</sup></b>	1. Source of replacement: purchased from markets, from dealers, purchased privately. 2. Replacement rate: < 10%; 11 - 20%; > 20%.  Univariate / Multivariate regression analysis.	Purchasing replacements privately was <b>significantly associated</b> with an increased risk of reporting disease (OR: 4.19; 95% CI: 1.77 – 9.93; <i>P</i> = 0.001).  Replacement rate was <b>not significantly</b> associated.
-------------------------------	--	---

MAP: *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*; JD: Johne's disease;  $X^2$ : Chi square; OR: odds ratio; CR: count ratio; ZINB: Zero-inflated negative binomial model; CI: confidence interval.

**Table 4.** Results and conclusions of manuscripts that studied the risk factor concerning Wildlife and other domestic animal exposures (question 2)

AUTHOR	RISK FACTOR STUDIED/ STATISTICAL ANALYSIS	RESULTS AND CONCLUSIONS
<b>Daniels<sup>27</sup></b>	1. Presence of small ruminants, other domestic animals and wildlife in the farm. 2. Wildlife access to stored feed.  Univariate analysis / Multivariate stepwise regression.	Univariate: 1. Total number of sheep and cattle, number of rabbits present, number of crows present; 2. Access of wildlife to stored farm mix, <b>were all associated</b> with the probability of a farm reporting JD. Final model: 1. Number of rabbits (few vs many 0.77 MP; $P = 0.018$ ); 2. Access of wildlife to stored farm mix (0.899 MP; $P = 0.028$ ) <b>were all associated</b> with the probability of a farm reporting JD.
<b>Muskens<sup>28</sup></b>	1. Presence sheep / goats. 2. Grazed sheep other farmer.  Univariate / multivariate analysis.	The variables were <b>not significantly associated</b> .
<b>Corn<sup>32</sup></b>	1. Interspecies transmission.  Descriptive, $X^2$ .	There <b>was no statistical correlation</b> between the test-prevalence in livestock vs. wildlife on the farms ( $r = 0.31$ ). There was no difference in prevalence of MAP infection in wildlife among all farms ( $X^2 = 14.43$ , $P > 0.10$ ).
<b>Greig<sup>33</sup></b>	1. Association MAP in rabbits vs. farm with MAP.  Linear modeling LOGIT.	<b>Statistically significant</b> relationship between a past or current problem of paratuberculosis in cattle and in the wild rabbit population ( $P = 0.013$ ).



<b>Barrett</b> <sup>9</sup>	1. Cograzing of heifers with sheep and/or goats.  Univariate / Multivariate logistic regression.	The variable was <b>significantly associated</b> ( $P < 0.05$ ) with detection of MAP in the univariate analysis.
<b>Çetinkaya</b> <sup>31</sup>	1. Presence of other species on the farm: sheep, goats and farmed deer.  Univariate / Multivariate regression analysis.	Presence of farmed deer was found to be <b>highly associated</b> with clinical disease only for 1 year of the 2 years studied (OR 209.3; $P = 0.001$ and 95% CI: 13.47 – 3253).
<b>Raizman</b> <sup>34</sup>	1. Relation between MAP in wildlife and infected herds. 2. Use of pasture by cattle and the risk of contact between cattle manure and deer/rabbit.  Descriptive analysis, $X^2$ fisher's test, Student's $t$ -test	1. There was <b>not significant association</b> between MAP in wildlife and infected herds despite the significant association found between the use of pasture by cattle and the risk of contact between cattle manure and both deer and rabbit (OR 5.4, 95% CI: 2.1 – 14.2 and OR 3.6, 95% CI: 1.3 – 9.5 respectively).

MP: mean probability; MAP: *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*;  $X^2$ : Chi square; JD: Johne's disease; CI: confidence interval.

## References

1. Collins MT. Johne's Disease (Paratuberculosis). In: EA David and DM Rings, eds. Food Animal Practice. 5 ed. Saint Louis: W.B. Saunders, 2009: p. 65-69.
2. McKenna SLB, Keefe GP, Tiwari A, VanLeeuwen J, and Barkema HW. Johne's disease in Canada Part II: Disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. *Can Vet J* 2006;47: 1089-1099.
3. Waddell LA, Rajic A, Sargeant J, et al. The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*: A systematic review. *Can J of Public Health* 2008;99: 145-155.
4. Behr MA and Collins DM. Paratuberculosis: organism, disease, control. Wallingford: CABI, 2010:375.
5. Dore E, Pare J, Cote G, et al. Risk factors associated with transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to calves within dairy herd: a systematic review. *J Vet Intern Med* 2012;26: 32-45.
6. Whittington RJ and Windsor PA. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* : a critical review and meta-analysis. *Vet J* 2009;179: 60-69.
7. Nielsen SS and Toft N. Effect of management practices on paratuberculosis prevalence in Danish dairy herds. *J Dairy Sci* 2011;94: 1849-1857.
8. Pithua P, Godden SM, Wells SJ, and Oakes MJ. Efficacy of feeding plasma-derived commercial colostrum replacer for the prevention of transmission of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in Holstein calves. *J Am Vet Med Assoc* 2009;234: 1167-1176.
9. Barrett DJ, Mee JF, Mullaney P, et al. Risk factors associated with Johne's disease test status in dairy herds in Ireland. *Vet Rec* 2011;168: 410.
10. Orpin P, Duthie S, and Grove-White DH. The use of targeted sampling and risk factor analysis to investigate the presence of Johne's disease in dairy herds. *Cattle Pract* 2005;13: 219-225.
11. Wells SJ and Wagner BA. Herd-level risk factors for infection with *Mycobacterium paratuberculosis* in US dairies and association between familiarity of the herd manager with the disease or prior diagnosis of the disease in that herd and use of preventive measures. *J Am Vet Med Assoc* 2000;216: 1450-1457.
12. Greig A, Stevenson K, Perez V, Pirie AA, Grant JM, and Sharp JM. Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Rec* 1997;140: 141-143.
13. Palmer MV, Stoffregen WC, Carpenter JG, and Stabel JR. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (Map) from feral cats on a dairy farm with Map-infected cattle. *J Wildl Dis* 2005;41: 629-635.

14. Beard PM, Stevenson K, Pirie A, et al. Experimental paratuberculosis in calves following inoculation with a rabbit isolate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J Clin Microbiol 2001;39: 3080-3084.
15. Kopečna M, Trčka I, Lamka J, et al. The wildlife hosts of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the Czech Republic during the years 2002-2007. Vet Med (Praha) 2008;53: 420-426.
16. Godfroid J, Boelaert F, Heier A, et al. First evidence of Johne's disease in farmed red deer (*Cervus elaphus*) in Belgium. Vet Microbiol 2000;77: 283-290.
17. Stevenson K, Alvarez J, Bakker D, et al. Occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants. BMC Microbiol 2009;9: 212.
18. Torgerson C. Systematic Reviews. London: Continuum International Publishing group, 2003:102.
19. Sargeant JM, Rajic A, Read S, and Ohlsson A. The process of systematic review and its application in agri-food public-health. Prev Vet Med 2006;75: 141-151.
20. Khan KS. Systematic reviews to support evidence-based medicine: how to review and apply findings of healthcare research: Royal Society of Medicine Press, 2003.
21. Sanderson RO, Beata C, Flipó RM, et al. Systematic review of the management of canine osteoarthritis. Vet Rec 2009;164: 418-424.
22. Goodger WJ, Collins MT, Nordlund KV, et al. Epidemiologic study of on-farm management practices associated with prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in dairy cattle. J Am Vet Med Assoc 1996;208: 1877-1881.
23. Obasanjo IO, Grohn YT, and Mohammed HO. Farm factors associated with the presence of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in dairy herds on the New York State Paratuberculosis Control Program. Prev Vet Med 1997;32: 243-251.
24. Ansari-Lari M, Haghkhah M, Bahramy A, and Baهران AMN. Risk factors for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Fars province (Southern Iran) dairy herds. Trop Anim Health Prod 2009;41: 553-557.
25. Cashman W, Buckley J, Quigley T, et al. Risk factors for the introduction and within-herd transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) infection off 59 Irish dairy herds. Ir Vet J 2008;61: 464-467.
26. Hirst HL, Garry FB, Morley PS, et al. Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection among dairy cows in Colorado and herd-level risk factors for seropositivity. J Am Vet Med Assoc 2004;225: 97-101.
27. Daniels MJ, Hutchings MR, Allcroft DJ, McKendrick IJ, and Greig A. Risk factors for Johne's disease in Scotland - the results of a survey of farmers. Vet Rec 2002;150: 135-139.
28. Muskens J, Elbers ARW, van Weering HJ, and Noordhuizen JPTM. Herd management practices associated with paratuberculosis seroprevalence in Dutch dairy herds. J Vet Med 2003;50: 372-377.

29. Tiwari A, Vanleeuwen JA, Dohoo IR, et al. Risk factors associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* seropositivity in Canadian dairy cows and herds. *Prev Vet Med* 2009;88: 32-41.
30. Nielsen SS and Toft N. Assessment of management-related risk factors for paratuberculosis in Danish dairy herds using Bayesian mixture models. *Prev Vet Med* 2007;81: 306-317.
31. Cetinkaya B, Erdogan HM, and Morgan KL. Relationships between the presence of Johne's disease and farm and management factors in dairy cattle in England. *Prev Vet Med* 1997;32: 253-266.
32. Corn JL, Manning EJB, Sreevatsan S, and Fischer JR. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging birds and mammals on livestock premises. *Appl Environ Microbiol* 2005;71: 6963-6967.
33. Greig A, Stevenson K, Henderson D, et al. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J Clin Microbiol* 1999;37: 1746-1751.
34. Raizman EA, Wells SJ, Jordan PA, DelGiudice GD, and Bey RR. *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* from free-ranging deer and rabbits surrounding Minnesota dairy herds. *Can J Vet Res* 2005;69: 32-38.
35. Hutchings MR, Daniels MJ, Henderson D, and Greig A. Potential wildlife to ruminant transmission routes for *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *Proceedings of the Seventh International Colloquium on Paratuberculosis, 2003: 363-367.*
36. Daniels MJ, Hutchings MR, and Greig A. The risk of disease transmission to livestock posed by contamination of farm stored feed by wildlife excreta. *Epidemiol Infect* 2003;130: 561-568.
37. Daniels MJ, Hutchings MR, Beard PM, et al. Do non-ruminant wildlife pose a risk of paratuberculosis to domestic livestock and vice versa in Scotland? *J Wildl Dis* 2003;39: 10-15.
38. Daniels MJ, Henderson D, Greig A, Stevenson K, Sharp JM, and Hutchings MR. The potential role of wild rabbits *Oryctolagus cuniculus* in the epidemiology of paratuberculosis in domestic ruminants. *Epidemiol Infect* 2003;130: 553-559.
39. Judge J, Kyriazakis I, Greig A, Davidson RS, and Hutchings MR. Routes of intraspecies transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in rabbits ( *Oryctolagus cuniculus* ): a field study. *Appl Environ Microbiol* 2006;72: 398-403.
40. Judge J, Kyriazakis I, Greig A, Allcroft DJ, and Hutchings MR. Clustering of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in rabbits and the environment: how hot is a hot spot? *Appl Environ Microbiol* 2005;71: 6033-6038.
41. Pieterse MC, Eisenberg SWF, Folmer GE, et al. Evidence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in Dutch farmed red deer. *Tijdschr Diergeneeskd* 2010;135: 886-890.

