

Université de Montréal

**Transmission de *Mycobacterium avium* ssp.
paratuberculosis dans les troupeaux de bovins laitiers et
dépistage de l'infection par la culture de l'environnement
au Québec**

par Elizabeth Doré

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

Décembre 2012

© Elizabeth Doré, 2012

Résumé

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) cause la maladie de Johne, une maladie chronique et incurable affectant les ruminants partout dans le monde. Plusieurs pays ont mis en place des programmes de contrôle afin de prévenir la transmission entre et au sein des troupeaux. Afin d'arriver à prévenir et contrôler cette maladie, une bonne compréhension des facteurs de risque impliqués dans la transmission est essentielle. Des tests diagnostiques performants et à coût abordable sont aussi nécessaires afin de détecter la présence du MAP et/ou les animaux infectés. L'objectif de la première étude était de réviser systématiquement la littérature scientifique concernant les facteurs de risque associés à la transmission du MAP aux génisses laitières. La présence d'une association significative entre les facteurs de risque concernant l'environnement néonatal, le colostrum, le lait, le logement des veaux et le contact des veaux avec le fumier de vaches adultes et la transmission du MAP a été compilée de 23 articles. Le contact des veaux avec le fumier de vaches adultes est le facteur de risque le plus important dans la transmission du MAP. L'objectif de la seconde étude était d'évaluer la relation entre le nombre d'échantillons de l'environnement positifs pour le MAP et la prévalence individuelle d'excrétion fécale dans les troupeaux laitiers entravés du Québec. Le nombre de cultures positives d'échantillons de l'environnement s'est avéré associé à la prévalence individuelle d'excrétion fécale du MAP. Une association significative a été trouvée entre la présence d'une forte charge bactérienne dans un échantillon de fumier individuel et la détection du MAP dans l'environnement.

Mots-clés : paratuberculose, maladie de Johne, vache laitière, facteurs de risque, transmission, culture bactériologique, environnement.

Abstract

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) causes Johne's disease, a chronic and incurable enteric disease of ruminants that has a worldwide distribution. Many countries have implemented control programs to prevent transmission between and within herds. For these to be efficient, knowledge of the risk factors involved in transmission is essential. Efficient and cost effective diagnostic tests are also necessary to detect presence of MAP. The objective of the first study was to systematically review the scientific literature concerning risk factors associated with MAP transmission to dairy calves. Presence of a significant association between risk factors concerning neonatal environment, colostrum, milk, housing of calves and contact of calves with adult cow feces and MAP transmission were recorded from 23 articles. The contact of calves with adult cow feces appeared to be the most important risk factor in MAP transmission. The 5 categories of risk factors are linked one to each other. The objective of the second study was to evaluate the relation between the number of positive samples for MAP in the environment and the prevalence of individual fecal shedding in Québec tie-stall dairy herds. The number of positive cultures of environmental samples was associated with the prevalence of individual fecal shedding of MAP. A significant association was found between presence of a heavy bacterial load in an individual fecal sample and environmental detection of MAP.

Keywords : paratuberculosis, Johne's disease, dairy cattle, risk factors, transmission, bacteriologic culture, environment.

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux	v
Liste des figures	vii
Liste des sigles et abréviations.....	viii
Dédicace.....	x
Remerciements	xi
Introduction	1
Chapitre 1 : Recension des écrits	3
1.1 Historique	3
1.2 Importance de la maladie	3
1.2.1 Économie de l'industrie laitière	4
1.2.2 Santé publique	5
1.3 Situation au Québec.....	6
1.3.1 Prévalence.....	6
1.3.2 Programme québécois	8
1.4 Pathogénie	9
1.4.1 Étiologie	9
1.4.2 Pathophysiologie	10
1.4.3 Stades de l'infection.....	11
1.5 Susceptibilité d'âge à l'infection par le MAP	14
1.6 Méthodes diagnostiques	15
1.6.1 Détection de la réponse immunologique de l'hôte (tests indirects)	18
1.6.2 Détection de l'agent (tests directs).....	20
1.6.2.1 Culture	20

1.6.2.2 PCR.....	23
1.6.3 Regroupement de fèces individuelles.....	24
1.6.4 Échantillons de l'environnement.....	25
1.6.5 Conservation des échantillons.....	30
1.7 Modes de transmission.....	30
1.7.1 Fèces.....	30
1.7.2 Colostrum, Lait.....	31
1.7.3 <i>In utero</i>	32
1.7.4 Transfert d'embryons.....	34
1.7.5 Semence.....	36
1.7.6 Environnement et Aérosols.....	37
1.7.7 Animaux sauvages.....	38
1.7.8 Autres ruminants domestiques.....	40
1.8 Revue systématique de la littérature et méta-analyse.....	40
Chapitre 2: Risk Factors Associated with Transmission of <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (MAP) to Calves within Dairy Herd: a Systematic Review.....	44
Chapitre 3: Evaluation of environmental sampling to predict <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> prevalence in Québec tied-stall dairy herds.....	77
Discussion générale.....	101
Conclusion.....	110
Bibliographie.....	111
Annexe 1: Graphiques du dénombrement des colonies de MAP.....	i
Annexe2: Web de causalité des facteurs de risque de transmission du MAP.....	xv

Liste des tableaux

Chapitre 1 : Recension des écrits

Tableau I : Séroprévalences du MAP estimées par un test ELISA dans des troupeaux de bovins laitiers de diverses provinces canadiennes	8
Tableau II : Stratégies diagnostiques recommandées pour la détection des infections à MAP chez les bovins laitiers en fonction de l'objectif visé par le test.....	17
Tableau III: Sensibilité et spécificité de 4 tests ELISA commerciaux utilisés pour la détection d'anticorps dirigés contre le MAP dans le sérum de bovins asymptomatiques.....	18
Tableau IV : Diverses classifications du niveau d'excrétion de MAP selon le nombre de colonies de MAP dénombrées sur milieu de culture solide (HEYM)	21
Tableau V : Étapes à suivre et interprétation des résultats lors de l'utilisation du BACTEC MGIT 960 pour la détection du MAP.....	22
Tableau VI : Caractéristiques de 5 études évaluant la recherche du MAP dans des échantillons de l'environnement	29

Chapitre 2: Risk Factors Associated with Transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) to Calves within Dairy Herd: a Systematic Review

Tableau 1 : Data extracted from the 23 articles included in the systematic review.....	56
Tableau 2 : Data extracted from the 23 articles for support to causal association and results of the study appraisal.....	59
Tableau 3 : Manuscripts that studied risk factors concerning neonatal environment (question 1): results from univariate and multivariate analyses	61
Tableau 4 : Manuscripts that studied risk factors concerning colostrum (question 2): results from univariate and multivariate analyses	63
Tableau 5 : Manuscripts that studied risk factors concerning milk (question 3): results from univariate and multivariate analyses.....	64
Tableau 6 : Manuscripts that studied risk factors concerning group-housing of calves (question 4), results from univariate and multivariate analyses	65

Tableau 7 : Manuscripts that studied risk factors concerning contact with adult cow feces (question 5):
results from univariate and multivariate analyses66

Chapitre 3: Evaluation of environmental samples to predict *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* prevalence in Québec tie-stall dairy herds

Tableau 1 : Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in individual and
environmental samples in Québec tie-stall dairy herds99

Liste des figures

Chapitre 1 : Recension des écrits

Figure 1 : Pyramide des évidences selon le type d'étude. Les études avec la plus grande certitude scientifique se trouvent au sommet de la pyramide et celles à la base de la pyramide ont le plus faible niveau de certitude. (Adapté de Holmes, 2007)43

Chapitre 3: Evaluation of environmental samples to predict *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* prevalence in Québec tie-stall dairy herds

Figure 1 : Time to detection in days (median, 5th and 95th percentile) of a positive individual fecal sample of MAP by the BD BACTEC™ MGIT™960 according to culture results on solid medium (4 tubes HEYM with mycobactin J)100

Liste des sigles et abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMVPQ : Association des médecins vétérinaires praticiens du Québec

BD : Becton Dickinson

CA : Calving area

CC : Commercial colostrum

UFC : Colony forming unit

CI : Confidence interval

CR : Count ratio

CS : Clinical signs

DC : Dam colostrum

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

FC : Fecal culture

FPLQ : Fédération des producteurs de lait du Québec

HEYM : Herrold's egg yolk medium

HR : Hazard ratio

IC : Intervalle de confiance

IETS : International Embryo Transfer Society

INF- γ : Interferon-gamma

JD : Johne's disease

LAM-ELISA : Lipoarabinomannan enzyme-immuno-assay

LÉAQ : Laboratoire d'épidémiosurveillance animale du Québec

MAP : *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

MAPAQ : Ministère de l'agriculture, pêche et alimentation du Québec

MC : Maternal colostrum

MeSH : Medical Subject Heading

MGIT : Mycobacteria growth indicator tube

OD : Optical density

OR : Odds ratio

PC : Pasteurized colostrum

PCR : Polymerase Chain Reaction

PP : Posterior probability

SCC : Somatic cell count

SD : Standard deviation

SE : Standard error

UFC : Unité formant colonie

\$US : Dollars américains

USDA : United States Department of Agriculture

À toi

Remerciements

Je tiens à remercier pour leur précieuse aide et leur confiance mon directeur, Dr Gilles Fecteau et ma co-directrice, Dre Julie Paré.

Je tiens aussi à remercier tous les membres de l'équipe de recherche sur la paratuberculose de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal pour leur précieuse collaboration : Dr Sébastien Buczinski, Dre Geneviève Côté, Dre Julie-Hélène Fairbrother, Dre Olivia Labrecque, Dre Saray Rangel, Dr Jean-Philippe Roy, Dr Vincent Wellemans.

Je tiens également à remercier Dr Daniel Jean et Dr Jean-Philippe Roy d'avoir accepté de siéger sur mon comité conseil. Dre Julie Arsenault d'avoir accepté la présidence du jury et Dr John Fairbrother d'avoir accepté d'être membre du jury.

Finalement, je remercie les organismes subventionnaires, sans lesquels ces recherches n'auraient pas été possibles : le Programme de Soutien à l'Innovation en Agroalimentaire, le Ministère de l'Agriculture, Pêcheries et Alimentation du Québec et le Fonds Pfizer de recherche clinique.

Introduction

La paratuberculose est une maladie entérique chronique et incurable qui affecte les ruminants mondialement. La bactérie en cause est *Mycobacterium avium* ssp *paratuberculosis* (MAP). Les bovins s'infectent généralement en bas âge au moment où ils sont le plus susceptibles à l'infection (Whittington and Windsor, 2009). Cette maladie ayant une longue période d'incubation (Whitlock and Buergelt, 1996), des mois, voire des années peuvent s'écouler avant que ne survienne l'excrétion de la bactérie dans les fèces à un seuil détectable (Benedictus et al., 2008). Les animaux asymptomatiques qui excrètent le MAP dans leurs fèces représentent une source importante de contamination pour le troupeau (Sweeney, 2011). Seuls quelques individus développeront des signes cliniques associés à l'infection par le MAP, car la majorité seront réformés avant l'apparition de la maladie (Whitlock and Buergelt, 1996). La maladie de Johne désigne cette entité clinique qui est caractérisée entre autres, par une perte de poids sévère et de la diarrhée profuse, malgré un appétit normal.

Cette maladie a une importance majeure pour l'industrie laitière, non seulement en raison des pertes économiques qu'elle entraîne (Tiwari et al., 2008), mais aussi en raison du risque qu'elle pourrait poser pour la santé humaine. Le MAP pourrait être associé à la maladie de Crohn chez l'humain. Son caractère zoonotique n'est pas prouvé à ce jour, mais il ne peut toutefois être ignoré (Waddell et al., 2008).

Au cours des dernières années, les efforts de recherche se sont intensifiés à l'échelle mondiale afin de mieux comprendre l'épidémiologie de cette maladie pour mieux la contrôler. Les méthodes diagnostiques se sont aussi raffinées avec le temps, devenant entre autres plus

sensibles (Collins et al., 2006). De nouvelles stratégies diagnostiques comme la culture d'échantillons de l'environnement ont été examinées (Raizman et al., 2004; Berghaus et al., 2006; Lombard et al., 2006).

Le Québec n'échappe pas à la problématique que pose cette maladie. En 2002, une enquête de prévalence avait révélé que 41,7% des troupeaux laitiers avaient au moins une vache séropositive pour le MAP (Côté, 2003). En 2007, le programme volontaire de prévention et de contrôle de la paratuberculose au Québec était mis en place. Les recherches effectuées par le groupe de recherche sur la paratuberculose de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal se concentrent sur l'étude des facteurs de risque de la maladie, l'implantation des mesures de contrôle et la mesure de leur efficacité, ainsi que sur l'évaluation des tests diagnostiques pour détecter la maladie au sein des troupeaux.

Ce mémoire de maîtrise a été réalisé afin de répondre à deux objectifs. Le premier objectif consiste à déterminer les facteurs de risques impliqués dans la transmission du MAP aux veaux laitiers et d'en quantifier leur importance. Pour ce faire, une revue systématique de la littérature a été réalisée. Le deuxième objectif consiste à évaluer l'utilisation de la culture d'échantillons de l'environnement afin de détecter la présence du MAP dans les troupeaux laitiers du Québec. Plus spécifiquement, il s'agissait de déterminer s'il existe une relation "dose effet" entre la quantité de MAP dans l'environnement et la prévalence de l'infection au sein du troupeau et de caractériser celle-ci.

Chapitre 1 : Recension des écrits

1.1 Historique

C'est en Allemagne, en 1895, que le premier cas de paratuberculose bovine a été décrit. Les docteurs Heinrich Albert Johne et Langdon Frothingham notèrent une muqueuse intestinale épaissie et une hypertrophie des nœuds lymphatiques mésentériques chez une vache qui avait une mauvaise production laitière et un état de chair insatisfaisant (Johne and Frothingham, 1895). La cause suspectée était alors la tuberculose intestinale due à *Mycobacterium bovis*, mais la vache était négative au test de tuberculine et les bactéries acido-alcool-résistantes observées dans les tissus intestinaux n'ont pas causé la tuberculose chez des cobayes. La condition fut alors nommée "entérite pseudotuberculeuse" (Johne and Frothingham, 1895). En 1902, aux Pays-Bas, plusieurs cas d'inflammation gastro-intestinale bovine ont été rapportés à l'abattoir par le Dr Herman Markus (Markus, 1904). En 1908 le premier cas en Amérique du Nord fût reconnu à l'Université de Pennsylvanie par le Dr Pearson (Pearson, 1908). En 1913, le Dr Meyer émit la mise en garde suivante : *"The economic loss will become one of a very serious nature if necessary steps for the control of this disease, which has been brought to this country by importation, are not taken"* (Meyer, 1913). Un siècle plus tard, cette maladie est répandue à l'échelle mondiale et cause des pertes économiques importantes.

1.2 Importance de la maladie

L'intérêt marqué pour cette maladie et les efforts de recherche à l'échelle internationale visent 2 aspects majeurs : l'économie et la santé publique de l'industrie laitière.

1.2.1 Économie de l'industrie laitière

La paratuberculose entraîne des pertes économiques non négligeables au sein des troupeaux laitiers. L'enquête nationale sur l'industrie laitière aux États-Unis réalisée en 1996 (*USDA National Animal Health Monitoring System's (NAHMS) 1996 national dairy study*), a permis d'estimer les pertes annuelles engendrées par la paratuberculose à 200-250 millions \$US (Ott et al., 1999). Plus précisément, les pertes économiques étaient de 97 \$US par vache dans les troupeaux positifs pour le MAP et de 245 \$US par vache dans les troupeaux rapportant au moins 10% des vaches réformées ayant des signes cliniques de la maladie. Une étude pancanadienne a estimé les pertes annuelles moyennes à 2992 \$CAN (IC 95% : 143-9741\$) pour un troupeau laitier de 61 vaches avec une séroprévalence de 12.7% (Tiwari et al., 2008). En comparaison, les pertes annuelles estimées pour un troupeau de 50 vaches laitières dans les provinces maritimes étaient de 2 472 \$ pour le MAP, 2 421 \$ pour la diarrhée virale bovine, 2 304 \$ pour la néosporose et de 806 \$ pour le virus de la leucose (Chi et al., 2002).

Ces pertes économiques sont surtout engendrées par les infections subcliniques. La productivité des vaches ayant la paratuberculose peut être affectée de différentes façons : diminution de la production laitière (Hendrick et al., 2005b; Lombard et al., 2005; Beaudeau et al., 2007; Raizman et al., 2009; Ansari-Lari et al., 2012), réforme précoce (Hendrick et al., 2005b; Lombard et al., 2005; Raizman et al., 2009; Smith et al., 2010), moindres performances en reproduction (Johnson-Ifearulundu et al., 2000; Marce et al., 2009; Ansari-Lari et al., 2012) et diminution du rendement de la carcasse (Johnson-Ifearulundu et al., 1999; Kudahl and Nielsen, 2009; Raizman et al., 2009).

1.2.2 Santé publique

Un lien causal entre MAP et la maladie de Crohn chez l'humain est suspecté, mais n'a pas été établi à ce jour. Plusieurs études rapportent toutefois une association entre la présence de MAP dans le sang et les intestins des patients atteints de la maladie de Crohn (Waddell et al., 2008). De plus, MAP a été retrouvé dans différents aliments, dont quelques exemples sont illustrés ci-dessous. Une clarification doit être faite quant au test diagnostique utilisé dans ces études pour mettre en évidence le MAP. La culture permet de détecter le MAP vivant tandis que la PCR ne détecte que l'ADN du MAP (voir détail : section 1.6.2 Détection de l'agent (tests directs), page 18).

MAP a été isolé de lait pasteurisé vendu chez les détaillants aux États-Unis (2,8%, IC 95% : 1,6-4,1%; 20/702) (Ellingson et al., 2005), au Royaume-Uni (1,8%, IC 95% : 0,7-3,0%; 10/544) (Grant et al., 2002) et en République tchèque (1,6%, IC 95% : 0-3,2%; 4/244) (Ayele et al., 2005). Au Canada, 0% (0/244) et 15,5% (IC 95% : 12,8-18,2%; 110/710) des échantillons pasteurisés étaient positifs pour le MAP par culture et PCR respectivement (Gao et al., 2002). Ainsi, MAP viable n'a pas été isolé du lait pasteurisé au Canada. Soit la technique de culture n'était pas assez sensible pour détecter une faible quantité de MAP, soit la PCR n'était pas spécifique pour le MAP, soit le processus de pasteurisation a été efficace afin d'inactiver le MAP.

De l'ADN de MAP a été retrouvé sur des carcasses de bovins provenant de 3 abattoirs canadiens (Meadus et al., 2008). La culture a aussi révélé la présence de MAP vivant dans le muscle du diaphragme (13%; 6/47) (Alonso-Hearn et al., 2009) et les muscles de la joue (0,4%; 2/501) (Okura et al., 2011). MAP peut donc se retrouver dans la viande de consommation par dissémination de l'infection à plusieurs tissus autres que les tissus du

système digestif, mais aussi par contamination de la carcasse par les fèces à l'abattoir. Une revue systématique de la littérature sur la contamination des aliments par le MAP conclut que ce risque de contamination des produits laitiers et de la viande ne peut être ignoré (Eltholth et al., 2009).

1.3 Situation au Québec

1.3.1 Prévalence

En 2002, une enquête de prévalence de la paratuberculose a été réalisée par le Ministère de l'Agriculture, Pêcherie et Alimentation du Québec (MAPAQ) en collaboration avec la Fédération des producteurs de lait du Québec (FPLQ). Au total, 2 591 vaches laitières, provenant de 108 fermes, ont été examinées pour la présence d'anticorps contre le MAP en utilisant un test ELISA (Herdcheck®*M.pt*, Idexx Laboratories, Westbrook, Maine, USA). Dans 41,7% (IC 95% : 32,5-50,9 %) des troupeaux, au moins une vache séropositive a été détectée et dans 12,1% (IC 95% : 6,0-18,2%) des troupeaux, au moins deux vaches étaient séropositives. Au niveau individuel, 2,4% (IC 95% : 1,8-3,1%) des vaches laitières étaient séropositives (Côté, Mars 2003). Cette enquête a aussi permis d'estimer qu'environ 70% des producteurs laitiers n'avaient pas de connaissances sur la paratuberculose. Plus précisément, 29,6% des répondants n'avaient jamais entendu parler de cette maladie et 41,5% se souvenaient avoir entendu le nom de cette maladie, sans plus (Côté, Mars 2003). La séroprévalence du MAP au Québec est comparable à celle des provinces maritimes (VanLeeuwen et al., 2001) et de la Saskatchewan (VanLeeuwen et al., 2005). L'Alberta (Scott et al., 2006) et le Manitoba (VanLeeuwen et al., 2006) semblent avoir une prévalence plus élevée, tant au niveau individuel que du troupeau (tableau I). La prévalence individuelle du

MAP a aussi été estimée dans les provinces maritimes à l'aide de tests diagnostiques plus sensibles que la sérologie. Des cultures des nœuds lymphatiques mésentériques et de l'iléon prélevés aléatoirement sur 832 bovins laitiers à l'abattoir ont révélé une prévalence de MAP de 15,1% (IC 95% : 12,7-17,5%). De ces 125 bovins avec une culture positive pour le MAP, seulement 6 animaux présentaient également des lésions histopathologiques (McKenna et al., 2004).

Aux États-Unis, lors de la dernière enquête nationale (*USDA National Animal Health Monitoring System's (NAHMS) 2007 national dairy study*) réalisée sur les troupeaux laitiers en 2007, MAP a été isolé de l'environnement de 68,1% des troupeaux testés. En 1996, cette enquête nationale avait révélé une prévalence de troupeaux infectés par le MAP à 21,6%. Toutefois, comme le test utilisé lors de l'enquête de 1996 était la sérologie et que les cultures de l'environnement ont été utilisées dans l'enquête de 2007, les prévalences obtenues ne peuvent pas être comparées et on ne peut donc affirmer avec certitude qu'il y a eu une augmentation du nombre de troupeaux positifs pour le MAP dans le temps.

En Europe, les prévalences du MAP estimées par différents tests diagnostiques (sérologie; culture fécale ou de tissus; PCR sur fèces, lait ou tissus) entre 1990 et 2007 chez les animaux de la ferme ont été revues. La prévalence individuelle du MAP chez les bovins en Europe a été estimée à 20% et dans plusieurs pays européens, cette prévalence était d'au moins 3 à 5%. Plus de 50% des troupeaux seraient positifs pour le MAP (Nielsen and Toft, 2009). Les auteurs déplorent toutefois le manque de validité de plusieurs études de prévalence réalisées en Europe (échantillonnage non aléatoire, sensibilité des tests diagnostiques et période d'échantillonnage non rapportées).

Tableau I Séroprévalences du MAP estimées par un test ELISA dans des troupeaux de bovins laitiers de diverses provinces canadiennes.

Provinces	Références	Nombre troupeaux	Nombre vaches	Vaches Séro+ (%)	Troupeaux (≥ 1 Séro+) (%)	Troupeaux (≥ 2 Séro+) (%)
Québec	Côté, 2003	108	2591	2,4	41,7	12,1
Alberta	Scott, Can Vet J 2006	77	2819	9,1	70,2	58,8
Manitoba	vanLeeuwen, Can Vet J, 2006	40	1204	4,5	68,4	43,1
Saskatchewan	vanLeeuwen, Can Vet J, 2005	51	1530	2,7	43,3	24,3
Nouvelle-Écosse	vanLeeuwen, Can Vet J, 2001	30	~900	3,3	53,3	16,7
Nouveau-Brunswick	vanLeeuwen, Can Vet J, 2001	30	~900	2,9	43,3	16,7
Île-du-Prince-Édouard	vanLeeuwen, Can Vet J, 2001	30	~900	1,3	33,3	16,7

Séro+ = séropositives

≥ 1 Séro+ = une vache ou plus séropositives

≥ 2 Séro+ = deux vaches ou plus séropositives

1.3.2 Programme québécois

Le programme volontaire de prévention et de contrôle de la paratuberculose au Québec est entré en vigueur le 15 novembre 2007. Tous les troupeaux laitiers ou de boucherie peuvent y participer. Ce programme québécois vise 4 objectifs :

- 1) L'éducation des clients.
- 2) La prévention par le contrôle des facteurs de risque de transmission du MAP.
- 3) L'identification des troupeaux infectés par le MAP
- 4) Le suivi de l'évolution dans le temps.

L'identification des animaux positifs au MAP sur une base individuelle ne fait pas partie des objectifs du programme.