42. Machackova M, Svastova P, Lamka J, et al. Paratuberculosis in farmed and free-living wild ruminants in the Czech Republic (1999-2001). *Vet Microbiol* 2004;102: 225-234.
43. Pavlik I, Bartl J, Dvorska L, et al. Epidemiology of paratuberculosis in wild ruminants studied by restriction fragment length polymorphism in the Czech Republic during the period 1995-1998. *Vet Microbiol* 2000;77: 231-251.
44. Dohoo I, Martin W, and Stryhn H. *Veterinary Epidemiologic Research*. 2 ed. Charlottetown: VER Inc. Charlottetown. Prince Edward Island, Canada, 2010.

# **Matériels et Méthodes**

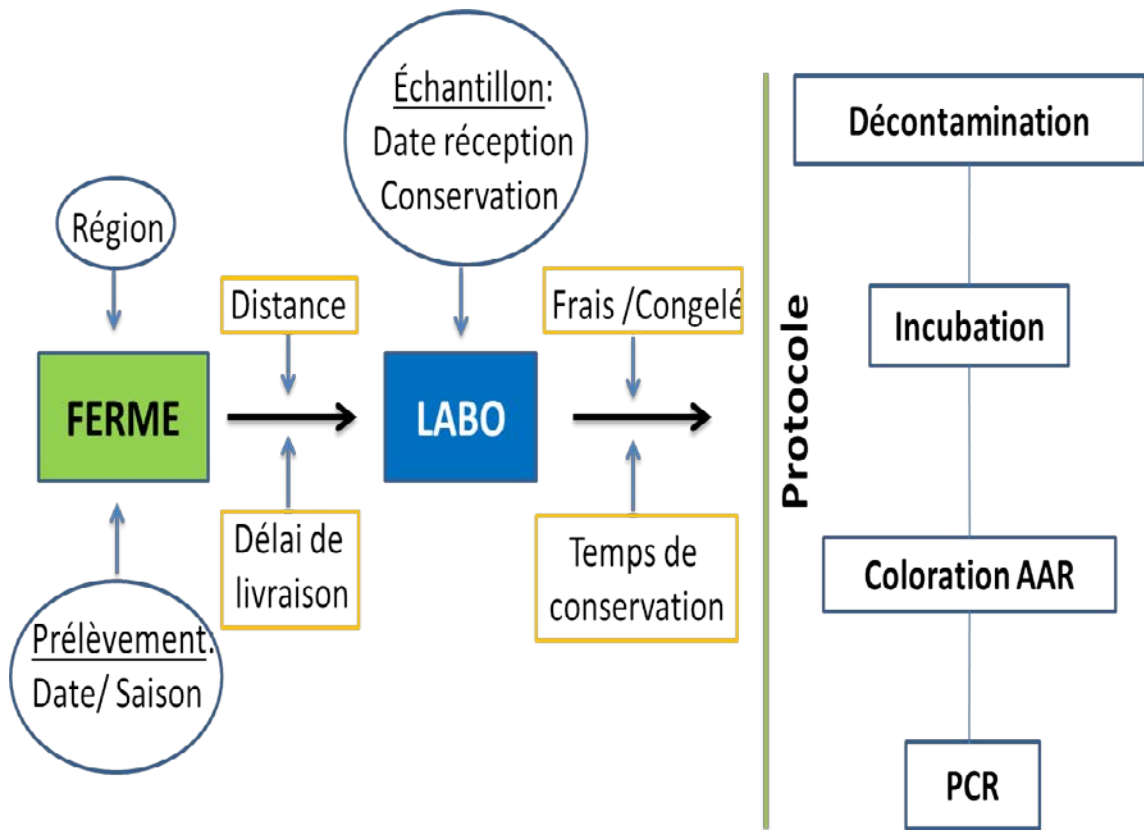
## **Analyse de la banque des données**

Comme étape précédente au projet de contamination des cultures et d'utilisation de la PCR comme méthode de confirmation, nous avons analysé une banque des données disponibles comportant des résultats de culture associés à un projet de recherche antécédent. Nous avons étudié un total de 1370 échantillons (1276 échantillons des fèces individuelles et 94 de l'environnement) provenant de 17 fermes laitières considérées infectés par le MAP issues d'autres projets sur la paratuberculose réalisés en 2010.

Nous avons recueilli différentes informations concernant des covariables ayant potentiellement un impact sur le diagnostic, comme par exemple la localisation géographique de la ferme, les conditions du prélèvement, les conditions et temps de livraison de l'échantillon, le temps de conservation et le délai de traitement (voir fig. 2). Nous considérons l'hypothèse que ces facteurs (covariables) ont un impact significatif sur le résultat de la culture du MAP au laboratoire. Le but de cette analyse était de décrire la distribution des résultats de laboratoire et de caractériser les covariables qui ont un impact dans le processus de diagnostic. Parmi les données que nous avons cherchées, nous avons accès à toutes les données non nominatives de la banque de données du laboratoire.

Finalement, nous avons travaillé avec les covariables suivantes : date/saison du prélèvement, type d'échantillons : FI - fèces individuelles / EV - de l'environnement, temps de congélation avant la culture, l'effet de la congélation, jours en incubation et temps moyen pour la détection d'un signal de croissance, les résultats de culture, de la coloration AAR (alcoolo-acido-résistante), de la PCR et finalement nous avons analysé la distribution des résultats de culture.

**Figure 2.** Diagramme d'association entre les différentes covariables associées au processus de culture de MAP.



## **Évaluation de l'utilisation de la PCR sur les cultures fécales contaminées**

A partir de l'analyse de la banque des données décrit au-dessus et selon la distribution des résultats que nous avons trouvé (résultats montrés plus bas dans la section des résultats), nous avons observé un groupe d'échantillons très particulier et intéressant. Le groupe identifié comme le plus important a été celui des échantillons contaminés. La question demeure si les cultures contaminées devraient être considérées positives ou négatives? Donc, il serait intéressant de donner une valeur diagnostique à ces échantillons, soit positif ou négatif. L'étude de l'évaluation de l'utilisation de la PCR sur les cultures fécales contaminées a été réalisée. Nous avons proposé comme hypothèse que : la technique PCR effectuée sur les cultures déclarées contaminées apporte une information complémentaire quant à la présence d'ADN de MAP.

Les objectifs de cette 2<sup>e</sup> étude étaient : 1) Évaluer la possibilité d'optimiser le processus de diagnostic du MAP en réalisant l'analyse PCR sur les cultures déclarées contaminées. 2) estimer l'impact de la présence de contaminants dans les échantillons fécaux sur les résultats de la culture de MAP.

Donc, pour cette étude les échantillons ont été choisis parmi des échantillons de culture de matières fécales individuelles (FI) et de l'environnement (EV), prélevés et analysés dans le cadre de d'autres projets de recherche sur la paratuberculose. Deux groupes de cultures



ont été sélectionnées où la présence de contaminants pourraient interférer avec la reconnaissance (croissance et / ou identification) du MAP (tableau III). Le premier groupe (n = 269, 262 FI et 7 EV) était composé des cultures déclarées contaminées, traitées durant l'année 2010 au Laboratoire d'épidémiosurveillance animale du Québec (LÉAQ) à St-Hyacinthe, en répondant aux critères suivants : signal positif à l'incubation, coloration AAR négatif et PCR non réalisée. Le deuxième groupe était composé de 88 échantillons choisis au hasard à partir des cultures négatives traitées lors de projets sur le MAP au LÉAQ en 2011, pour évaluer si des résultats positifs existent dans ce groupe. Les cultures négatives provenant de la même banque d'échantillons du premier groupe n'étaient pas disponibles puisque les échantillons de culture négatifs sont éliminés après l'analyse et seulement les échantillons positifs ou contaminés sont sauvegardés. Tous les échantillons qui ont été d'abord déjà décontaminés (portion appelé comme masse d'œuf) ont été conservés à -80° C après la culture.

**Tableau III.** Sélection des échantillons selon la distribution des résultats de culture

<b>Incubation</b>	<b>Coloration</b>	<b>PCR</b>	<b>Résultat</b>
+	+	+	MAP
+	+	-	Mycobactéries autres que MAP
+	-	N/A	Contaminé *
-	N/A	N/A	Négatif **

\* Échantillons à partir desquels a été choisi le groupe 1.

\*\* Échantillons à partir desquels a été choisi le groupe 2.

Le protocole de culture en milieu liquide auquel ont été soumis les échantillons d'étude était celui suivi au Laboratoire d'épidémiosurveillance animale du Québec – LÉAQ<sup>67</sup> selon le protocole de la compagnie BACTEC™ MGIT™ 960 validé par l'USDA<sup>68</sup>. Lors de la réception des échantillons, 2 grammes de fèces sont pesés et premièrement décontaminés en suivant un protocole d'environ 3 jours qui commence avec la dilution des fèces et l'addition des agents qui favorisent la germination des endospores bactériens (extrait de levure et acide pyruvique). Les fèces bovines sont très contaminées par des bactéries comme les Gram positifs et aussi par des cellules fongiques. Les endospores bactériens du genre *Bacillus* sont la cause la plus fréquente de contamination<sup>67</sup>. Après cette étape de

germination, une première solution décontaminante (BHI, HPC et vert de malachite) est ajoutée à l'échantillon qui serait incubé à 37°C pour 18 à 24h afin de réduire considérablement (environ 99%)<sup>67</sup> les populations des endospores, cellules végétatives et cellules fongiques (voir fig. 3).

Dans le deuxième jour du protocole, un mélange antibiotique est ajouté à l'échantillon et celui est ré-incubé pour 18 à 24h à 37°C pour une décontamination additionnelle. Le mélange antibiotique contient 100µg/ml de vancomycine de 2.5%, 100µg/ml de l'acide nalidixique de 2.5%, 25µg/ml d'amphotéricine B de 1% ainsi que du 1/2X BHI (Tableau IV). Cette même journée, un cocktail additif est préparé et ajouté à chacun des tubes MGIT™ Para TB contenant aussi un bouillon à base de Middlebrook 7H9 modifié avec Mycobactin J et un indicateur fluorescent. De plus, le cocktail est laissé au repos dans le tube MGIT™ pendant 18 à 24h à température ambiante (voir fig. 3). Le cocktail additif contient (Tableau IV) : supplément MGIT™ Para TB, enrichissement de jaune d'œuf et des antibiotiques (vancomycine, acide nalidixique et amphotéricine B). Pour les échantillons de l'environnement le cocktail additif est 10 fois plus concentré en acide nalidixique (HighNAL) que pour les échantillons des fèces individuelles (Standard) (voir le tableau IV pour plus de détail). Le fait de laisser reposer le milieu de culture dans le tube MGIT™ Para TB permet au jaune d'œuf de s'équilibrer avec le milieu et réduit les interactions entre l'œuf et les fèces (pendant la période de culture). Cette réaction provoque une utilisation d'oxygène et fréquemment des faux-positifs<sup>67</sup>.

Au troisième jour du protocole, 0.1 ml de la solution de fèces est inoculé dans le tube MGIT™ Para TB pour une incubation postérieure de ce tube dans l'appareil MGIT™ avec une durée maximale de 49 jours (fig. 3). Il faut tenir en compte que tous les échantillons qui ont un signal dans un temps inférieur à 20 jours sont ré-incubés dans l'appareil MGIT™, s'il y a un deuxième signal dans moins de 20 jours l'échantillon est encore ré-incubé à 37°C jusqu'à ce qu'un minimum de 20 jours d'incubation soit complété.

Le système BACTEC™ MGIT™ 960 détecte une fluorescence due à l'utilisation de l'oxygène du milieu par les micro-organismes. Lorsqu'il y a une croissance de mycobactéries, la fluorescence est émise, mais une réaction peut aussi être détectée lorsqu'il y a croissance de contaminants (principalement des bactéries comme les *Bacillus* et des cellules fongiques) ou lors d'une interaction entre les fèces et l'œuf présent dans le milieu de culture<sup>67</sup>. Suite à la détection d'un signal positif par le système, deux étapes consécutives permettent de confirmer la présence de MAP dans l'échantillon. Premièrement, une coloration de Morse (fluorochrome auramine) est effectuée. Celle-ci permet de détecter les bactéries alcool-acido-résistantes (AAR) telles que les mycobactéries. Si la coloration est négative, l'échantillon est déclaré contaminé (Groupe 1). Deuxièmement, si la coloration AAR s'avère positive, une PCR en temps réel est réalisée afin de distinguer MAP des autres mycobactéries. Si la PCR est positive, l'échantillon est déclaré positif mais si la PCR est négative le résultat est appelé mycobactéries autres que

MAP. Pour l'instant, si la coloration s'avère négative, la PCR n'est pas réalisée. De même, si le BACTEC™ MGIT™ 960 ne détecte pas de croissance, les 2 étapes suivantes ne sont pas réalisées (voir figure 4) et l'échantillon est déclaré négatif (Groupe 2).

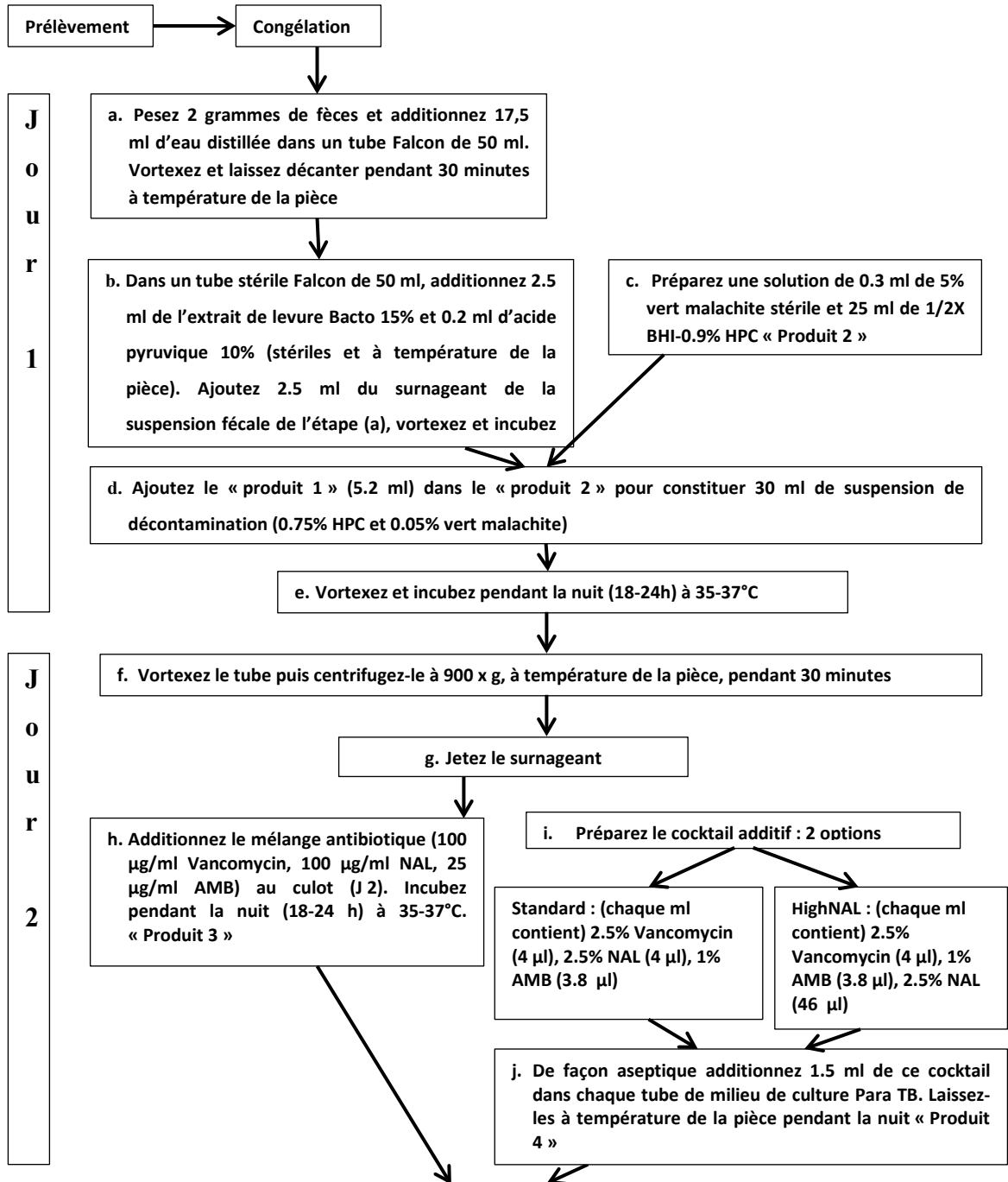
Pour notre étude une PCR en temps réel (TaqMan® MAP (Johne's) Reagents avec extraction MagMAX™) a été effectué sur l'issue de culture (la masse d'œuf récupérée après l'incubation) des cultures contaminées et négatives.

**Tableau IV.** Tableau comparatif du mélange antibiotique et cocktails additifs utilisés dans les processus de culture de MAP

	Mélange Antibiotique	Standard (IFC)	High-Nal (EV)
	Vol (ml)	Vol (ml)	Vol (ml)
Supplément Para TB	N/A	24	24
2,5% Vancomycine	0,12	0,18	0,18
2,5% Acide Nalidixique	0,12	0,18	2,1 *
1% Amphotéricine B	0,075	0,171	0,18
Enrichissement de jaune d'œuf	N/A	15	15
dH <sub>2</sub> O stérile	N/A	5,85	4
1/2X BHI stérile	30	N/A	N/A
Total (Vol pour 30 tubes)	30,32	45,4	45,4

\* 10 fois plus d'acide Nalidixique

**Figure 3.** Protocole de traitement des fèces pour le système BACTEC™MGIT™960 ParaTB (Courtoisie Dr. Juan Carlos Arango)



J  
-  
o  
u  
r  
  
3

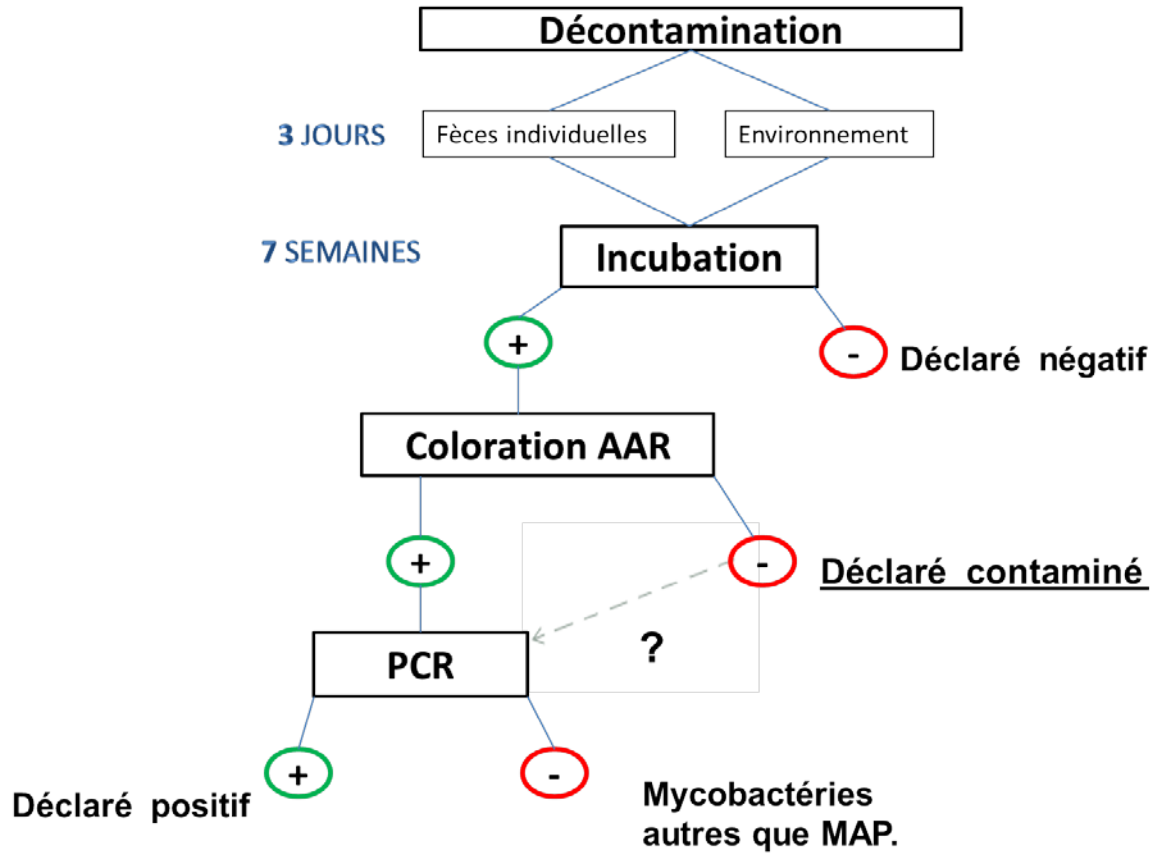
k. Homogénéisez le « produit 4 » et inoculez 0.1 ml de « produit 3 » par tube de milieu de culture Para TB

l. Vortexez le tube et rentrez-le dans l'appareil MGIT 960

m. Gardez l'excès d'inoculum (J2) à -70°C



**Figure 4.** Protocole de culture et confirmation de *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*.



Des analyses descriptives ont été réalisées pour établir la proportion d'échantillons contaminés et la proportion d'échantillons positifs par PCR sur les cultures contaminées et négatives. La proportion d'échantillons positifs a été calculée de façon séparée pour les différentes cultures fécales individuelles (FI) et cultures de l'environnement (EV). Les données ont été également analysées afin de déterminer s'il y avait un effet des covariables : ferme d'origine, l'impact de la saison d'échantillonnage sur le taux de contamination, et aussi d'établir un effet de la période de congélation (avant incubation) sur les résultats.