Durant la première année d'adhésion, un médecin-vétérinaire praticien visite l'élevage afin d'évaluer les bonnes pratiques de régie à l'aide d'un questionnaire et d'émettre des recommandations au producteur. Lors de la deuxième visite (2^e année), des échantillons de l'environnement sont prélevés de 3 sites différents (en duplicata) afin de déterminer la présence ou non du MAP dans l'élevage. L'échantillonnage de l'environnement est répété sur une base annuelle ainsi que le suivi de la mise en place des recommandations. Le producteur peut décider de faire tester ses animaux individuellement par la culture fécale afin d'identifier ceux excréant le MAP en vue de les réformer. Afin d'éviter le mouvement des animaux positifs d'un élevage à un autre, les producteurs s'engagent à ne pas vendre d'animaux positifs. Depuis 2010, un examen du lait individuel par ELISA, offert par Valacta, peut être utilisé pour détecter la présence du MAP au sein du troupeau et aussi pour identifier les animaux positifs. Ce test ELISA a une sensibilité de 61% et une spécificité de 95% lorsque comparé avec la culture fécale (Hendrick et al., 2005a).

1.4 Pathogénie

1.4.1 Étiologie

MAP se comporte comme un parasite obligatoire, c'est-à-dire qu'il ne peut que se répliquer au sein des cellules animales (Thorel et al., 1990). MAP doit toutefois être en mesure de survivre en dehors de son hôte le temps qu'il arrive à en infecter un autre. La paroi cellulaire du MAP qui est épaisse et composée à 60% de lipides, lui confère la protection nécessaire à sa survie dans l'environnement (Rowe and Grant, 2006)

Il existe 2 groupes de souches de MAP qui diffèrent au niveau de leurs caractéristiques de croissance et de leurs hôtes de prédilection : les souches S (*Sheep*) et les souches C (*Cattle*).

Le nom de ces groupes vient de l'hôte où les souches avaient été isolées pour la première fois, mais comme les souches ne sont pas spécifiques d'hôte et pour éviter la confusion on les désigne également les souches de Type I (souches S) ou Type II (souches C) (Stevenson et al., 2002). Depuis les années 1990, la distinction génétique de ces 2 groupes de souches est possible (Collins et al., 1990).

.

1.4.2 Pathophysiologie

Après ingestion du MAP par la voie orale, la porte d'entrée principale vers l'organisme est l'iléon (Sweeney et al., 2006a), où les cellules M résidant dans les plaques de Peyer permettent la translocation du MAP vers la sous-muqueuse du petit intestin (Momotani et al., 1988). Le MAP est alors phagocyté par les macrophages à l'intérieur desquels il a la capacité de survivre et de se multiplier (Hostetter et al., 2003). Les macrophages infectés empruntent les vaisseaux lymphatiques et l'infection est ainsi disséminée aux nœuds lymphatiques mésentériques.

La réponse immunitaire dirigée contre le MAP est d'abord à médiation cellulaire. La transition vers l'immunité humorale avec la production d'anticorps survient à un stade avancé de la maladie (Chiodini, 1996). Les lymphocytes T sont les premiers à être activés, plus précisément les lymphocytes T auxiliaires (Stabel, 2000a). Ces derniers produisent diverses cytokines dont la plus importante pour la protection contre l'infection par le MAP est l'interféron gamma (INF- γ) (Khalifeh and Stabel, 2004). Les monocytes sanguins sont recrutés au site d'infection grâce à l'INF- γ , où ils deviennent des macrophages activés pour aider à contrôler la dissémination du MAP (Zurbrick and Czuprynski, 1987; Delvig et al., 2002). À mesure que les macrophages migrent au site d'infection, l'inflammation des tissus

devient de plus en plus importante. De petits granulomes sont d'abord formés et progressent en une entérite granulomateuse sévère formée de macrophages contenant une grande quantité de MAP (Gonzalez et al., 2005). Cette inflammation granulomateuse permet à l'organisme de restreindre la dissémination du MAP, sans toutefois l'éliminer, et ce processus peut durer des années sans apparition de signes cliniques (Sweeney, 2011). Ainsi, la réponse de l'hôte afin de contrôler l'infection par le MAP est responsable du développement des lésions inflammatoires granulomateuses qui entraînent les signes cliniques de la maladie de Johne.

Pour des raisons qui ne sont pas complètement élucidées à ce jour, la production d'INF- γ est finalement supprimée (Sweeney et al., 1998; Coussens et al., 2004). Le recrutement des cellules inflammatoires au site d'infection est alors ralenti et les lymphocytes B sont stimulés à produire des anticorps (Stabel, 2000b). Le changement de l'immunité cellulaire à l'immunité humorale coïncide avec la progression de la maladie d'un stade asymptomatique où les lésions granulomateuses se développent à un stade clinique où la production d'anticorps prédomine (Stabel, 2000b). Ces anticorps sont toutefois inefficaces à contrôler la dissémination de l'infection (Tessema et al., 2001).

1.4.3 Stades de l'infection

La durée de chacun des stades de l'infection est variable et dépend probablement de plusieurs facteurs dont : l'âge de l'animal et la quantité de MAP ingéré lors de l'exposition initiale, la fréquence de réexposition au MAP dans le temps, les facteurs génétiques de l'hôte et de la souche de MAP, les effets de la production, les conditions environnementales et, nutritionnelles (Fecteau and Whitlock, 2010).

Stade 1 : Phase silencieuse ou éclipse

À ce premier stade de l'infection, les animaux infectés ne présentent pas de signes cliniques et l'infection ne semble pas avoir d'effet appréciable sur leur croissance, leur gain de poids et leur production. Ils sont cliniquement identiques aux animaux non infectés. Ce stade, durant lequel l'hôte semble contrôler l'infection et où MAP prolifère tranquillement, peut durer de 2 ans à plusieurs années (Whitlock and Buergelt, 1996). L'excrétion du MAP dans les fèces de bovins âgés de moins de 2 ans est possible et serait même plus fréquente dans les troupeaux à prévalence élevée. Une analyse de survie, appliquée sur les résultats de culture fécale de 18,979 vaches Holstein, a démontré que 3,2% des vaches âgées de moins de 2 ans excrétaient le MAP dans leurs fèces dans les troupeaux avec une prévalence d'infection inférieure à 5% et que dans les troupeaux ayant une prévalence entre 10 et 20% c'était 15,6% qui l'excrétaient (Weber et al., 2010). Une autre étude a démontré qu'aucune vache âgée de moins de 11 mois avait une culture fécale positive pour le MAP (Kalis et al., 1999). Des tests visant à détecter l'immunité cellulaire peuvent être utilisés pour détecter ce stade silencieux de la maladie. Toutefois, ces tests, comme le test cutané à la Johnine ou la mesure de l'IFN- γ , sont souvent peu spécifiques, car il existe beaucoup d'antigènes communs entre le MAP et les autres mycobactéries de l'environnement (Kalis et al., 2003). Il existe aussi un test pour mesurer la prolifération des lymphocytes *in vitro*, qui n'a jamais été commercialisé, probablement en raison du grand nombre de faux positifs et de la réponse très variable chez les animaux fortement infectés (de Lisle and Duncan, 1981). L'excrétion du MAP dans les fèces et les anticorps sériques sont habituellement indétectables à ce stade. L'infection peut être détectée en démontrant la présence du MAP dans les tissus, comme l'iléon ou les nœuds lymphatiques mésentériques, par culture ou par PCR (Sweeney, 2011). Il n'existe donc pas de test diagnostique efficace et abordable qui peut détecter l'infection à ce stade sur l'animal vivant.

Stade 2 : Infection subclinique (porteurs asymptomatiques)

Les animaux à ce stade subclinique ne présentent pas les signes cliniques classiques de la maladie de Johne (diarrhée, amaigrissement). La plupart excrètent le MAP dans leurs fèces et deviennent une source d'infection pour les autres animaux sur la ferme en entraînant la contamination de l'environnement (Whitlock and Buergelt, 1996). La quantité de MAP excrétée peut être assez faible pour ne pas être détectée par la culture (de Lisle et al., 1980). Ainsi, la culture fécale arrivera à détecter moins de 25% des animaux infectés (Whitlock and Buergelt, 1996). L'excrétion du MAP dans les fèces survient généralement avant que les anticorps sériques ne soient détectables (Lepper et al., 1989; Sweeney et al., 2006b). Les animaux à ce stade seront souvent réformés du troupeau avant l'apparition de la maladie clinique (Smith et al., 2010) pour des raisons non attribuées à l'infection par le MAP par l'éleveur, comme une diminution de la production laitière (Beaudeau et al., 2007) ou de moins bonnes performances reproductrices (Ansari-Lari et al., 2012).

Stade 3 : Maladie clinique (Maladie de Johne)

L'apparition des signes cliniques de la maladie de Johne survient après une longue période d'incubation de 2 à 10 ans (Whitlock and Buergelt, 1996). L'inflammation granulomateuse de la muqueuse de l'iléon, mais aussi de d'autres segments des petit et gros intestins, nuit à l'absorption des nutriments et conséquemment, une perte de poids s'en suit, malgré un appétit normal. Cela à aussi pour conséquence d'entraîner une diarrhée de malabsorption qui peut être intermittente durant plusieurs semaines avant d'être persistante (Whitlock and Buergelt, 1996). Cette diarrhée très aqueuse, mucoïde mais non sanguinolente, n'entraîne pas de ténesme ou de déshydratation, quoique la consommation d'eau de la vache soit souvent augmentée pour compenser cette perte d'eau (Sweeney, 2011). La plupart des

vaches à ce stade seront positives pour le MAP à la culture fécale (>90%) (Whitlock et al., 2000) et auront des anticorps sériques détectables (88% ELISA positives) (Dargatz et al., 2001).

Stade 4 : Maladie clinique avancée

À ce stade terminal de la maladie, les animaux atteints deviennent faibles, léthargiques et émaciés. La diarrhée est alors profuse et persistante. L'hypoprotéinémie qui en résulte peut entraîner de l'œdème du fanon et intermandibulaire ("bottle jaw"). Les animaux détériorent très rapidement à ce stade et les carcasses sont condamnées à l'abattoir (Whitlock and Buergelt, 1996).

1.5 Susceptibilité d'âge à l'infection par le MAP

Une revue systématique de la littérature avec méta-analyse concernant la susceptibilité d'âge à l'infection par le MAP a été publiée en 2010 (Windsor and Whittington, 2010). Cette méta-analyse a permis de regrouper les résultats de 140 bovins inclus dans 11 études expérimentales publiées entre 1938 et 2006. Ces études originales sont à l'origine des hypothèses suivantes :

- 1) La majorité des animaux s'infectent avec le MAP en jeune âge.
- 2) En vieillissant, les animaux deviennent moins susceptibles à l'infection par le MAP.
- 3) Les animaux adultes sont relativement résistants à l'infection par le MAP.

Le but de cette étude était de fournir des estimations du risque de développer la maladie de Johne suite à l'exposition au MAP à différents âges, et ce par voie orale, intraveineuse ou par contact avec un environnement contaminé. Le délai entre l'exposition au MAP et le diagnostic des lésions était variable entre les études, pouvant être aussi court que 150 jours et aussi long que 4,5 ans. Les veaux de moins de 6 mois d'âge ont développé des lésions compatibles avec

la maladie de Johne dans 73,7 % (IC 95% : 60,3-84,4%) des cas suite à l'exposition au MAP. Ces lésions ont également été détectées chez 50% (IC95% : 29,9-70,0%) des bovins exposés entre 6 et 12 mois d'âge et chez 19,3% (IC 95% : 10-31,9%) des bovins exposés à plus de 12 mois. Ces estimations confirment les hypothèses mentionnées ci-dessus. Les veaux de moins de 6 mois sont donc plus susceptibles à l'infection par le MAP, mais l'infection conduisant à des lésions est aussi possible chez les bovins infectés à plus de 12 mois d'âge.

1.6 Méthodes diagnostiques

Le diagnostic des infections asymptomatiques est difficile puisque la croissance du MAP *in vitro* est fastidieuse et longue, le MAP est excrété de façon intermittente dans les fèces surtout durant la phase asymptomatique et les tests diagnostiques disponibles à ce jour sont peu sensibles pour détecter les animaux en début de la maladie (infectés, mais asymptomatiques). Par exemple, la culture fécale a une sensibilité de plus de 90% pour détecter un animal présentant des signes cliniques de la maladie de Johne (Whitlock et al., 2000), tandis que la sensibilité de ce même test diagnostique peut diminuer à 45% pour le diagnostic d'un animal asymptomatique (Sockett et al., 1992).