# Résultats

## Analyse de la banque des données (étude 1)

Nous avons trouvé dans cette premier analyse de données que les 1370 échantillons ont été distingués par type d'échantillon, en faisant la différence entre ceux de fèces individuelles - FI (93.1%) et ceux de l'environnement - EV (6.9%). Les 1370 échantillons ont été traités entre les mois de Mars et de Juillet (figure 6). Ces mois représentent deux saisons principalement le printemps et l'été, période pendant laquelle il y a des changements climatologiques.

Nous avons trouvé aussi que tous les échantillons ont été traités après une période de congélation, aucun n'a été traité frais. Le temps moyen de congélation entre la date de réception de l'échantillon au laboratoire et la culture (date d'entrée dans l'appareil de culture) était de 62,7 jours, un minimum de 7 jours et un maximum de 102 jours. Nous n'avons pas trouvé un effet significatif chez les données analysées du temps de congélation sur le résultat de culture obtenu.

Le temps moyen d'incubation, soit le temps que l'échantillon demeure dans l'appareil de culture jusqu'à la détection du signal positif, était de 41.1 jours avec un minimum de 4 jours dans l'appareil mais finalement 20 jours avec une incubation, et un maximum de 49

jours dans l'appareil. Cette variation dans le temps d'incubation n'avait pas affecté le résultat de culture (nous n'avons pas trouvé d'association).

La distribution des résultats des différents tests effectués dans le protocole de culture (incubation, coloration, PCR et résultat final) sont montrés dans le tableau V. En résumé, nous avons obtenu un total de 61 échantillons positif (48 FI et 13 EV), 1036 échantillons négatifs (962 FI et 74 EV) et le groupe que nous avons appelé contaminés de 273 échantillons (266 FI et 7 EV).

Les résultats plus intéressants de cette analyse ont été la classification de la distribution de résultats. Tous les résultats possibles des différents tests diagnostiques sont combinés dans un protocole en série et donne un résultat final pour l'interprétation (tableau V).

**Tableau V.** Distribution de résultats selon les différentes possibilités dans la culture de MAP au LEAQ.

<b>Incubation</b>	<b>Coloration</b>	<b>PCR</b>	<b>Résultat</b>	<b># EV</b>	<b># FI</b>	<b># total éch. (%)</b>
+	+	+	Positif	13	44	57 (4,14)
+	+	-	Négatif	0	3	3 (0,22)
+	Incertaine	+	Positif	0	4	4 (0,29)
+	Incertaine	-	Négatif	3	13	16 (1,45)
+	-	N/A	Contaminé	7	266	273 (19,9)
-	N/A	N/A	Négatif	71	946	1017 (74)
<b>Total</b>				<b>94</b>	<b>1276</b>	<b>1370</b>

# EV: nombre d'échantillons de l'environnement.

# FI : nombre d'échantillons des fèces individuelles.

## **Évaluation de l'utilisation de la PCR sur les cultures fécales contaminées (étude 2)**

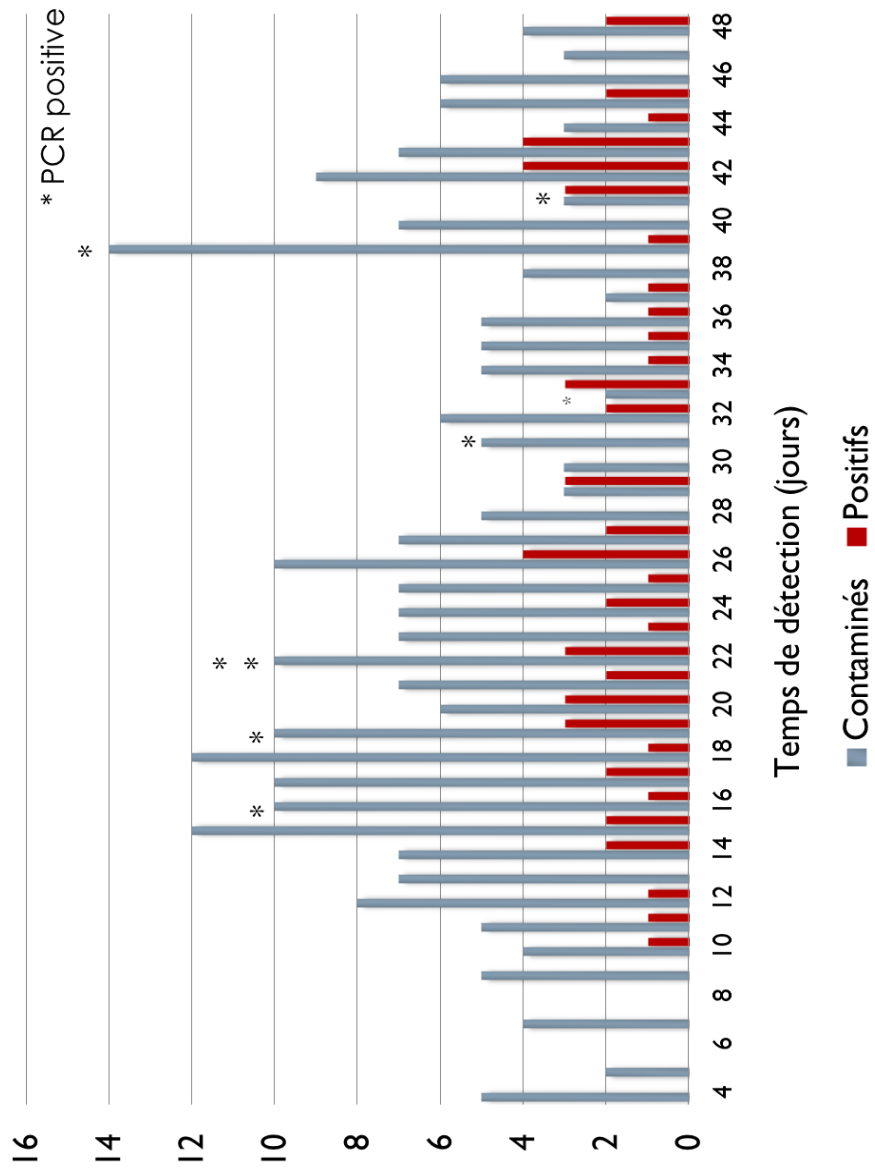
Nous avons trouvé comme résultats des analyses descriptives pour les échantillons contaminés, que : pour le groupe 1, un total de 1370 échantillons ont été traités au LEAQ en 2010 pour les différents projets de recherche sur le MAP. A partir de ces échantillons, 4,43% étaient positifs en culture primaire et 19,6% ont été déclarés contaminés : 262 FI (20,5%) et 7 EV (7,44%) (Tableau V). Au cours des 269 cultures contaminées testés, un total de 8 était positif par PCR (2,97%) : 7 cultures fécales individuelles (2,7%) IC 95% (1,1 - 5,4%) et 1 culture de l'environnement (14,3%) IC 95% (0,4 - 57,9%).

Dans le but de déterminer s'il y avait un certain effet des covariables sur les résultats, nous avons observé que la période de congélation à -80 ° C a été variable, à partir de 7 jours jusqu'à 102 jours avec une médiane de 58 jours pour les échantillons contaminés et 65 jours pour les non-contaminés. Nous avons trouvé qu'il y avait une différence statistiquement significative entre ces deux périodes (Wilcoxon,  $p = 0,02$ ).

Sur les échantillons contaminés nous avons aussi observé initialement (groupe 1) une tendance d'une détection précoce du signal lumineux (par le système MGIT<sup>TM</sup>) dû à la croissance microbienne, comme indiqué dans la Fig. 5. La plupart des échantillons (64%,  $n = 172$ ) ont généré un signal avant 30 jours d'incubation. Cela pourrait être dû à la détection

de la croissance plus rapide des microorganismes contaminants au lieu de la croissance de MAP, généralement plus lente. En comparant les échantillons contaminés avec les échantillons positifs (n = 61: incubation, coloration et PCR positifs) nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les temps de détection des deux groupes. Nous avons observé que les échantillons positifs présentent presque la même distribution de temps de détection que les échantillons contaminés. En plus, nous n'avons pas trouvé d'association entre le temps de détection et le résultat positif obtenu de la PCR effectuée sur les échantillons contaminés. Donc, les cultures positives au PCR ont eu des temps de détection à la culture largement distribués.

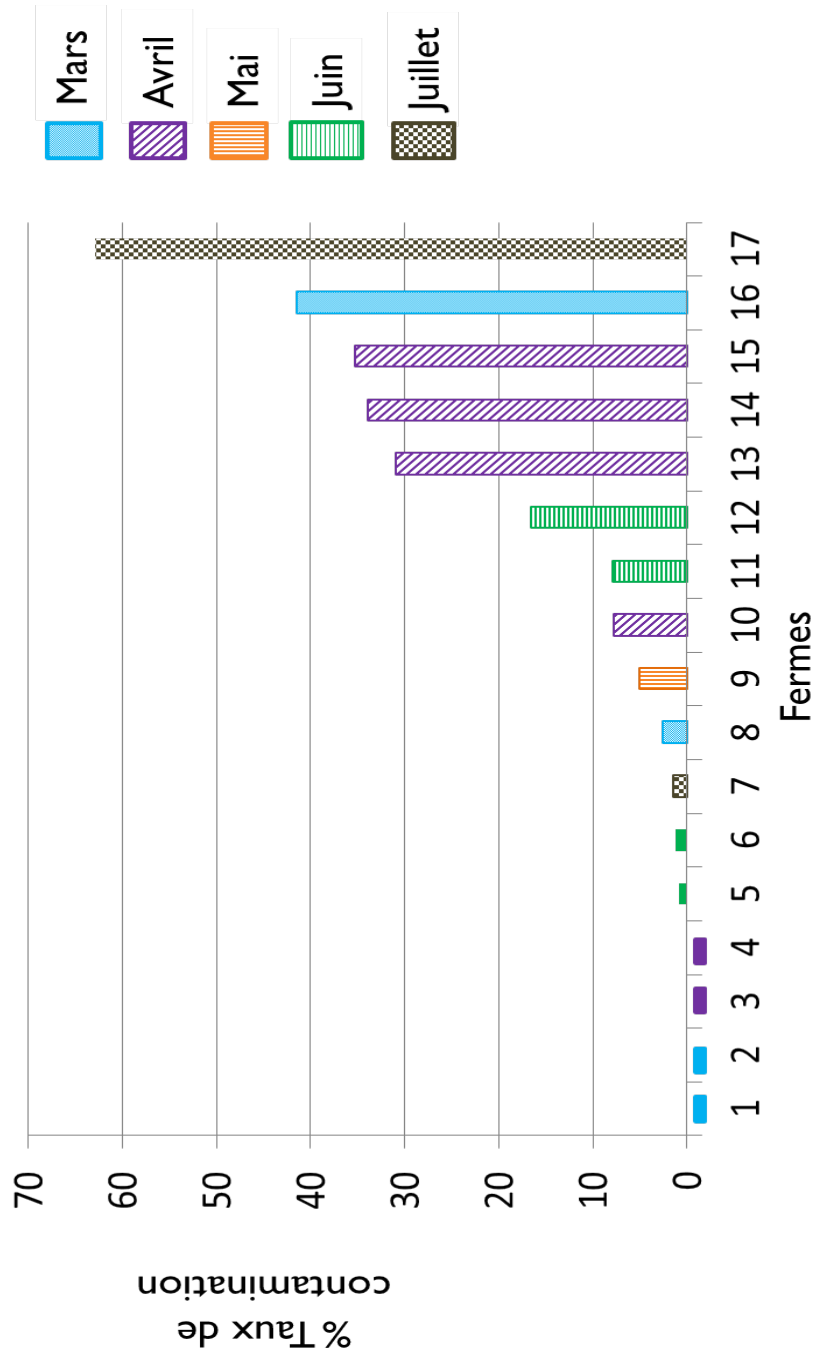
**Figure 5.** Distribution des échantillons contaminés (n : 269) et des positifs (n : 61) selon le temps de détection.



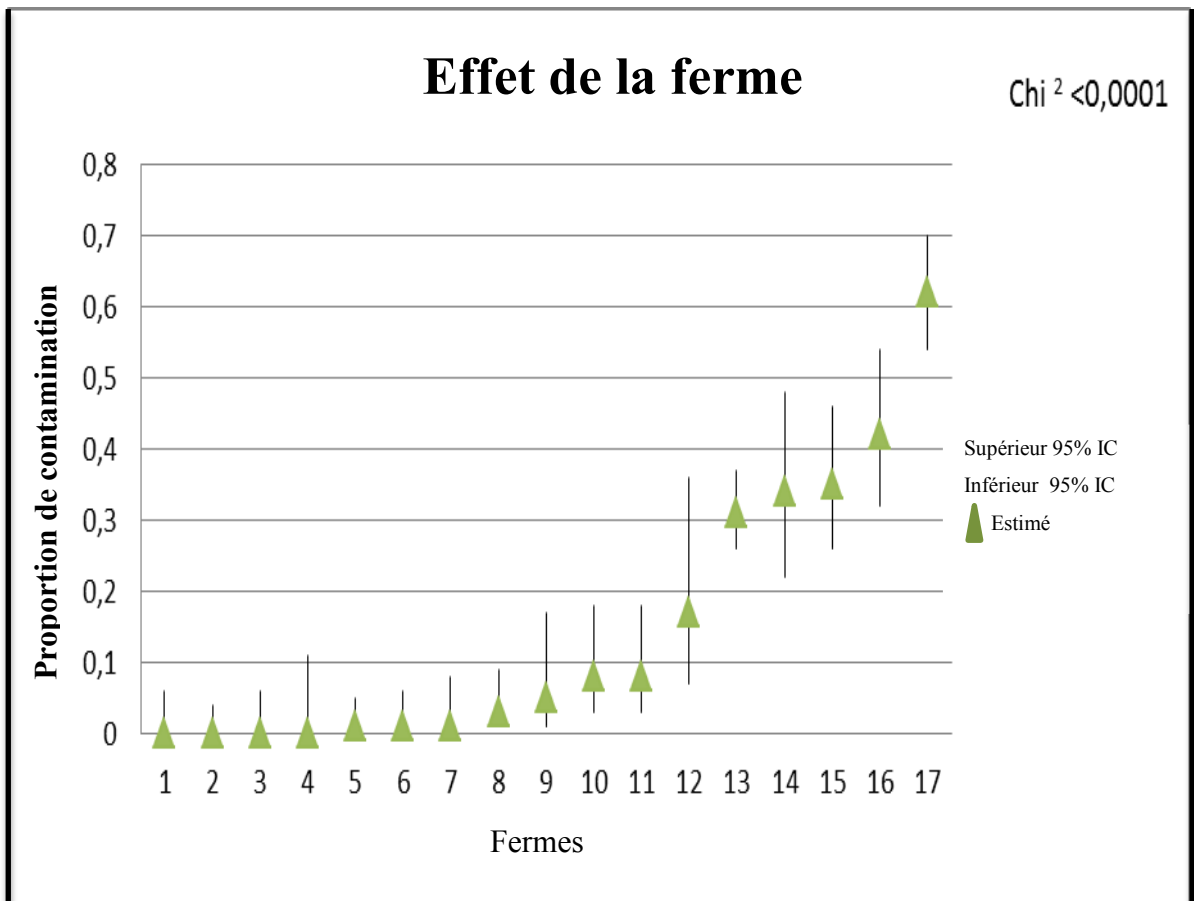


Les 1370 échantillons étaient en provenance de 17 fermes, 4 sans culture contaminée et 13 (représentés avec les 269 FI et EV contaminés) avec un taux de contamination variable de 0,9 à 63%, où le plus haut taux de contamination était associé aux mois d'Avril et de Juillet (Fig. 6). Les échantillons de l'environnement contaminés ( $n = 7$ ) étaient en provenance de 4 fermes. Un test de chi-carré a montré qu'il y a une différence significative entre les fermes ( $P < 0,0001$ ), et la comparaison des IC 95% indique que les échantillons ont une tendance à être distribués dans 3 groupes principalement selon la proportion de contamination, qui peut être aussi associée à chaque ferme et reliée à chaque mois. Donc, on peut voir que les deux groupes avec une plus haute proportion de contamination sont ceux correspondant aux fermes traitées dans les deux mois avec une plus haute proportion de contamination (regroupement par ferme/mois) (Fig. 7).

Figure 6. Distribution des cultures contaminées par ferme et par mois.



**Figure 7.** Effet de la ferme selon la distribution de la proportion de contamination et des limites de l'intervalle de confiance 95%



En ce qui concerne la distribution par mois des échantillons traités (Tableau VI), la proportion de cultures contaminées était très variable d'un mois à l'autre. Les mois d'Avril et de Juillet ont une proportion de contamination significativement majeure par rapport aux autres mois, mais ce résultat est confondu par l'effet de la ferme parce que les fermes avec le plus haut taux de contamination ont été traités dans ces 2 mois. L'effet de la ferme influence directement l'effet mois et ils ne peuvent pas être considérés comme des variables indépendantes dans l'analyse, les deux variables sont associés l'un à l'autre.

**Tableau VI.** Distribution des échantillons traités par mois.

<b>Mois du prélèvement</b>	<b># total éch. traités</b>	<b># éch. contaminés</b>	<b>Proportion contaminés</b>	<b>IC 95%</b>
Mars	300	33	0.11	0.08-0.15
Avril	538	131	0.24*	0.20-0.28
Mai	39	2	0.05	0.02-0.17
Juin	280	11	0.04	0.02-0.7
Juillet	213	92	0.43*	0.36-0.50
<b>Total</b>	<b>1370</b>	<b>269</b>	<b>0.19</b>	<b>--</b>

\* Différence significative (Wilcoxon  $P= 0.02$ )

Pour le groupe 2, nous avons trouvé 1 échantillon positif par PCR (1,14%) parmi les 88 cultures négatives. Avec ce nombre d'échantillons testés, nous pouvons dire que la prévalence de PCR-positifs (95% IC) dans ce groupe pourrait être comprise entre 0 et 6,2%.

## Discussion

L'étude et la compréhension de la dynamique de transmission de la paratuberculose est un des outils les plus importants dans le contrôle de la maladie. En considérant la nature insidieuse, la longue période d'incubation pendant laquelle les signes cliniques sont inapparents et le caractère incurable.

En premier lieu, il est pertinent de voir que la définition des termes utilisés, d'une étude à l'autre, varient beaucoup lorsqu'on parle d'introduction et de source d'achat. Selon les différents auteurs, l'introduction peut cibler autant l'achat de génisses, de vaches que de taureaux. De plus, le taux d'introduction peut être calculé en nombre d'animaux introduits chaque année, en nombre de têtes achetées via le nombre de têtes déjà existantes dans le troupeau et finalement, en nombre de têtes remplacées durant l'année. En ce qui concerne la définition de la source d'achat, on parle ici de marchés, de foires, d'encans et d'achats privés de sources connues ou non. Conséquemment, la source d'achat constitue un facteur d'importance sur lequel on peut s'appuyer lorsqu'on parle de contrôle et de gestion de troupeaux<sup>69</sup>. En plus de s'informer sur le statut de santé du troupeau d'origine, il devient aussi essentiel de s'interroger sur les mesures de gestion et sur la biosécurité appliquée par le vendeur avant d'effectuer un achat. Chaque transaction expose le troupeau à des risques de contamination, mais ces risques pourraient être grandement diminués si l'on prenait le temps de s'informer et de suivre une procédure d'achat stricte et préétablie. Dans ce sens,

plusieurs études<sup>16, 18, 27, 70-72</sup> démontrent des OR variables (1,27 à 19,22) pour l'achat de nouveaux animaux et le risque d'infection par le MAP. Plusieurs paramètres varient entre les études et peuvent faire varier les résultats d'une étude à l'autre. Parmi ces paramètres, nous retrouvons le type de mesure utilisé, l'objectif et la nature même des études ciblées, le type de test utilisés pour l'analyse statistique et les définitions utilisés par chaque auteur. De plus, la variation entre les données recueillis selon les études n'a pas permis de faire des analyses quantitatives (méta-analyses).

Nous avons trouvé dans l'analyse de la littérature que l'introduction de nouveaux animaux est un facteur de risque associé à la présence du MAP. Plusieurs études<sup>16, 18, 27, 70-72</sup> ont trouvé une association statistiquement significative entre le comportement d'achat des animaux et le risque d'être contaminé par le MAP. Toutes les études décrivent un ensemble de mesures de gestion d'une entreprise qui sont considérés importantes dans l'épidémiologie de la paratuberculose. La plupart de ces mesures visent à contrôler la dispersion de la maladie à l'intérieur du troupeau et seulement quelques facteurs mentionnent l'introduction des animaux comme un facteur de risque. Certaines études ont montré le risque attribué à l'achat d'animaux mais n'ont pas mesuré l'impact du risque (pas de mesures d'association) ou n'ont pas trouvé d'association significative<sup>17, 73-79</sup>. Les producteurs achètent souvent de nouveaux animaux pour améliorer le potentiel génétique de leur élevage, pour agrandir leur troupeau ou pour acquérir des animaux de remplacement. L'animal introduit peut être infecté et excréter le MAP tout en ne montrant

aucun signe clinique. Malheureusement, en raison du faible nombre de troupeaux certifiés comme exempts de la maladie<sup>18</sup>, l'achat de bovins provenant d'une source sûre est un défi et la principale méthode de prévention est de maintenir le troupeau complètement fermé. Tester les vaches achetées avant leur introduction dans la ferme n'est pas une méthode fiable à cause de la faible sensibilité des tests individuels sur l'animal surtout dans les stades peu avancés de la maladie<sup>18</sup>.

En regardant plus en détail les études analysées, celle de Daniels<sup>77</sup>, n'a pas trouvé d'association entre la présence de la maladie et le nombre d'animaux achetés. Toutefois, les fermes étudiées ont pris des mesures de contrôle en achetant des remplacements « propres ». Malheureusement, l'étude de Daniels<sup>77</sup> n'a pas défini précisément ce qu'on entend par « propre »; par exemple un animal cliniquement sain? ou un animal négatif à un test diagnostique? L'impact potentiel associé à certaines pratiques comme l'achat de nouveaux animaux est toujours relié aux mesures de contrôle appliquées pour diminuer le risque d'introduction. On peut donc affirmer que le risque varie selon le type d'achat<sup>79</sup> et selon les mesures qu'on applique pour le contrôle de la maladie.