Il existe 2 catégories de tests utilisés pour le diagnostic de la paratuberculose. La réponse immunologique de l'hôte peut être détectée (tests indirects) par la recherche d'anticorps dirigés contre le MAP, dans le sérum ou le lait. Certains marqueurs de l'inflammation comme l'IFN- γ (Jungersen et al., 2002; Kalis et al., 2003) et l'ostéopontine (Karcher et al., 2008a; Karcher et al., 2008b) ont aussi été étudiés comme moyen diagnostique. Les tests directs, comme la culture et la PCR, détectent directement la présence du MAP dans les fèces, dans les tissus ou dans des échantillons de l'environnement.

L'identification des lésions histopathologiques caractéristiques de la maladie de Johne serait un troisième moyen de poser un diagnostic. Il est important de noter qu'aucun de ces tests ne permet de poser un diagnostic de paratuberculose lors du stade 1 de l'infection aussi appelée phase silencieuse ou éclipse.

Des méthodes d'échantillonnage à moindres coûts pour détecter la présence de MAP au sein des troupeaux ont été développées, telles que le regroupement de fèces individuelles ou le prélèvement d'échantillons de l'environnement. Le choix du meilleur test diagnostique se fera en fonction de l'objectif visé par le test ou de la situation à évaluer et devra tenir compte du type de bovins (commercial ou de haute valeur génétique), de la présence ou non de signes cliniques de la maladie, le but du test (classification, surveillance, contrôle, éradication) (tableau II).

Tableau II Stratégies diagnostiques recommandées pour la détection des infections à MAP chez les bovins laitiers en fonction de l'objectif visé par le test (adapté de (Collins et al., 2006) et (Collins, 2011)).

Objectif visé par le test	Stratégies diagnostiques	
	Animaux commerciaux	Animaux de haute valeur génétique
Classification du troupeau (infecté ou non-infecté)	Culture sur échantillons de l'environnement	Culture sur échantillons de l'environnement
Surveillance	Culture sur échantillons de l'environnement ou fèces groupées	Non recommandé*
Éradication	Culture ou PCR sur fèces groupées	Culture ou PCR sur fèces individuelles
Programme de contrôle dans les troupeaux infectés par le MAP (> 5% tests positifs)	ELISA pour détection des anticorps	Culture ou PCR sur fèces individuelles
Confirmation d'un diagnostic clinique dans les troupeaux sans confirmation préalable de l'infection par MAP	Nécropsie, culture ou PCR sur les fèces de l'individu affecté	Culture ou PCR et histopathologie sur biopsie ou tissus de nécropsie
Confirmation d'un diagnostic clinique dans les troupeaux où l'infection par MAP a été confirmée	ELISA, culture ou PCR sur les fèces	Culture ou PCR et histopathologie sur biopsie ou tissus de nécropsie

*Les troupeaux avec des animaux de haute valeur génétique devraient être classifiés comme non infectés ou du moins travailler à atteindre ce but.

1.6.1 Détection de la réponse immunologique de l'hôte (tests indirects)

L'ELISA, la fixation du complément et l'immunodiffusion sur gel d'agar sont des tests qui permettent la détection d'anticorps dirigés contre le MAP. La fixation du complément et l'immunodiffusion sur gel d'agar ont une sensibilité moindre que l'ELISA pour détecter les anticorps contre le MAP (Sherman et al., 1990; Yokomizo et al., 1991). De plus, l'ELISA détecte 7 à 10 mois plus tôt les anticorps chez des bovins subcliniques que le test de fixation du complément (Yokomizo et al., 1991). C'est pourquoi l'ELISA est le test immunologique le plus fréquemment utilisé à ce jour et que diverses trousse commerciales ont été développées. Les estimations de sensibilité et spécificité de 4 tests ELISA détectant les anticorps dans le sérum sont présentés dans le tableau III (Collins et al., 2005)

Tableau III Sensibilité et spécificité de 4 tests ELISA commerciaux utilisés pour la détection d'anticorps dirigés contre le MAP dans le sérum de bovins asymptomatiques (Collins et al., 2005).

Nom et provenance du test	Sensibilité (%) ^a	Spécificité (%)
HerdCheck MAP ELISA; IDEXX Laboratories, Westbrook, ME	28,92 ¹	95,26 ²
ParaCheck; CSL/Biocor, Omaha, NE	28,43 ¹	99,72 ¹
SERELISA ParaTB; Synbiotic Corp., San Diego, CA	44,52 ²	84,91 ³
ELISA Paratuberculosis; Institut Pourquier, Montpellier, France	27,95 ¹	100 ¹

^a En comparaison à la culture fécale.

^{1, 2 et 3} Des numéros différents dans une même colonne indiquent des valeurs significativement différentes ($P < 0.05$)

La sensibilité et la spécificité de l'ELISA comparativement à la culture fécale sont moindres (Dargatz et al., 2001; Sweeney et al., 1995). De 651 vaches testées par les 2 tests, seulement 25% des vaches avec une culture de fèces positive pour le MAP avaient également un test ELISA positif et 6% des vaches avec une culture fécale négative avaient un test ELISA positif (Stabel et al., 2002). La sensibilité du test ELISA est plus élevée pour détecter un cas clinique (87%) que pour détecter un cas subclinique (15%) (Sweeney et al., 1995). La sensibilité de l'ELISA est également influencée par le niveau d'excrétion du MAP dans les fèces. Pour un animal avec une forte excrétion de MAP dans les fèces (>70 colonies par tube) la sensibilité de l'ELISA est de 75% tandis qu'elle sera seulement de 15% pour un animal avec une faible excrétion (<10 colonies dans les 4 tubes) (Sweeney et al., 1995). À mesure que les troupeaux sont testés et que les animaux forts excréteurs sont retirés, la sensibilité du test ELISA sera diminuée, car plus d'animaux faibles excréteurs seront testés (Whitlock et al., 2000).

L'ELISA peut aussi être utilisée pour détecter la présence d'anticorps dans le lait. La sensibilité et la spécificité du Pourquier ELISA dans le lait ont été respectivement évaluées à 87% et 99,8% en comparaison avec le test réalisé sur le sérum (van Weering et al., 2007).

1.6.2 Détection de l'agent (tests directs)

1.6.2.1 Culture

La culture du MAP est un long processus qui implique 4 étapes importantes. Premièrement, les échantillons doivent subir une décontamination afin de réduire le nombre des autres bactéries et fungi. Deuxièmement, l'incubation doit être assez longue pour permettre la croissance du MAP et être réalisée sur des milieux de croissance contenant des agents antimicrobiens pour supprimer la croissance de contaminants potentiels qui n'auraient pas été éliminés lors de la décontamination. Troisièmement, les colonies de MAP doivent être visualisées sur milieu solide et pour les milieux liquides, un signal indiquant la croissance doit être émis. Finalement, l'identification finale du MAP doit être confirmée (Whittington, 2010).

Les milieux de culture utilisés pour la croissance du MAP peuvent être solides ou liquides. Deux milieux de culture solide sont utilisés : le *Lowenstein Jensen medium* dans les pays européens (Jorgensen, 1982) et le *Herrold's egg yolk medium* (HEYM) ailleurs dans le monde. Quatre tubes HEYM avec mycobactin J sontensemencés avec une suspension de fèces et un cinquième tube sans mycobactin J sert de contrôle négatif pour confirmer que les colonies sont bien du MAP. Ces milieux requièrent une incubation à 37°C, de 12 (Whitlock et al., 2000) à 16 semaines (Raizman et al., 2004) avant de rapporter un résultat négatif pour la croissance du MAP. Les milieux solides permettent le dénombrement des colonies de MAP et la classification des échantillons selon la quantité de MAP excrétée. Il n'existe pas de système de classification universel pour le dénombrement des colonies de MAP. Le tableau IV présente diverses définitions utilisées pour classifier les échantillons selon leur niveau d'excrétion de MAP (très faible, faible, moyen, élevé, très élevé).

Tableau IV Diverses classifications du niveau d'excrétion de MAP selon le nombre de colonies de MAP dénombrées sur milieu de culture solide (HEYM).

Références	Classification				
	Très faible	Faible	Moyen	Élevé	Très Élevé
(Pithua et al., 2009)	NA	1-10 ufc/tube	10-50 ufc/tube	51-100 ufc/tube	>100 ufc/tube
(Benedictus et al., 2008)	NA	1-100 ufc/g ^a	1-100 ufc/g ^a	>100 ufc/g ^a	NA
(van Schaik et al., 2007) ^b	NA	<10 ufc/g ^c	10-300 ufc/g ^c	>300 ufc/g ^c	NA
(Raizman et al., 2004)	NA	0.25-9 ufc/tube (moyenne)	10-49 ufc/tube (moyenne)	≥50 ufc/tube (moyenne)	NA
(Tavornpanich et al., 2004)	<1 ufc/tube (moyenne)	≥1-9.9 ufc/tube (moyenne)	10-49.9 ufc/tube (moyenne)	≥50 ufc/tube (moyenne)	NA
(Whitlock et al., 2000)	NA	< 10 ufc/tube	10-50 ufc/tube	>50 ufc/tube	NA
(Streeter et al., 1995)	NA	<3 000 ufc/g ^d	NA	>3000 ufc/g ^d	NA
(Sweeney et al., 1992a)	NA	<10 ufc/tube	10-70 ufc/tube	>70 ufc/tube	NA

NA : Non applicable ; ufc : unité formant colonie.

^a1 ufc par tube = 5.3 ufc/g de fèces ; ^bseulement 3 tubes avec mycobactin Jensemencés ;

^cCorrespondance du nombre de ufc par tube et du nombre de ufc par gramme non mentionnée

^dMoyenne du nombre de colonies par tube/0,0034 = ufc/g de fèces (0,34% = quantité de l'échantillon original de un gramme de fèces qui a été inoculée par tube)

Trois systèmes de culture en milieu liquide ont été développés pour la détection de *Mycobacterium tuberculosis* et sont utilisés pour la croissance du MAP. Le premier système mis au point permet la détection du carbone radioactif (C¹⁴) dans le dioxyde de carbone produit par la respiration des mycobactéries. Le système radiométrique BACTEC 460 utilise le milieu de culture BACTEC 12B (Damato and Collins, 1990). L'*ESP II liquid culture system* de Trek Diagnostics permet la détection du changement de pression causé par la consommation de gaz par les mycobactéries viables lors de leur croissance (Harris et al., 2005). Finalement, le BACTEC MGIT 960 permet la détection d'un signal fluorescent émis

par un indicateur dans le milieu de culture et produit suite à la consommation d'oxygène par la respiration des mycobactéries (Tortoli et al., 1999). Ce système est utilisé au Laboratoire d'épidémiosurveillance animale du Québec (LÉAQ) à Saint-Hyacinthe. Tous ces systèmes de cultures en milieu liquide détectent la présence de mycobactéries et requièrent la confirmation par PCR de la présence de MAP (Kim et al., 2004). L'avantage majeur de ces systèmes est qu'ils permettent d'obtenir un résultat de culture en seulement 42 à 56 jours (7 à 9 semaines). Le temps pour la détection d'un échantillon positif par le BACTEC 460 (Lambrecht et al., 1988) et par le BACTEC MGIT 960 (Shin et al., 2007) a été évalué afin d'estimer le niveau d'excrétion de MAP. Plus le temps de détection d'un échantillon positif est court, plus l'excrétion du MAP est élevée. Le tableau V présente la démarche à suivre lors de l'utilisation du BACTEC MGIT 960 pour la détection du MAP.

Tableau V Étapes à suivre et interprétation des résultats lors de l'utilisation du BACTEC MGIT 960 pour la détection du MAP

Étapes à suivre				
	Signal du BACTEC MGIT 960 suite à l'incubation	Coloration Acido-Alcoolo-Résistante	PCR	Interprétation de la culture pour le MAP
Résultats	-	NE	NE	Négative
	+	-	NE	Contaminée
	+	+	-	Négative
	+	+	+	Positive

- : négatif; + : positif; NE : non évalué

1.6.2.2 PCR

La PCR permet de détecter une séquence du génome de l'ADN du MAP. La séquence IS900 unique au génome du MAP a été découverte en 1989 (Collins et al., 1989). Toutefois, des résultats faux-positifs ont été rapportés lorsque cette séquence était amplifiée, car certaines mycobactéries possèdent un fragment d'ADN très semblable au IS900 (Cousins et al., 1999). D'autres séquences spécifiques au génome du MAP ont été découvertes par la suite, comme le ISMAV2 (Shin et al., 2004), le ISMAP02 (Stabel and Bannantine, 2005) et le F57 (Sidoti et al., 2011). Suite à un signal positif, la PCR permet de confirmer la présence du MAP (Kim et al., 2004; Shin et al., 2004). La PCR peut également servir à détecter la présence du MAP directement dans les tissus (Munster et al., 2011).