Certaines études<sup>27, 72</sup> ont obtenues des résultats qui pourraient être considérés comme contradictoires. Çetinkaya<sup>27</sup> a montré que l'achat d'animaux de remplacements provenant d'une source privée a été associé à un risque accru de paratuberculose. Par contre, l'achat de remplacement provenant de sources connues est en général considéré comme une méthode

utile et efficace lorsqu'on veut réduire le risque d'introduction. Malheureusement aucune hypothèse plausible n'explique ce fait. De toute façon, nous devons considérer que les associations sont aveugles à la séquence temporelle. Si l'achat de remplacement d'une source connue est une stratégie de gestion pour réduire la transmission de la maladie, la séquence causale serait que le fait d'avoir déjà MAP a causé l'action de commencer à acheter des animaux de façon privée. Dans ce cas, l'effet de l'achat d'une source connue pourrait être faussement associé à une prévalence accrue du MAP. Aussi par leur étude, Tiwari et al<sup>72</sup> démontrent que l'achat des taureaux a été associé à un taux inférieur de vaches séropositives (facteur de protection). Cependant, ils ont émis l'hypothèse que les agriculteurs, qui maintiennent des taureaux dans leur troupeau, appliquent probablement d'autres mesures non-identifiées pour réduire la séroprévalence du MAP. Autrement dit, la variable étudiée s'avère une mesure de substitution pour certains facteurs préventifs non mesurés.

La recherche sur différentes banques de données a recensé un bon nombre de manuscrits, la plupart étudiant surtout les facteurs de transmission intra-troupeau et une autre partie sur l'achat d'animaux. À la fin du processus de sélection, parmi les études touchant notre sujet d'intérêt, quelques articles ont été retenues parce qu'ils ont mesuré l'impact du facteur de risque.



Afin d'évaluer la validité des études de référence, nous avons choisi nos critères d'évaluation qualitatives basés sur les critères utilisés par Doré et al<sup>12</sup>. Donc, pour évaluer la validité interne de ces mêmes études, nous avons pris en compte trois paramètres distincts : le type d'étude, la fiabilité des tests diagnostiques et la définition des cas. En considérant tous ces paramètres de notre classification, la plupart des études concernant le risque associé à l'achat d'animaux avaient une validité interne variant de faible à modérée. Pour évaluer la validité externe des études de référence, la stratégie d'échantillonnage et la taille de l'échantillon ont été analysés. La plupart des études ont été qualifiées de modérées à hautes. Nous avons résumé l'information de façon qualitative en raison de la variabilité trouvée dans la description des facteurs de risque et de la grande variabilité dans la présentation des résultats. L'évaluation qualitative est demeurée subjective et comporte des biais potentiels.

Il faut cependant souligner que la plupart des études étaient transversales et que cette approche n'a pas permis de faire une association de causalité entre l'achat d'animaux et la transmission de la paratuberculose. Bien qu'il existe plusieurs inconvénients à utiliser une approche observationnelle et transversale, la pertinence de ce type d'étude par rapport aux situations réelles reste modérée et très utilisée en médecine vétérinaire<sup>80</sup>. L'utilisation des critères de classification veut donc regrouper l'information issue d'études et faciliter l'interprétation et l'analyse des résultats selon des caractéristiques utilisées par d'autres

auteurs<sup>12, 72</sup>. Nous constatons qu'il serait important de développer des études qui mettent en évidence la relation de causalité entre les facteurs de risque et la maladie de Johne.

Suite à nos observations, nous constatons que peu d'études mesuraient l'impact de la présence d'animaux sauvages ou d'autres espèces domestiques comme facteur augmentant le risque d'infection par le MAP. Toutefois, de nombreuses références montrent la présence de MAP chez les espèces sauvages ou domestiques (lapins, oiseaux, chats sauvages, rats, ratons laveurs, opossums, cerfs, souris, moutons et chèvres). Nous avons recensé 7 manuscrits<sup>16, 27, 39, 41, 77, 78, 81</sup> qui mesurent l'association entre le facteur et la présence ou la prévalence de la maladie dans la ferme. Quelques études (n = 4)<sup>16, 27, 39, 77</sup> ont trouvé une association positive entre la présence d'autres animaux dans les troupeaux et la paratuberculose chez les bovins. Par exemple, le co-pâturage des génisses avec les moutons ou les chèvres a été significativement associé à la détection de MAP dans le troupeau bovin<sup>16</sup>. Aussi, l'association entre l'utilisation des pâturages par les vaches et le risque de contact entre le fumier des vaches et celui des cerfs et des lapins a été trouvé significative<sup>39</sup>. Toutefois, en raison du faible nombre d'échantillons positifs chez les animaux sauvages dans cette étude, l'association entre MAP dans les troupeaux infectés et la faune sauvage n'était pas significative. Ils ont également montré que le risque de transmission inter-espèces peut se produire dans les deux sens<sup>39</sup> soit de la faune sauvage vers les bovins et les bovins vers la faune sauvage. Étant donné la faible prévalence de la paratuberculose chez les espèces sauvages étudiées, ils seraient plus à risque d'être infectés par les bovins<sup>35</sup>.

Dans plusieurs études, le MAP a été cultivé à partir de fèces ou de tissus provenant de certaines espèces, mais aucune preuve de transmission réelle n'est apportée<sup>35</sup>. Alors, la question demeure ouverte à savoir si les animaux sauvages sont excréteurs passifs de MAP ou s'ils deviennent réellement infectés. Stevenson<sup>35</sup> a démontré que le diagnostic de la paratuberculose et l'isolement de la même souche de MAP à partir de différentes espèces sur la même propriété était possible. Afin d'évaluer le risque relatif de transmission ils ont suggéré qu'une distinction entre l'excrétion passive et la transmission active doit être faite, possiblement en regardant si les animaux sauvages ont des lésions classiques prouvant l'infection. Ces auteurs ont également étudié la possibilité de contact entre les espèces. Malheureusement, dans cette étude, la relation entre la présence de la paratuberculose chez les bovins et les animaux sauvages n'a pas été mesurée. Le rôle de la faune sauvage en tant que vecteurs et réservoirs de MAP semble être possible, mais l'amplitude du risque n'est pas bien documentée. Alors, il reste encore beaucoup de recherche à faire sur le risque réel que les animaux sauvages constituent pour les bovins.

Les revues systématiques ont de plus en plus remplacé les revues narratives classiques et les commentaires d'experts, comme méthode pour résumer les évidences scientifiques<sup>82, 83</sup>. La rigueur dans la révision des évidences doit être aussi élevée que lors de la production de cette évidence au premier regard<sup>82</sup>. Dans cette optique, nous avons suivi un processus structuré pour une revue systématique de la littérature, qui comprend plusieurs étapes<sup>84</sup>. De

plus, nous nous sommes attardés sur les concepts les plus importants relatifs à chaque question et les mots-clés. Dans notre cas, il y avait trois concepts principaux (pour toutes les questions) qui ont conduit la ligne générale de cette étude, "paratuberculose", la "contamination" et le "bétail".

Les quatre bases de données (CAB, Medline-PubMed, Embase et Web of Science) ont été considérées comme les plus importantes en matière de sujets médicaux et agricoles. L'extraction des données pour l'analyse a été mise dans une grille avec toute l'information que nous avons considérée essentielle pour accomplir l'étape de synthèse des données, des conclusions et de l'information spécifique sur les sujets qui ont été utiles pour répondre aux questions. Nous avons investigué 2 questions. Même si la conduite de la recherche pour chaque question était laborieuse, nous avons considéré que les deux étaient pertinentes pour l'objectif général de trouver des preuves scientifiques sur les facteurs de risque associés à l'introduction de la maladie dans un troupeau.

En résumé, avec la revue systématique, nous avons confirmé que l'achat d'animaux constitue un facteur de risque lorsqu'on parle d'introduire la paratuberculose dans un troupeau. Par ailleurs, notre révision n'a pas trouvé de preuves suffisantes permettant d'évaluer l'importance du contact entre les animaux sauvages, domestiques et de bétail, en sachant que le risque existe.

Par rapport au deuxième volet de ce mémoire, la distribution de résultats observés nous a permis de distinguer un groupe important des échantillons contaminés et de mieux comprendre la dynamique du processus diagnostique et nous a permis d'identifier à partir de l'analyse des données et de l'application de certains tests statistiques l'effet possible des covariables sur les résultats des tests diagnostiques.

Malheureusement dans notre analyse rétrospective des données, nous n'avions pas accès à plusieurs variables qui nous semblent intéressantes. Voici quelques exemples : la personne qui a prélevé l'échantillon, les conditions du prélèvement dans la ferme (hygiène, humidité, température, contenant adéquat), conditions et temps de livraison d'échantillon de la ferme au laboratoire. Tous ces paramètres pourraient avoir un effet sur le taux de contamination des échantillons. Nous avons analysé l'effet du temps de congélation en tenant en compte du fait que les échantillons traités dans cette étude ont tous été conservés congelés avant la culture. Nous n'avons pas pu les comparer avec des échantillons « frais » pour voir l'effet réel de la congélation. Nous avons comparé la période de congélation entre les échantillons contaminés et non contaminés. Les échantillons non contaminés avaient été congelés plus longtemps par rapport aux échantillons contaminés. Ceci peut suggérer qu'une longue période de congélation pourrait avoir un effet délétère sur la survie de contaminants résultant en un taux de contamination plus faible. Cependant, cet effet peut également affecter la survie de MAP et le processus de la culture subséquente. Mais nous ne considérons pas que 7 jours de variation dans le temps de congélation soit un temps aussi

différent et significatif pour expliquer l'absence de contaminants. De toute façon comme celui était une analyse rétrospective nous n'avons pas eu la possibilité de tester les mêmes échantillons dans les différentes conditions pour établir des conclusions plus puissantes et significatives par rapport au temps de congélation.

Le taux de contamination observé (19.6%) était relativement haut si on le compare avec ce qui est rapporté dans la littérature (5 à 15%)<sup>47, 56, 66</sup>. La faible sensibilité et la dépendance du statut de la culture est déjà un défi à surmonter, puis l'obtention d'un résultat déclaré contaminé après le long et coûteux processus est décevant parce que ce résultat n'a aucune valeur diagnostique. Nous avons observé un taux de contamination variable et avec une différence significative entre les fermes, comme rapporté dans la littérature<sup>47</sup>.