Les premières tentatives d'extraction de l'ADN du MAP directement d'échantillons de fèces à des fins diagnostiques n'étaient pas aussi performantes que la culture bactériologique, mais avec le temps la technique s'est raffinée. En comparaison avec la culture fécale, la sensibilité rapportée était de 70,2% et la spécificité de 85,3% (Clark et al., 2008). Une variation de la spécificité était rapportée selon le nombre d'ufc de MAP par gramme de fèces : 81% si plus de 70 ufc/g et 45% si moins de 1 ufc/g (Stabel et al., 2004). Plus récemment, une nouvelle méthode d'extraction de l'ADN du MAP directement des fèces permet d'obtenir une sensibilité de 98,46% et une spécificité de 100%, lorsque comparée à la culture fécale et lorsqu'au moins 1,5 ufc de MAP est présente par tube de culture fécale (Zhang and Zhang, 2011). L'exactitude de la PCR directement sur les fèces (0,90) se compare maintenant à l'exactitude de la culture en milieu solide (0,91) ou liquide (0,93) (Alinovi et al., 2009a). La

PCR a aussi été validée pour être utilisée directement sur les échantillons de l'environnement (Cook and Britt, 2007; Aly et al., 2009).

La PCR quantitative en temps réel permet de mesurer la quantité de MAP présente dans l'échantillon analysé (Kim et al., 2002). Cette technique a été validée directement sur les fèces (Schonenbrucher et al., 2008) et sur des échantillons de l'environnement (Aly et al., 2010).

1.6.3 Regroupement de fèces individuelles

L'avantage de faire la recherche du MAP sur des fèces individuelles regroupées est de permettre d'avoir un plus grand nombre d'animaux représentés dans la population testée à un moindre coût, et cet avantage est encore plus important dans les troupeaux à faible prévalence (<5%) (Christensen and Gardner, 2000).

La sensibilité des regroupements de fèces (n=5) comparée à la culture de fèces individuelles a été évaluée à 46% (van Schaik et al., 2007), 69% (Tavornpanich et al., 2004) et 87% (Kalis et al., 2000). La probabilité de détecter un troupeau positif pour le MAP par cette méthode (sensibilité au niveau du troupeau) a été évaluée à 73% (Kalis et al., 2000) et 81% (Tavornpanich et al., 2004). Cette sensibilité semble dépendante du nombre d'échantillons de fèces individuelles positifs pour le MAP dans le regroupement de fèces et du niveau d'excrétion. Par exemple, dans l'étude de Tavornpanich (Tavornpanich et al., 2004), la sensibilité augmentait lorsque le nombre de fèces individuelles positives augmentait dans le regroupement de 10 fèces. La sensibilité variait de 64% lorsqu'un échantillon de fèces du regroupement était positif à 100% lorsque 3 fèces individuelles étaient positives (Tavornpanich et al., 2004). Dans un même ordre d'idées, la sensibilité est plus faible dans les

regroupements de fèces contenant les fèces d'animaux faibles excréteurs, donc avec peu de MAP. Pour des regroupements de 10 fèces individuelles avec des animaux faibles excréteurs, la sensibilité a été estimée à 22% (Wells et al., 2002), 24% (van Schaik et al., 2007) et 63% (Tavornpanich et al., 2004) tandis qu'elle était de 91% (Tavornpanich et al., 2004) et 100% (Wells et al., 2002; van Schaik et al., 2007) pour des animaux fortement excréteurs.

Une étude a démontré une meilleure sensibilité lorsque 5 échantillons de fèces étaient regroupés comparativement à un regroupement de 10 fèces individuelles (Wells et al., 2002). Un effet de dilution d'un échantillon positif parmi plusieurs échantillons négatifs pourrait être en cause. Une autre étude n'a toutefois pas trouvé de différence significative de la sensibilité pour des regroupements de 5 ou 10 fèces individuelles (van Schaik et al., 2007). Avec 10 échantillons, la probabilité d'inclure les fèces de plusieurs animaux excréteurs le MAP ou des fèces d'animaux modérément à fortement excréteurs serait plus élevée (van Schaik et al., 2007).

Il peut arriver qu'un regroupement de fèces soit positif pour le MAP à la culture alors que les fèces individuelles contenues dans le regroupement soient toutes négatives à la culture (Kalis et al., 2000; Tavornpanich et al., 2004; van Schaik et al., 2007). Ce phénomène démontre que si le MAP n'est pas uniformément distribué dans un échantillon de fèces, les chances de le détecter seront diminuées (Kalis et al., 2000).

1.6.4 Échantillons de l'environnement

L'équipe du Dr Whitlock de l'University of Pennsylvania fut la première à décrire la contamination de l'environnement par le MAP sur les fermes laitières au début des années 1990 (Whitlock et al., 1992). Environ 50 à 60 sites de l'environnement ont été échantillonnés

pour culture bactérienne sur 11 fermes où plusieurs animaux étaient infectés par le MAP. Le MAP a été isolé de 2 sites ou moins sur 4 de ces fermes et de 13 sites sur 59 sur une ferme fortement contaminée.

Une décennie plus tard, plusieurs équipes ont évalué la prise d'échantillons de l'environnement comme moyen diagnostique pour détecter le MAP au sein des troupeaux laitiers. Le tableau VI présente les caractéristiques des 5 études évaluant la recherche du MAP dans des échantillons de l'environnement.

Raizman *et al.* (Raizman et al., 2004) ont prélevé des échantillons de l'environnement sur 62 fermes à stabulation libre et 46 fermes à stabulation entravée du Minnesota de mai à septembre 2002. Ils ont isolé le MAP, par culture, dans les allées de vaches (77% des troupeaux), dans le site d'entreposage du fumier (68%), les parcs de vêlage (21%), les parcs des vaches malades (18%), de l'eau ruissellement (6%) et les parcs des génisses sevrées (3%). Les échantillons de fèces individuelles étaient prélevés sur un maximum de 100 vaches par troupeau. La culture sur milieu solide avec dénombrement des colonies était réalisée sur des regroupements de 5 fèces individuelles. Des 80 troupeaux avec un statut positif d'infection par le MAP, prédéterminé par le programme de contrôle, 64 troupeaux (80%) avaient au moins 1 regroupement de fèces positif à la culture et 62 (78%) du MAP isolé de leur environnement. Un seul des troupeaux où MAP a été isolé de l'environnement n'avait aucun regroupement de fèces positif à la culture, mais ce troupeau a été partiellement échantillonné (100 vaches sur 210) donc il est possible que le fumier des animaux excréant le MAP n'est pas été échantillonné. Une forte association a été trouvée entre le statut pour MAP déterminé par la culture d'échantillons de l'environnement et la culture de regroupement de 5 fèces individuelles ($P < 0,0001$). Cette étude a également trouvé une association entre la

contamination de l'environnement par le MAP, au niveau des allées des vaches et dans la réserve de fumier, et la prévalence d'excrétion du MAP. Lorsque ces 2 sites étaient négatifs pour le MAP, la prévalence des regroupements de fèces positifs pouvait être estimée entre 0,3 et 4%. Lorsque ces 2 sites étaient fortement contaminés par le MAP (moyenne de ≥ 50 colonies par tube), la prévalence pouvait être estimée entre 53 et 73%.

La détection du MAP au sein de 23 troupeaux californiens par Berghaus *et al.* (Berghaus et al., 2006) s'est avérée similaire pour les 3 méthodes diagnostiques utilisées : la culture de l'environnement (74%), la culture fécale individuelle (70%) et l'ELISA pour détecter les anticorps spécifiques au MAP dans le sérum (65%). Les échantillons de l'environnement étaient prélevés à 3 sites différents. Les cultures de l'environnement se sont avérées plus souvent positives dans la lagune où le fumier est entreposé (15/23) comparativement aux parcs de vaches malades ou fraîches vèlées (8/22) et les allées de circulation des vaches (9/23) (Berghaus et al., 2006). Cette étude a également trouvé que la proportion de vaches positives à un test ELISA détectant les anticorps contre le MAP était corrélée avec la proportion des cultures d'échantillons de l'environnement positives ($P = 0,009$)

Une étude panaméricaine réalisée par Lombard *et al.* (2006) a révélé que plus de 70% des troupeaux infectés par le MAP ont été détectés par des cultures de l'environnement. Plus spécifiquement, la culture d'échantillons de l'environnement a détecté le MAP de 76% des troupeaux trouvés positifs pour le MAP par la culture fécale individuelle, 76,3% des troupeaux classés positifs selon un test ELISA sur le sérum et 71,4% des troupeaux classés positifs selon un test ELISA sur le lait. Des 438 échantillons de l'environnement prélevés, 218 se sont avérés positifs pour le MAP à la culture (45,1%). Sur chaque ferme, environ 5 sites étaient

échantillonnés. Voici le pourcentage des ces sites positifs pour le MAP à la culture : les sorties du salon de traite (52,3%), les planchers de la salle d'attente du salon de traite (49,1%), les allées communes des vaches (48,8%), les lagunes (47,4%), les épandeurs de fumier (42,3%) et les fosses à fumier (41,5%).

Une étude qui a duré 4 ans et durant laquelle des cultures d'échantillons de l'environnement ont été faites bi-annuellement dans 7 troupeaux laitiers majoritairement à stabulation libre a révélé que le plancher des vaches en lactation (30% des échantillons positifs) et le lieu d'entreposage du fumier (33% des échantillons positifs) étaient les 2 sites le plus souvent positifs pour le MAP (Pillars et al., 2009a). Des 731 échantillons de l'environnement mis en culture, 81 (11%) se sont avérés positifs. La majorité des échantillons positifs avaient été prélevés sur les planchers ou dans le site d'entreposage du fumier (n=70). Des échantillons positifs pour le MAP ont également été trouvés dans la nourriture (n=4) et l'eau (n=7). Plus la prévalence d'excrétion du MAP dans le troupeau, déterminée par la culture fécale individuelle, était élevée, plus le nombre d'échantillons de l'environnement positifs pour le MAP était élevé. Plus spécifiquement, dans les troupeaux où la prévalence d'excrétion du MAP était inférieure à 2%, le MAP n'était jamais isolé de l'environnement. Dans les troupeaux où la prévalence d'excrétion était supérieure à 2%, MAP était retrouvé sur les planchers des vaches en lactation et/ou dans le site d'entreposage du fumier 75% du temps.

Un modèle mathématique de simulation a évalué la culture de 6 échantillons de l'environnement pour détecter l'infection par le MAP dans les troupeaux du mid-Ouest américain. Cette méthode diagnostique s'est avérée avoir le meilleur rapport coût-bénéfice comparativement à la culture fécale individuelle faite directement sur tous les individus du troupeau ou seulement sur les individus préalablement trouvés positifs par un test ELISA sur

le sérum et à la culture de fèces regroupées. Pour détecter le MAP au sein du troupeau, la culture de 6 échantillons de l'environnement avait une sensibilité égale ou supérieure à 99% si la prévalence d'excrétion dans le troupeau était d'au moins 16%. Cette sensibilité devenait inférieure à 95% dans les troupeaux avec une prévalence d'excrétion de 5% (Tavornpanich et al., 2008).

Il a été démontré que l'analyse des échantillons de l'environnement prélevés dans des troupeaux californiens à stabulation libre faite par culture bactérienne ou par analyse PCR donnait des résultats comparables (Aly et al., 2009). De plus, une PCR quantitative en temps réel permet de quantifier l'excrétion du MAP dans les échantillons de l'environnement (Aly et al., 2010).

Tableau VI Caractéristiques de 5 études évaluant la recherche du MAP dans des échantillons de l'environnement

Études	Lieu	Nb de troupeaux	Taille moyenne des troupeaux	Période	Protocole d'échantillonnage Nb d'échantillonneurs
Raizman <i>et al.</i> , 2004	Minnesota	62 stabulations libres <hr/> 46 stabulations entravées	217 vaches	mai à septembre 2002	1-2 échantillons composites/site, 10 sites selon disponibilité <hr/> Échantillonneurs multiples
Berghaus <i>et al.</i> , 2006	Californie	23 stabulations libres	680 vaches	janvier à juin 2004	3 sites uniformes par ferme/échantillon composite <hr/> Échantillonneur unique
Lombard <i>et al.</i> , 2006	21 États américains	98 troupeaux	3 catégories : <100; 101-500; >500 vaches	mars à septembre 2002	+/-5 sites, non uniformes par ferme <hr/> Plusieurs échantillonneurs
Pillars <i>et al.</i> , 2009	Michigan	6 stabulations libres <hr/> 1 stabulation libre et entravée	231-445 vaches	bi-annuelle sur 4 ans	13 sites uniformes par ferme <hr/> Non mentionné
Aly <i>et al.</i> , 2009	Californie	4 stabulations libres	1166-3577 vaches	2 périodes d'un mois	Total de 30 échantillons <hr/> 2 échantillonneurs

1.6.5 Conservation des échantillons

Il est primordial que le transport des échantillons vers les laboratoires et leur conservation soient faits dans les meilleures conditions afin d'augmenter les chances d'obtenir un diagnostic exact. La conservation du fumier à -20°C affectant la viabilité du MAP, les échantillons de fumier destinés à la culture doivent être gardés à 4°C pour le transport et à -70°C pour la conservation à long terme (Khare et al., 2008). Le transport des échantillons de sang entier pour analyse sérologique avec ELISA (Biocor ELISA, Omaha, NE) au laboratoire devrait se faire sur glace. L'analyse devrait idéalement être réalisée dans les 24h suivant la récolte de l'échantillon (Alinovi et al., 2009b).

1.7 Modes de transmission

1.7.1 Fèces

Un consensus existe dans la littérature scientifique pour dire que le mode de transmission principale du MAP est la voie féco-orale. Plusieurs auteurs citent comme référence à ce sujet un article du Dr Sweeney paru dans le *Veterinary Clinics of North America* en 1996 (Sweeney, 1996; Clarke, 1997), une revue qui n'est pas révisée par les pairs. D'autres auteurs mentionnent que le principal mode de transmission est la voie féco-orale, sans toutefois s'appuyer sur des preuves scientifiques et parfois sans même citer de référence (Clarke, 1997; Whittington and Sergeant, 2001; Olsen et al., 2002; Lombard, 2011; Eisenberg et al., 2012). Il existe toutefois des évidences démontrant que le MAP est présent dans les fèces et que l'inoculation orale du MAP peut causer l'infection et résulter en l'excrétion dans les fèces.

Il ne fait aucun doute que MAP est bien excrété dans les fèces des bovins. Un groupe a notamment évalué 786 échantillons de fèces de bovins positifs pour le MAP afin de déterminer les caractéristiques de l'excrétion (Crossley et al., 2005). De plus, tel que décrit à la section 1.6.2 Détection de l'agent (tests directs), il existe des tests diagnostiques réalisés sur les fèces afin de démontrer la présence du MAP.

L'inoculation expérimentale du MAP à des veaux par la voie orale résulte en une plus forte excrétion dans leurs fèces et la colonisation de plus de tissus intestinaux et nœuds lymphatiques que pour l'inoculation intra péritonéale (Stabel et al., 2009). Ceci n'est qu'un exemple, pour démontrer que la voie orale serait la voie la plus efficace d'infection par le MAP. Un groupe d'experts a émis des recommandations concernant les modèles expérimentaux pour la maladie de Johne. Ils ont reconnu que la voie orale d'inoculation était la voie à privilégier, car elle permettait de reproduire le plus précisément la voie d'exposition en conditions naturelles (Hines et al., 2007).

1.7.2 Colostrum, Lait

La contamination du colostrum ou du lait par des matières fécales de vaches infectées par le MAP pourrait être une source de transmission du MAP aux veaux. L'excrétion du MAP dans ces sécrétions lactées a aussi été démontrée. Ainsi, le lait prélevé de 26 vaches avec la maladie de Johne a révélé la présence de MAP par culture dans neuf échantillons (35%). Le pis et les trayons avaient été nettoyés avant de faire les prélèvements de lait et une culture de routine sur chaque échantillon avait confirmé l'absence de contamination par des coliformes fécaux (Taylor et al., 1981). MAP a été cultivé de 22/81 nœuds lymphatiques supramammaires (27%) et de 9/77 échantillons de lait (12%) prélevés à l'abattoir. La prévalence de MAP dans

ces 2 types d'échantillons était plus élevée chez les vaches excréant une grande quantité de MAP dans leurs fèces (> 70 ufc/tube de HEYM) que chez celle excréant moins de MAP (≤ 70 ufc/tube de HEYM) (Sweeney et al., 1992a). Sur 36 vaches asymptomatiques excréant le MAP dans leurs fèces, le colostrum de 8 vaches (22%) et le lait de 3 vaches (8%) contenaient du MAP. La probabilité qu'une vache excrète du MAP dans son colostrum était significativement plus élevée si elle était une forte excrétrice de MAP dans ses fèces (Streeter et al., 1995).

L'excrétion du MAP dans le colostrum semble plus prévalente que dans le lait (Streeter et al., 1995). De même, la probabilité qu'une vache excrète le MAP dans ses sécrétions lactées est plus élevée lorsqu'elle présente des signes cliniques de la maladie comparativement à une vache asymptomatique (Taylor et al., 1981; Sweeney et al., 1992a; Streeter et al., 1995). Une vache forte excrétrice de MAP dans les fèces semble plus à risque d'excréter dans le colostrum et le lait qu'une vache faiblement excrétrice (Streeter et al., 1995). L'importance quantitative de ce mode de transmission demeure incertaine.

1.7.3 *In utero*

Une méta-analyse regroupant 5 études publiées entre 1980 et 2003 et totalisant 203 fœtus de vaches asymptomatiques et 26 fœtus de vaches avec les signes cliniques de la maladie de Johne a été réalisée afin de déterminer la prévalence de l'infection *in utero* chez les bovins (Whittington and Windsor, 2009). Pour être considérées, les études devaient avoir examiné plus de 2 fœtus, décrit la méthode microbiologique d'identification du MAP et spécifié que des précautions avaient été prises afin d'éviter la contamination croisée entre les tissus maternels et fœtaux. La prévalence d'infections fœtales par MAP chez les vaches

asymptomatiques était de 9% (IC 95% : 6-14%) et de 39% (IC 95% : 20-60%) chez les vaches symptomatiques. Le risque d'infection du fœtus est significativement plus élevé chez les vaches avec des signes cliniques que chez les vaches infectées par le MAP mais asymptomatique (Whittington and Windsor, 2009). Chez les vaches asymptomatiques, il a aussi été démontré que l'infection du fœtus par le MAP était plus fréquente chez les vaches fortes excrétrices dans les fèces que chez les vaches faiblement excrétrices (Sweeney et al., 1992b). Dans un troupeau de vaches Jersey où la prévalence des cultures fécales positives était d'environ 7,7%, 11 échantillons de divers tissus (foie, rein, rate, valve et nœud lymphatique iléocœcale, 3 nœuds lymphatiques mésentériques et 3 portions d'iléon) de 49 veaux mâles de moins de 24 heures d'âge et n'ayant pas consommé de colostrum ont été cultivés pour détecter la présence du MAP. Des 49 mères desquelles provenaient les veaux, 28 vaches excrétaient le MAP dans leurs fèces et pour plus de la moitié (n=18), cette excrétion était faible. Les tissus d'un seul veau se sont avérés positifs pour le MAP et la mère de ce veau avec une forte excrétion fécale de MAP. Ces résultats suggèrent que les veaux nés de mères faiblement excrétrices de MAP dans leurs fèces sont à faible risque d'avoir été infectés *in utero* (Adaska and Whitlock, 2012).

Une étude a comparé les résultats sérologiques de 625 paires mère-fille de vaches Holstein. Les vaches ayant une mère séropositive avaient 6.6 fois plus de chance d'être séropositives que les vaches ayant une mère séronégative. La séropositivité chez les vaches nées d'une mère séropositive pouvait être expliquée à 84.6% uniquement par le fait d'être nées d'une mère séropositive. Par contre, cette étude ne permet pas de déterminer avec exactitude à quel moment la transmission du MAP a eu lieu : *in utero* ou peu de temps après la naissance par ingestion de fèces et/ou de colostrum contaminés par le veau (Aly and Thurmond, 2005).

1.7.4 Transfert d'embryons

Le MAP peut être isolé de fluides utérins récoltés par lavage chez des vaches avec des signes cliniques de la paratuberculose (Rohde and Shulaw, 1990), mais aussi chez des vaches asymptomatiques (Bielanski et al., 2006).

Une étude a été réalisée sur 16 vaches faiblement à modérément excrétrices de MAP dans leurs fèces afin de déterminer la transmission ovarienne du MAP aux ovules et la transmission utérine aux embryons (Kruip et al., 2003). À la nécropsie, 5 de ces vaches ne présentaient pas de lésions intestinales et les 11 autres présentaient divers degrés de lésions classiques de la paratuberculose. Les échantillons prélevés ont été mis en culture pour le MAP pour une période de 1 an. Aucun MAP n'a été cultivé des prélèvements transvaginaux de follicules ovariens (ovules, fluides folliculaires), des embryons récoltés à 7 jours (n=33) ou des embryons/fœtus récoltés entre 35 et 49 jours (n=24). De plus, aucun MAP n'a été isolé des tissus utérins prélevés par biopsie ou des fluides utérins récoltés par lavage de ces 16 vaches (Kruip et al., 2003).

Dans une autre étude, les ovaires de 12 vaches asymptomatiques et positives à un test ELISA ont été prélevés à l'abattoir pour aspiration des follicules ovariens afin de procéder à la fertilisation *in vitro* des ovules (Perry et al., 2006). Onze des 12 vaches avaient une entérite granulomateuse compatible avec la paratuberculose (bactéries acido-alcool-résistantes visualisées à l'histologie ou culture de MAP positive). Le processus de fertilisation *in vitro* a permis d'obtenir 109 embryons aux stades de morula ou de blastocyste avec une zone pellucide intacte qui ont été lavés selon la procédure recommandée par l'*International Embryo Transfer Society* (IETS) avant la congélation. Aucun de ces embryons ou de leur milieu de congélation n'a été positif à la culture pour le MAP. La quantité de MAP excrétée dans les

fèces de ces vaches asymptomatiques étant inconnue, les conclusions de cette étude ne peuvent être inférées à des vaches présentant des signes cliniques et possiblement pas non plus à des vaches fortement excrétrices sans signe clinique (Perry et al., 2006).

Des embryons frais (n=86) provenant de 5 vaches asymptomatiques excréteur le MAP dans leurs fèces et provenant d'une ferme avec un historique d'infection par le MAP ont été transférés dans 22 vaches receveuses. Il en a résulté 9 gestations menées à terme : 6 veaux vivants, dont 3 euthanasiés dans la période néonatale pour problèmes de santé, et 3 veaux morts nés. Aucun des veaux survivants (n=3) et vaches receveuses n'ont développé d'infection à MAP au cours d'une période de 5 ans. Les embryons de mauvaise qualité et les ovules non fertilisés n'ont pas révélé la présence du MAP en culture ou par PCR. Par contre, le liquide utérin des 5 vaches asymptomatiques était positif pour le MAP en culture (Bielanski et al., 2006).

Les ovaires de deux vaches avec les signes cliniques de la maladie de Johne ont été prélevés en post-mortem. Du MAP a été isolé des ovules et des embryons fertilisés *in vitro* de ces vaches (exposition naturelle). Des embryons fertilisés *in vitro*, exposés de façon expérimentale au MAP *in vitro* puis lavés ont été transférés à 6 vaches receveuses. Cela a résulté en 5 gestations, 2 veaux vivants à la naissance dont 1 mort de pneumonie. Aucune des vaches receveuses et le veau survivant n'a été déclaré positif pour le MAP au cours d'une période de 5 ans (Bielanski et al., 2006).