Nous avons constaté que l'intégration d'une méthode de confirmation (PCR) dans le processus de diagnostic de la culture du MAP peut être un moyen efficace de donner une valeur diagnostique à un échantillon déclaré comme contaminé. L'ajout de cette étape de confirmation nous a permis de détecter 2,98% de plus de positifs parmi les cultures contaminées déjà étudiées. Même si ce n'est pas un haut taux positif, la PCR utilisée comme méthode de confirmation offre des valeurs de sensibilité de presque 100% lorsqu'un nombre suffisant de cellules de MAP était présente<sup>66</sup>. De toute façon, étant donné que l'identification de MAP a aussi montré de spécificité inférieure à 100% à plusieurs cas, toutes les résultats diagnostiques microbiologiques doivent être remis en question si elles

n'ont pas de sens épidémiologique<sup>49</sup>. Ainsi, la présence d'ADN de MAP peut être mieux décelée. Il est à noter que ce résultat est différent d'un résultat de culture, parce que le test de culture évalue plutôt la présence et croissance d'organismes viables tandis que la PCR détecte la présence d'ADN. L'interprétation d'un résultat positif à la culture et au PCR est donc différente. La PCR démontre une positivité de culture lorsqu'il est utilisé dans un protocole de confirmation. Par ailleurs, ce résultat permet de confirmer que la présence de contaminants dans les échantillons de matières fécales et de l'environnement peut interférer avec la détection de MAP dans la culture.

Nous avons observé un problème de contamination plus important avec les cultures de fèces individuelles que les cultures de l'environnement. Cependant, le cocktail antibiotique utilisé pour décontaminer les échantillons de l'environnement est différent (10 fois plus concentrées en acide nalidixique) que celui utilisé pour les échantillons individuels. C'est une explication plausible pour expliquer le taux de contamination plus faible dans les cultures environnementales. Des études additionnelles sont nécessaires pour évaluer l'efficacité des protocoles de décontamination et l'effet sur le taux de contamination. On pourrait aussi considérer la résistance aux antibiotiques utilisés dans les protocoles de décontamination pour certaines souches de microorganismes<sup>49</sup>, comme une explication aux problèmes de contamination reliés à certaines fermes. Il existe peu d'information sur ce sujet mais il serait intéressant de vérifier cette hypothèse dans des études à venir.

En analysant des possibles hypothèses qui pourraient expliquer la présence de contaminants dans les échantillons, nous avons observé que le phénomène de regroupement par ferme, pourrait être expliqué par la diète que consomment les animaux au moment du prélèvement. Mais ce phénomène ne peut pas être complètement séparé de l'effet saison que nous avons observé aussi liée à la présence des contaminants, parce qu'en effet la diète varie selon la saison et selon la ferme, donc ces trois variables (diète, saison et ferme) sont dépendantes l'une de l'autre. Par exemple, la consommation d'ensilage ou d'autres produits fermentés favorise la croissance de micro-organismes dans les fèces qui survivent au protocole de décontamination<sup>49</sup>. Comme mentionné au-dessus, la saison de l'année est un facteur à tenir en compte lors de l'analyse de la présence de contaminants dans les cultures<sup>47</sup>. Les échantillons traités dans notre étude ont été prélevés entre Mars et Juillet. Ce sont des mois avec une habituelle variation de la température (changement saisonnier) qui pourrait créer des conditions environnementales particulières et contribuer à la prolifération des micro-organismes. Nous avons observé une différence significative pour les mois d'Avril et Juillet. Ce résultat a été confondu par l'effet ferme car les fermes prélevées dans ces deux mois ont été celles ayant la plus forte proportion de cultures contaminées. Nous avons étudié une courte période de l'année et nous n'avons pas pu mettre en évidence un véritable effet de la saison. Afin de déterminer s'il y a une influence réelle de la période de l'année sur la présence de contaminants, il faudrait évaluer un plus grand nombre d'échantillons provenant de plusieurs fermes et tout au long de l'année. De la même façon, il faudrait évaluer un plus grand nombre de fermes pour étudier plus en profondeur l'effet ferme.



Une autre approche pour confirmer les résultats de culture pourrait être d'appliquer la coloration AAR (simple et peu dispendieux) à la place de la PCR pour toutes les cultures négatives et seulement la PCR pour les colorations positives. Selon l'étude de Kim et al<sup>66</sup> l'étape de coloration supplémentaire sur les cultures négatives après incubation avait aidé à détecter 15% plus de cultures positives que simplement en testant les cultures positives.

En résumé, la contamination des cultures fécales demeure un obstacle significatif à la culture de MAP, et l'amélioration des protocoles de décontamination serait une avancée majeure, permettant une plus grande utilisation de la culture liquide<sup>49</sup>. L'inclusion de la PCR comme outil de confirmation pour les cultures contaminées dans le protocole de diagnostic pour MAP, permet d'identifier les échantillons positifs parmi les échantillons contaminés. Par contre, l'information obtenue est différente car elle met en évidence la présence d'ADN. La présence des contaminants diminue probablement la performance de sensibilité de la PCR. Il n'y a pas de raison de croire que la spécificité est réduite. Ce résultat contribue à l'amélioration du processus de diagnostic et à optimiser l'identification des animaux ou des troupeaux positifs et d'avancer dans le contrôle de la maladie.

## **Conclusion**

Les résultats obtenus dans notre étude nous ont donné des informations très intéressantes pour la compréhension de la problématique que pose la contamination des cultures. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les facteurs favorisant le problème de contamination. Des études concernant les protocoles de décontamination ou les stratégies qui visent à réduire les contaminants sans risque de diminuer le MAP, sont aussi nécessaires.

En plus, nous avons constaté que la PCR comme outil complémentaire de confirmation pour les échantillons présentant des problèmes de contamination à la culture est utile pour récupérer ces échantillons et trouver une information valide et utile pour les médecins vétérinaires. Des études sur la façon la plus efficace en termes de convenance, rapidité et coûts sont nécessaires, afin de clarifier les connaissances sur le problème de contamination et les solutions possibles pour progresser dans l'efficacité du diagnostic de MAP.

Malgré l'intérêt pour la paratuberculose au Canada et ailleurs dans le monde, il y a toujours un besoin de continuer les avancements sur la compréhension de l'épidémiologie de la maladie. Les programmes de contrôle doivent inclure plusieurs mesures de gestion et tenir en compte plusieurs facteurs de risque, comme les facteurs de transmission inter-troupeaux,

afin d'éviter l'introduction de la maladie comme étape primaire de prévention. Le contrôle de la faune sauvage ou d'autres animaux domestiques sur la ferme, particulièrement leur interaction avec les animaux susceptibles (veaux et vaches) est une mesure qui n'est pas fréquemment considéré mais qui est importante dans un programme de prévention de la paratuberculose.

À l'avenir il serait intéressant de trouver ou développer des études adaptés pour les conditions de production au Québec, qui pourront avoir des résultats significatifs pour pouvoir démontrer le rôle de ces facteurs (achat d'animaux et présence d'autres animaux) et donner des mesures plus exactes de l'impact sur l'épidémiologie et la transmission de la paratuberculose.

Avec le développement de ces études et les résultats obtenus, nous voulons contribuer à la compréhension de la maladie et contribuer avec l'amélioration et progrès du Programme Volontaire de Prévention et Contrôle de la Paratuberculose au Québec (PVPCPQ).

## Bibliographie

1. Bakker D, Willemsen PT, and van Zijderveld FG. Paratuberculosis recognized as a problem at last: a review. *Vet Q* 2000;22: 200-204.
2. Barkema HW, Hesselink JW, McKenna SLB, Benedictus G, and Groenendaal H. Global prevalence and economics of infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ruminants. In: MA Behr and DM Collins, eds. *Paratuberculosis: organism, disease, control* Wallingford: CABI, 2010: p. 10-21.
3. Lombard JE, Garry FB, McCluskey BJ, and Wagner BA. Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* 2005;227: 1975-1981.
4. Benedictus G, Dijkhuizen AA, and Stelwagen J. Economic losses to farms due to paratuberculosis in cattle. *Tijdschr Diergeneeskd* 1985;110: 310-319.
5. Ott SL, Wells SJ, and Wagner BA. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev Vet Med* 1999;40: 179-192.
6. Tiwari A, VanLeeuwen JA, Dohoo IR, Stryhn H, Keefe GP, and Haddad JP. Effects of seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* on

- culling in dairy cattle in four Canadian provinces. *Vet Microbiol* 2005;109: 147-158.
7. Johnson-Ifearulundu YJ, Kaneene JB, Sprecher DJ, Gardiner JC, and Lloyd JW. The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on days open in Michigan, USA, dairy cows. *Prev Vet Med* 2000;46: 171-181.
  8. McKenna SLB, Keefe GP, Tiwari A, VanLeeuwen J, and Barkema HW. Johne's disease in Canada Part II: Disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. *Can Vet J* 2006;47: 1089-1099.
  9. Manning EJ and Collins MT. History of Paratuberculosis. In: MA Behr and DM Collins, eds. *Paratuberculosis: organism, disease, control* Wallingford: CABI, 2010: p. 1 - 9.
  10. Stevenson K. Comparative Differences between Strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: MA Behr and DM Collins, eds. *Paratuberculosis: organism, disease, control* Wallingford: CABI, 2010: p. 126 - 137.
  11. Windsor PA and Whittington RJ. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Vet J* 2010;184: 37-44.
  12. Dore E, Pare J, Cote G, et al. Risk factors associated with transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to calves within dairy herd: a systematic review. *J Vet Intern Med* 2012;26: 32-45.

13. Giese SB and Ahrens P. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Vet Microbiol* 2000;77: 291-297.
14. Sweeney RW, Whitlock RH, and Rosenberger AE. *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *J Clin Microbiol* 1992;30: 166-171.
15. Whittington RJ and Windsor PA. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* : a critical review and meta-analysis. *Vet J* 2009;179: 60-69.
16. Barrett DJ, Mee JF, Mullowney P, et al. Risk factors associated with Johne's disease test status in dairy herds in Ireland. *Vet Rec* 2011;168: 410.
17. Orpin P, Duthie S, and Grove-White DH. The use of targeted sampling and risk factor analysis to investigate the presence of Johnes disease in dairy herds. *Cattle Pract* 2005;13: 219-225.
18. Wells SJ and Wagner BA. Herd-level risk factors for infection with *Mycobacterium paratuberculosis* in US dairies and association between familiarity of the herd manager with the disease or prior diagnosis of the disease in that herd and use of preventive measures. *J Am Vet Med Assoc* 2000;216: 1450-1457.

19. Sweeney RW. Transmission of paratuberculosis. *Vet Clin North Am* 1996;12: 305-312.
20. Côté G. Enquête de prévalence de la paratuberculose, de la leucose bovine enzootique et des immunotolérants à la diarrhée virale bovine dans les troupeaux laitiers du Québec. Québec: Institut National de Santé Animale, 2003.
21. Bergeron L, Francoz D, and Nadeau M. Enquête sur la prévalence des mycoplasmes dans le lait de réservoir des troupeaux laitiers du Québec. Québec: MAPAQ, 2010.
22. USDA. Johne's disease on U.S. dairy operations, 2002 - Annual report United States Department of Agriculture. Fort Collins: USDA, 2002.
23. Manning EJB and Collins MT. Epidemiology of paratuberculosis. In: MA Behr and DM Collins, eds. *Paratuberculosis: organism, disease, control* Wallingford: CABI, 2010: p. 22-28.
24. MAPAQ. Revue d'épidémiosurveillance animale du RAIZO. Bilan 2011, 2011.
25. Correia-Gomes C, Mendonca D, and Niza-Ribeiro J. Risk associations to milk ELISA result for paratuberculosis in dairy cows in northern Portugal using a multilevel regression model. *Rev Med Vet-Toulouse* 2010;161: 295-301.
26. Raizman EA, Wells SJ, and Jordan PA. Can *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* be transmitted from cattle to deer and rabbits, and vice versa?

Proceedings of the Thirty-Seventh Annual Conference, American Association of Bovine Practitioners, 2004: 206-207, 273-274.

27. Cetinkaya B, Erdogan HM, and Morgan KL. Relationships between the presence of Johne's disease and farm and management factors in dairy cattle in England. *Prev Vet Med* 1997;32: 253-266.
28. Greig A, Stevenson K, Perez V, Pirie AA, Grant JM, and Sharp JM. Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Rec* 1997;140: 141-143.
29. Behr MA and Collins DM. Paratuberculosis: organism, disease, control. Wallingford: CABI, 2010:375.
30. Palmer MV, Stoffregen WC, Carpenter JG, and Stabel JR. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (Map) from feral cats on a dairy farm with Map-infected cattle. *J Wildl Dis* 2005;41: 629-635.
31. Beard PM, Daniels MJ, Henderson D, et al. Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J Clin Microbiol* 2001;39: 1517-1521.
32. Kopecna M, Trcka I, Lamka J, et al. The wildlife hosts of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in the Czech Republic during the years 2002-2007. *Vet Med (Praha)* 2008;53: 420-426.



33. Godfroid J, Boelaert F, Heier A, et al. First evidence of Johne's disease in farmed red deer (*Cervus elaphus*) in Belgium. *Vet Microbiol* 2000;77: 283-290.
34. Hutchings MR, Stevenson K, Greig A, Davidson RS, Marion G, and Judge J. Infection of non-ruminant wildlife by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: MA Behr and DM Collins, eds. *Paratuberculosis: organism, disease, control* Wallingford: CABI, 2010: p. 188-200.
35. Stevenson K, Alvarez J, Bakker D, et al. Occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants. *BMC Microbiol* 2009;9: 212.
36. Greig A, Stevenson K, Perez V, Pirie AA, Grant JM, and Sharp JM. Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Rec* 1997.
37. Daniels MJ, Ball N, Hutchings MR, and Greig A. The grazing response of cattle to pasture contaminated with rabbit faeces and the implications for the transmission of paratuberculosis. *Vet J* 2001;161: 306-313.
38. Judge J, Greig A, Kyriazakis I, and Hutchings MR. Ingestion of faeces by grazing herbivores - risk of inter-species disease transmission. *Agr Ecosyst Environ* 2005;107: 267-274.

39. Greig A, Stevenson K, Henderson D, et al. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J Clin Microbiol* 1999;37: 1746-1751.
40. Daniels MJ, Hutchings MR, and Greig A. The risk of disease transmission to livestock posed by contamination of farm stored feed by wildlife excreta. *Epidemiol Infect* 2003;130: 561-568.
41. Corn JL, Manning EJB, Sreevatsan S, and Fischer JR. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging birds and mammals on livestock premises. *Appl Environ Microbiol* 2005;71: 6963-6967.
42. Hutchings MR, Daniels MJ, Henderson D, and Greig A. Potential wildlife to ruminant transmission routes for *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *Proceedings of the Seventh International Colloquium on Paratuberculosis, 2003*: 363-367.
43. Nielsen SS, Nielsen KK, Huda A, Condron RJ, and Collins MT. *Diagnostic techniques for paratuberculosis*. Brussels: International Dairy Federation, 2001.
44. Whipple DL, Callihan DR, and Jarnagin JL. Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. *J Vet Diagn Invest* 1991;3: 368-373.

45. Göran B and Herthnek D. Diagnosis of paratuberculosis by PCR. In: MA Behr and DM Collins, eds. Paratuberculosis : Organism, Disease, Control Wallingford, UK: CABI, 2010: p. 267-283.
46. Englund S, Ballagi-Pordany A, Bolske G, and Johansson KE. Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;33: 163-171.
47. Whittington RJ. Factors affecting isolation and identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from fecal and tissue samples in a liquid culture system. *J Clin Microbiol* 2009;47: 614-622.
48. Nielsen SS. Immune-based Diagnosis of Paratuberculosis. In: MA Behr and DM Collins, eds. Paratuberculosis : Organism, Disease, Control Wallingford, UK: CABI, 2010: p. 284-293.
49. Whittington R. Cultivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: MA Behr and DM Collins, eds. Paratuberculosis : Organism, Disease, Control Wallingford, UK: CABI, 2010: p. 244-266.
50. Timms VJ, Gehringer MM, Mitchell HM, Daskalopoulos G, and Neilan BA. How accurately can we detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection? *J Microbiol Methods* 2011;85: 1-8.

51. Alinovi CA, Ward MP, Lin TL, Moore GE, and Wu CC. Real-time PCR, compared to liquid and solid culture media and ELISA, for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Vet Microbiol* 2009;136: 177-179.
52. Sockett DC, Carr DJ, and Collins MT. Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a commercial DNA probe for diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in cattle. *Can J Vet Res* 1992;56: 148-153.
53. de Juan L, Alvarez J, Aranaz A, et al. Molecular epidemiology of Types I/III strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolated from goats and cattle. *Vet Microbiol* 2006;115: 102-110.
54. Kim YG, Bech-Nielsen S, Gordon JC, Slemmons RD, and Spangler E. Comparison of two methods for isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples. *Am J Vet Res* 1989;50: 1110-1113.
55. Cousins DV, Evans RJ, and Francis BR. Use of BACTEC radiometric culture method and polymerase chain reaction for the rapid screening of faeces and tissues for *Mycobacterium paratuberculosis*. *Aust Vet J* 1995;72: 458-462.
56. Nielsen SS, Kolmos B, and Christoffersen AB. Comparison of contamination and growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on two different media. *J Appl Microbiol* 2004;96: 149-153.

57. Secott TE, Ohme AM, Barton KS, Wu CC, and Rommel FA. Mycobacterium paratuberculosis detection in bovine feces is improved by coupling agar culture enrichment to an IS 900 -specific polymerase chain reaction assay. J Vet Diagn Invest 1999;11: 441-447.
58. Kalis CH, Hesselink JW, Russchen EW, Barkema HW, Collins MT, and Visser IJR. Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine fecal samples. J Vet Diagn Invest 1999;11: 345-351.
59. Collins MT, Kenefeck KB, Sockett DC, Lambrecht RS, McDonald J, and Jorgensen JB. Enhanced radiometric detection of Mycobacterium paratuberculosis by using filter-concentrated bovine fecal specimens. J Clin Microbiol 1990;28: 2514-2519.
60. Jorgensen JB. An improved medium for culture of Mycobacterium paratuberculosis from bovine faeces. Acta Vet Scand 1982;23: 325-335.
61. Mason O, Marsh IB, and Whittington RJ. Comparison of immunomagnetic bead separation-polymerase chain reaction and faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in sheep faeces. Aust Vet J 2001;79: 497-500.
62. Marsh IB and Whittington RJ. Progress towards a rapid polymerase chain reaction diagnostic test for the identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces. Mol Cell Probes 2001;15: 105-118.

63. Olsen I, Sigurdardottir OG, and Djonne B. Paratuberculosis with special reference to cattle: a review. *Vet Q* 2002;24: 12-28.
64. Collins MT. Diagnosis of paratuberculosis. *Vet Clin North Am* 2011;27: 581-591, vi.
65. Harris NB and Barletta RG. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin Microbiol Rev* 2001;14: 489 - 512.
66. Kim SG, Kim EH, Lafferty CJ, et al. Use of conventional and real-time polymerase chain reaction for confirmation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a broth-based culture system ESP II. *J Vet Diagn Invest* 2004;16: 448-453.
67. MAPAQ. Protocole Technique - Détection de *Mycobacterium avium* spp *paratuberculosis*. Québec, Canada: Ministère d'Agriculture, Pêcheries et Alimentation du Québec, 2011.
68. Harris B, Dykema, P., Fett, K., Stuber, T., Stokes, K. Laboratory methods for isolation and identification of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (Johne's Disease). In: VS USDA, ed. *Johne's Manual* vol. 3. Ames, IA: USDA, 2009: p. 34-167.
69. Wells SJ. Biosecurity on dairy operations: Hazards and risks. *J Dairy Sci* 2000;83: 2380-2386.

70. Nielsen SS and Toft N. Effect of management practices on paratuberculosis prevalence in Danish dairy herds. *J Dairy Sci* 2011;94: 1849-1857.
71. Hirst HL, Garry FB, Morley PS, et al. Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection among dairy cows in Colorado and herd-level risk factors for seropositivity. *J Am Vet Med Assoc* 2004;225: 97-101.
72. Tiwari A, Vanleeuwen JA, Dohoo IR, et al. Risk factors associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* seropositivity in Canadian dairy cows and herds. *Prev Vet Med* 2009;88: 32-41.
73. Goodger WJ, Collins MT, Nordlund KV, et al. Epidemiologic study of on-farm management practices associated with prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1996;208: 1877-1881.
74. Obasanjo IO, Grohn YT, and Mohammed HO. Farm factors associated with the presence of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in dairy herds on the New York State Paratuberculosis Control Program. *Prev Vet Med* 1997;32: 243-251.
75. Ansari-Lari M, Haghkhah M, Bahramy A, and Baهران AMN. Risk factors for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Fars province (Southern Iran) dairy herds. *Trop Anim Health Prod* 2009;41: 553-557.

76. Cashman W, Buckley J, Quigley T, et al. Risk factors for the introduction and within-herd transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) infection off 59 Irish dairy herds. *Ir Vet J* 2008;61: 464-467.
77. Daniels MJ, Hutchings MR, Allcroft DJ, McKendrick IJ, and Greig A. Risk factors for Johne's disease in Scotland - the results of a survey of farmers. *Vet Rec* 2002;150: 135-139.
78. Muskens J, Elbers ARW, van Weering HJ, and Noordhuizen JPTM. Herd management practices associated with paratuberculosis seroprevalence in Dutch dairy herds. *J Vet Med* 2003;50: 372-377.
79. Nielsen SS and Toft N. Assessment of management-related risk factors for paratuberculosis in Danish dairy herds using Bayesian mixture models. *Prev Vet Med* 2007;81: 306-317.
80. Dohoo I, Martin W, and Stryhn H. *Veterinary Epidemiologic Research*. 2 ed. Charlottetown: VER Inc. Charlottetown. Prince Edward Island, Canada, 2010.
81. Raizman EA, Wells SJ, Jordan PA, DelGiudice GD, and Bey RR. *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* from free-ranging deer and rabbits surrounding Minnesota dairy herds. *Can J Vet Res* 2005;69: 32-38.
82. Hemingway P and Brereton N. What is a systematic review? Hayward Medical Communications. 2009: 1-8. Last accessed Access Date.



83. Torgerson C. Systematic Reviews. London: Continuum International Publishing group, 2003:102.
84. Sargeant JM, Rajic A, Read S, and Ohlsson A. The process of systematic review and its application in agri-food public-health. *Prev Vet Med* 2006;75: 141-151.