Un cas de taure receveuse qui a été diagnostiquée avec la paratuberculose en nécropsie après avoir donné naissance à un veau par césarienne, qui développa à son tour des lésions caractéristiques de la paratuberculose à 24 mois d'âge, a été rapporté (Manning et al., 2003b). Cette taure était négative à l'ELISA et à la culture fécale pour le MAP au moment du transfert

embryonnaire, mais elle était devenue positive à l'ELISA au sixième mois de gestation et avait développé de la diarrhée intermittente en fin de gestation. Elle provenait d'un troupeau infecté par le MAP.

La revue de ces études suggère qu'il est peu probable que le MAP puisse être transmis par le transfert d'embryons lorsque les embryons ont été lavés selon les recommandations de l'International Embryo Transfer Society et que la contamination iatrogénique par le fumier ait été contrôlée en usant de mesures d'hygiène adéquates. La production d'embryons *in vitro* pourrait possiblement s'avérer un bon moyen de transmettre le matériel génétique d'une vache atteinte de la paratuberculose à sa descendance sans lui transmettre le MAP. Toutefois, il est raisonnable de penser que ce risque, quoique minime, existe chez les vaches à un stage avancé de la maladie. C'est surtout le risque de transmission du MAP *in utero* d'une vache receveuse infectée au fœtus qui ne doit pas être négligé lors du processus de transfert embryonnaire. Il est important de s'assurer que les vaches receveuses sont négatives pour le MAP, mais surtout qu'elles proviennent d'un troupeau à faible risque d'être infecté par le MAP.

1.7.5 Semence

MAP peut être isolé des organes reproducteurs et de la semence des taureaux asymptomatiques (Larsen et al., 1981) ou présentant des signes cliniques (Larsen and Kopecky, 1970). Certaines études rapportent une excrétion intermittente du MAP dans la semence (Larsen et al., 1981; Munster et al., 2013). Une étude rapporte que 9/9 échantillons de sperme prélevés sur une période de 380 jours d'un taureau de race Piémontaise de 2,5 ans étaient positifs pour le MAP à la PCR (Khol et al., 2010). Sur 100 échantillons de sperme congelés d'un taureau excréteur le MAP dans ses fèces, un seul s'est avéré positif à la culture

pour le MAP (Ayele et al., 2004). Une étude où du MAP avait été inoculé expérimentalement dans l'utérus et isolé jusqu'à 2 semaines suivant l'inoculation, mais pas 3 à 4 semaines plus tard avait conclu que le MAP présent dans la semence des taureaux pourrait être éliminé sans causer une infection systémique (Merkal et al., 1982).

Il existe donc un très faible risque de transmission du MAP par la semence lors d'insémination naturelle ou artificielle. À ce jour, aucun cas de transmission du MAP à une vache saine par le sperme d'un taureau infecté n'a été rapporté. Les taureaux reproducteurs qui ont été élevés sur une ferme où les infections à MAP sont présentes et qui seront utilisés pour la saillie naturelle représentent probablement une source de MAP via une excrétion fécale plutôt que via la saillie.

1.7.6 Environnement, Aérosols

Malgré le fait que MAP soit un agent pathogène obligatoire (Thorel et al., 1990), sa survie à l'extérieur de l'hôte a été démontrée dans plusieurs études expérimentales. Le MAP a pu être isolé de fèces de bovins naturellement infectées qui ont été exposées aux conditions atmosphériques durant 246 jours et qui ont subi les rayonnements du soleil, la pluie, le gel et la sécheresse (Lovell et al., 1944). La souche S du mouton a survécu 55 semaines dans un pâturage complètement ombragé (Whittington et al., 2004). En 1992, Whitlock *et al.* décrivaient pour la première fois la contamination par MAP de l'environnement des fermes laitières. Du MAP viable a été isolé de particules de poussière de 11 fermes sur 22 échantillonnées en Hollande (Eisenberg et al., 2010). Une étude expérimentale a démontré que l'inoculation du MAP chez des veaux Holstein nouveau nés, par les voies respiratoires

(transtrachéale et intra nasale), peut engendrer une infection intestinale, donc que le risque de transmission du MAP par aérosol existe (Eisenberg et al., 2011).

1.7.7 Animaux sauvages

MAP a été isolé de plusieurs espèces de ruminants sauvages comme des chevreuils (Mackintosh et al., 2004; Raizman et al., 2005), des orignaux (Manning et al., 2003a), des bisons (Sibley et al., 2007), des mouflons (Williams et al., 1983), des chèvres de montagnes (Williams et al., 1983) et des guanacos (Salgado et al., 2009).

Une étude en Grèce (Florou et al., 2008) rapporte la culture du MAP de tissus d'animaux sauvages non-ruminants (2 souris, 1 lièvre, 1 rat, 1 renard) capturés autour de 4 troupeaux de chèvres et moutons. Les tissus de 327 animaux sauvages venant de 11 espèces différentes avaient été prélevés. La culture de 100 échantillons de fèces de chèvres et moutons a révélé 12 chèvres et 11 moutons positifs. La majorité des isolats étaient de type C et seulement 2, d'une souris et d'une chèvre, de type S. Ces animaux sauvages ne présentaient aucunes lésions histologiques donc sont probablement des hôtes terminaux. En Écosse, MAP a été cultivé des tissus de rats, souris, renards, hermines, belettes, corneilles, d'un lièvre et d'un blaireau. Certaines de ces espèces présentaient des lésions histologiques compatibles avec l'infection par le MAP et ce dernier a également été isolé de leurs fèces (Beard et al., 2001a). Une étude réalisée dans neuf troupeaux laitiers (n=6) et de boucherie (n=3) au Wisconsin et en Géorgie, É.-U., rapporte une prévalence d'infection des animaux sauvages, sur le site des élevages, variant de 0 à 8,3% entre les troupeaux. Sur les 2,752 échantillons prélevés, la culture de 32 échantillons de tissus s'est avérée positive pour le MAP. Des 774 animaux échantillonnés, seulement 7 excrétaient le MAP dans leurs fèces (3 rats-laveurs, 2 tatous, 1

opossum et 1 chat sauvage), soit une prévalence d'excrétion du MAP de 0,9% (Corn et al., 2005). En Écosse, le lapin a été identifié comme une espèce sauvage très importante pour la persistance du MAP dans l'environnement, donc potentiellement une source importante d'infection pour les animaux d'élevage comme les bovins (Daniels et al., 2003a; Judge et al., 2006). Un isolat de MAP d'un lapin naturellement infecté a été utilisé pour infecter 8 veaux âgés de 1 à 4 jours par la voie orale. À 6 mois d'âge, cette souche de MAP a été isolée par culture de tous les veaux soit dans les fèces (n=5) et/ou les tissus (n=7) (Beard et al., 2001b).

Certains auteurs suggèrent même la possibilité que des larves de mouches syrphides (*Eristalis tenax*) trouvées près des fosses à fumier et desquelles du MAP a été isolé puissent participer à la transmission. Le MAP isolé de 21.4% des larves de *E. tenax*, identique au MAP isolé des fèces de bovins, n'a toutefois pas été isolé des autres stades de développement de la mouche (pupe, adulte) (Fischer et al., 2005). La même équipe de chercheurs suggère que les vers de terre (Lumbricidae) pourraient aussi être des vecteurs du MAP (Fischer et al., 2003).

L'importance de ces animaux sauvages comme réservoir du MAP semble être minime vu la faible prévalence d'infection chez ces espèces. Par contre, peu d'information concernant l'épidémiologie de l'infection par le MAP chez ces espèces est disponible. Quelques études ont exploré des facteurs de risque de transmission. Le contact entre les bovins et les animaux sauvages pourrait se faire par l'utilisation de pâturage ou l'épandage de fumier dans les champs (Raizman et al., 2005). La contamination des réserves de nourriture est aussi à considérer (Daniels et al., 2003b). Le rôle de ces espèces sauvages dans la transmission du MAP aux ruminants d'élevage devrait être considéré et exploré davantage.

1.7.8 Autres ruminants domestiques

La souche ovine de MAP (souche S) peut se transmettre aux bovins de façon sporadique (Moloney and Whittington, 2008). La souche S a déjà été isolée chez la chèvre (Florou et al., 2008) et aussi chez des camélidés (Ghosh et al., 2012). La souche bovine, la souche C, est toutefois plus pathogène chez les caprins que la souche S (Stewart et al., 2006). L'infection au MAP est aussi rapportée chez le lama (Belknap et al., 1994) et l'alpaga (Fecteau et al., 2009).

1.8 Revue systématique de la littérature et méta-analyse

Cette revue de la littérature de type narrative cite quelques revues systématiques de la littérature et des méta-analyses. Un des articles de ce mémoire de maîtrise est une revue systématique de la littérature. Une brève description de ces types d'études, qui représente le plus haut niveau de preuves scientifiques (voir pyramide, Figure 1) est donc nécessaire.

La revue systématique de la littérature permet de recueillir l'information de plusieurs recherches individuelles, qui peuvent avoir un faible niveau de preuve ou des conclusions contradictoires, afin de répondre à une question spécifique (Sargeant et al., 2006). Ce qui la différencie des revues traditionnelles est l'utilisation de méthodes systématiques afin de diminuer les biais, ce qui permet d'obtenir des résultats plus fiables à partir desquels des conclusions seront tirées et des décisions prises (Antman et al., 1992; Oxman and Guyatt, 1993). Voici les caractéristiques essentielles de la revue systématique (Higgins JPT, 2011) (Cochrane Handbook, 2011) :

- des objectifs clairement établis avec des critères d'éligibilité prédéfinis pour les études;
- une méthode explicite et reproductible;

- une recherche systématique afin d'identifier toutes les études qui pourraient répondre aux critères d'éligibilité;
- une évaluation de la validité des résultats trouvés par les études incluses dans la revue, par exemple, par l'évaluation du risque de biais; et
- une présentation systématique et synthétisée des caractéristiques et trouvailles des études incluses.

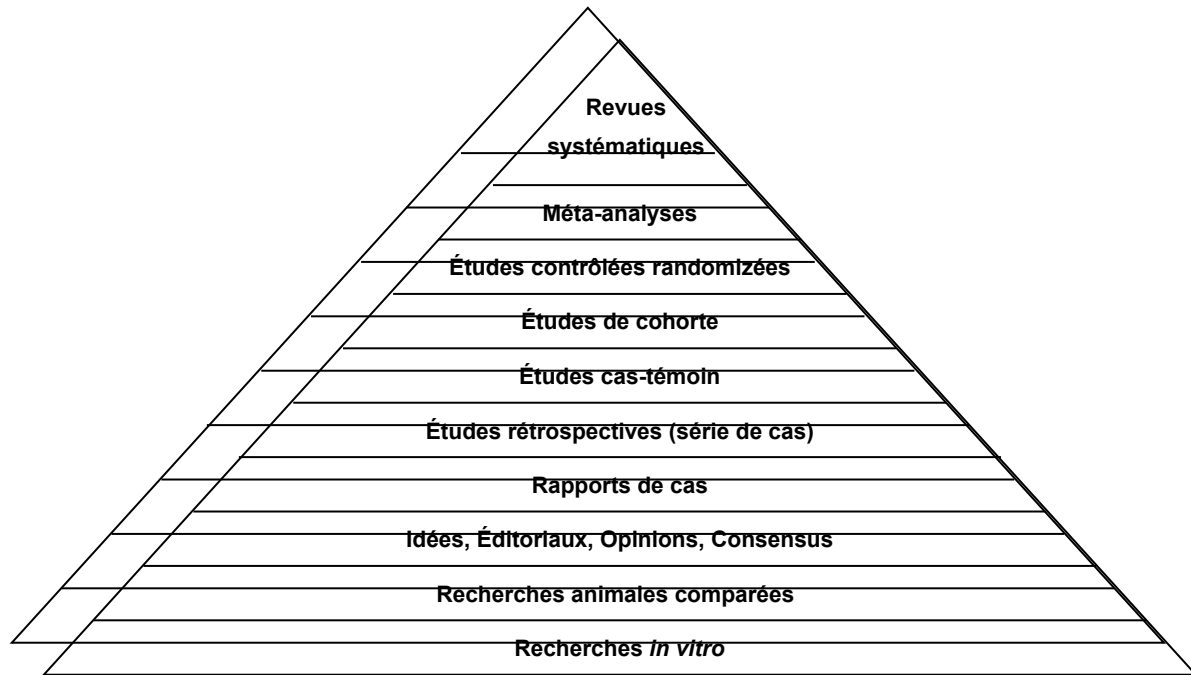
La validité des études est évaluée à 2 niveaux : la validité interne et la validité externe. La validité interne concerne la validité des inférences faites sur la population source qui a été l'objet de l'étude. La validité externe s'intéresse à la généralisation des conclusions de l'étude. Plus spécifiquement, est-ce que les résultats de l'étude seront applicables à d'autres populations, dans d'autres contextes? (Rothman and Greenland, 1998).

La revue systématique peut contenir une méta-analyse qui permet de compiler les résultats de plusieurs études indépendantes, de façon quantitative, en utilisant des méthodes statistiques (Glass, 1976). La méta-analyse permet d'estimer plus précisément l'effet d'un traitement ou d'un facteur de risque sur la maladie que toutes les études individuelles incluses dans son analyse (Lean et al. 2009). Des méta-analyses ont d'ailleurs permis de déterminer la prévalence des infections fœtales par le MAP (Whittington and Windsor, 2009) et la susceptibilité de développer des lésions de la maladie de Johne suite à l'exposition au MAP, en fonction de l'âge lors de cette exposition (Windsor and Whittington, 2010). Il n'est pas toujours approprié ou possible d'inclure une méta-analyse. Par exemple, lorsque les devis des études diffèrent beaucoup et qu'il n'est pas possible de regrouper les résultats ou bien que le nombre de données disponibles est trop faible pour arriver à faire une analyse. Par exemple, une revue systématique sur la contamination des aliments par le MAP, de la ferme à l'épicerie,

qui concernait autant les produits laitiers que carnés ne permettait pas de faire une méta-analyse vue la grande variété des facteurs de risque étudiés (Eltholth et al., 2009). Une étude visant à déterminer la présence du MAP dans le lait sur les fermes laitières a permis de compiler dans une méta-analyse les résultats de 31 articles suite à une revue systématique, afin de déterminer une prévalence apparente du MAP dans le lait du réservoir et dans le lait des vaches individuelles. Toutefois, la méta-analyse n'a pas pu être appliquée à la quantification de la charge bactérienne du MAP dans les échantillons de lait puisqu'un trop petit nombre d'articles fournissaient cette information (Okura et al., 2012).

Ces types d'études rendent disponibles des conclusions avec un très haut niveau de preuve sur lesquelles les scientifiques, les professionnels de la santé et les autorités gouvernementales peuvent baser leurs décisions de façon éclairée.

Figure 1 Pyramide des évidences selon le type d'étude. Les études avec la plus grande certitude scientifique se trouvent au sommet de la pyramide et celles à la base de la pyramide ont le plus faible niveau de certitude. (Adapté de (Holmes, 2007))



Chapitre 2 : Risk Factors Associated with Transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) to Calves within Dairy Herds: a Systematic Review

E Doré, J Paré, G Côté, S Buczinski, O Labrecque, JP Roy, G Fecteau

Article publié dans le Journal of Veterinary Internal Medicine

J Vet Intern Med. 2012 Jan-Feb;26(1):32-45. doi: 10.1111/j.1939-1676.2011.00854.x. Epub 2011 Dec 23.

Présentation du résumé de recherché au 28th American College of Veterinary Internal Medicine Forum, Anaheim, California, Juin 2010 et au 26th World Buiatric Congress, Santiago, Chile, Novembre 2010

Contribution à l'article de chacun des auteurs.

E Doré: Recherche systématique des études en lien avec les 5 questions. Sélection des études pertinentes en fonction 1) des titres, 2) des résumés et 3) des articles en entier. Extraction des données pertinentes de chaque article retenu pour la revue systématique. Détermination d'une grille pour déterminer la validité des études. Écriture de l'article. J Paré : Sélection des études pertinentes suite à la lecture des articles en entier. Extraction des données pertinentes de chaque article retenu pour la revue systématique. Détermination d'une grille pour déterminer la validité des études. Révision de l'article. G Côté : Révision de l'article. S Buczinski : Aide à la détermination de la validité des études. Révision de l'article. O Labrecque : Révision de l'article. JP Roy : Révision de l'article. G Fecteau : Sélection des études pertinentes suite à la lecture des articles en entier. Extraction des données pertinentes de chaque article retenu pour la revue systématique. Révision de l'article.

Background: Paratuberculosis has a worldwide distribution and many countries have implemented control programs to prevent transmission among and within herds. For these programs to be efficient, knowledge of the risk factors involved in transmission is essential.

Objectives: Systematically review the scientific literature concerning risk factors associated with MAP transmission to dairy calves.

Study Design: Systematic Review

Methods: An electronic search was done in PubMed and CAB to retrieve references relevant to answer at least 1 of the 5 questions concerning neonatal environment, colostrum, milk, housing of calves and contact of calves with adult cow feces as risk factors in MAP transmission. A first screening using titles only, then abstracts and finally full length papers were reviewed for relevance. From the papers selected, risk factors and presence of a significant association between these risk factors and MAP transmission was recorded.

Results: Twenty-three articles from 11 different countries and published in 12 different journals were reviewed. The most common study design was cross-sectional (n=16). The case definition and diagnostic tests used were very variable among studies, but serum ELISA was used in most studies (n=14). The study unit was the herd in 18 studies.

Conclusions and Clinical Importance: The contact of calves with adult cow feces is the most important risk factor in MAP transmission. The 5 categories of risk factors are linked to one another.

Paratuberculosis or Johne's disease is a chronic enteric disease of ruminants caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). The bacteria is mostly transmitted by

the feco-oral route, but also can be excreted in colostrum¹ and milk from subclinically^{1,2} or clinically affected cows.³ The infection also can be transmitted *in utero*.⁴ Age susceptibility of cattle recently has been studied in a systematic review with meta-analysis using 11 experimental studies published between 1938 and 2006 (n=140 cattle). It was concluded that 73.7% of calves exposed to MAP before the age of 6 months developed lesions of Johne's disease whereas only 19.3% of cattle exposed after 12 months of age developed lesions.⁵

Prevention is the key to control paratuberculosis because the long incubation period (2-10 years)⁶ and low sensitivity of most diagnostic tests⁷ make early detection of infected animals difficult. It has been suggested by simulation models that improving calf management was more efficient to decrease MAP prevalence in a herd than a test and cull strategy.^{8,9} These are reasons why control programs should emphasize prevention of MAP transmission, especially to the more susceptible young stock.

The objective of this study was to systematically review the scientific literature concerning risk factors related to MAP transmission to calves.

Materials and Methods

The guidelines for conducting a systematic review were based on “A Guide to Conducting Systematic Reviews in Agri-Food Public Health”.¹⁰

Search strategy

The electronic databases, PubMed Medline (1950-2010) and CAB (1973-2010) were searched in January 2011. The systematic search addressed 5 specific questions related to risk factors for transmission of MAP to calves:

1. Is there a relationship between the characteristics of the immediate neonatal environment and the risk of MAP transmission?
2. What is the risk of MAP transmission to neonatal calves through colostrum ingestion?
3. What is the risk of MAP transmission to neonatal calves through milk ingestion?
4. Does group-housing calves increase the risk of MAP transmission?
5. Is there an increased risk of MAP transmission when calves have contact with adult cow feces?

The following Medical Subject Headings (Mesh) were used for the search in PubMed Medline: "Paratuberculosis/epidemiology" [Mesh] OR "Paratuberculosis/prevention and control" [Mesh] OR "Paratuberculosis/transmission" [Mesh] OR "Paratuberculosis/veterinary" [Mesh] AND "Cattle".

The following key words were used for the search in CAB: Cattle OR Bovine AND Paratuberculosis OR Johne's OR mycobacterium avium paratuberculosis OR mycobacterium avium subsp paratuberculosis OR mycobacterium avium subspecies paratuberculosis AND

Transmission OR Control OR Prevention OR Risk Factors OR Strategies OR Management
AND Milk OR Colostrum OR Calves OR Calf OR Calving OR Housing OR Environment.

Identification of relevant studies

Only studies published in peer-reviewed journals were included. English, French and Spanish manuscripts were considered. If at least 1 of the 5 questions was potentially answered in the publication, it was deemed relevant. A first selection was based only on the title. Citations discarded based on the title concerned diagnostic tests, vaccine, economics, productivity, species other than bovine, Crohn's disease, pharmacology, pathophysiology, genomics, immunology, transmission *in utero*, by embryo transfer or semen and *in vitro* studies. The abstracts then were reviewed and more manuscripts were discarded for similar reasons. Citations concerning prevalence studies or beef cattle were not discarded based on the title but after reading the abstract if deemed irrelevant. The remaining papers were reviewed in totality by 3 authors (E.D., J.P., G.F.) to ensure they addressed at least 1 of the 5 questions. Articles concerning only theoretical mathematical models were discarded.

Data extraction

The following information was collected from each article: first author, journal and year of publication, country (USA state or Canadian province if applicable) where the study was done, study design, unit of interest and number of animals or farms, case definition used at herd or farm level and diagnostic test used when applicable. Relevant risk factors studied for each question and statistical analysis used (univariate or multivariate analysis and significance threshold) were recorded.

For each article, conclusions drawn with regard to the questions of interest were recorded. The possible conclusions were: 1) significant association between factor and risk of MAP transmission in the univariate analysis 2) significant association between factor and risk of MAP transmission in the multivariate analysis 3) no significant association detected. It also was noted when the association was contrary to common knowledge. The level of significance was the threshold used in each manuscript.

Study appraisal

The study appraisal process was done by 2 authors independently (E.D., J.P.). We used a qualitative checklist derived from Sanderson et al.¹¹ The internal and external validities of the studies were evaluated to determine support for causal association between risk factor and paratuberculosis infection. The validities were described separately but with the same scale: low, moderate or high. The following stepwise criteria were used to evaluate internal validity: 1) Study design and 2) Quality of the study (specifically case definition and diagnostic test reliability). Study designs for which time of exposure could not be ascertained (case-control, cross-sectional) could not be classified as high. A qualitative score was given as follow: + for case-control and cross-sectional studies, ++ for longitudinal, follow-up prevalence and retrospective cohort studies and +++ for experimental and randomized controlled clinical trial. The case definition had to be stated and clear. Diagnostic tests and threshold used also were important considerations. Fecal culture to identify MAP has a stronger diagnostic value than a serologic test (ELISA) to detect the immune response.⁷ More specifically, requiring 2 positive ELISA results in order to call a herd infected is a more reliable criterion than requiring 1 positive ELISA result in order to call an individual cow infected. A qualitative score was

given as follows according to the diagnostic method used: 0 for identification of a case with clinical signs by owners or veterinarians, 1 if detection of humoral response on an individual animal was used, 2 for more than 1 individual animal with positive humoral response to consider a herd positive and 3 if the test used was aimed at detecting MAP directly.

The internal validity was high for study design ++ or +++, with a clear case definition and diagnosis based on MAP isolation. The support for causal association was judged moderate if the study design was + and isolation of MAP was used for diagnosis or with a study design ++ with detection of antibody response for diagnosis. All other study designs were considered low support for causal association.

The criteria used to determine external validity were sample size and how sampling was done. Studies with < 40 herds or cows enrolled in a voluntary control program were judged to have a low external validity. If the sample size was ≥ 40 and the sampling was done randomly, the external validity was judged high. Moderate external validity was used to describe studies with ≥ 40 enrolled in a control program or studies with fewer herds for which the sampling was done randomly.

Also how the herds were selected, the time lag between evaluation of risk factors by a questionnaire and testing of the herd for MAP and type of possible biases were recorded.

Results

The PubMed Medline search yielded 441 citations. Thirty-four citations were not in English, French or Spanish. The remaining citations (n=407) were screened using the title only and 268 were considered irrelevant. After reading the abstract (n=139), 84 more were discarded. Fifty-five articles were read completely and reviewed, and 20 were kept for data extraction.

The CAB search yielded 346 citations that were screened using their titles and 257 were discarded. After review of 89 abstracts, 36 were discarded because they did not address any of the questions, 11 because they were not in English, French or Spanish and 33 were duplicates from the PubMed search. Nine articles were reviewed and 3 were kept for data extraction.

Twenty-three articles were included in the study. The year of publication varied from 1992 to 2010 and articles originated from 12 different journals. The work was done in 11 different countries. The most common study design was cross-sectional (n=16). The study unit was the herd (n=18) or the cows (n=5). The number of farms studied varied from 1 to 2,953. The definition of a positive animal or a positive herd was variable. The most common diagnostic test used was serum ELISA (n=14). Details of the data extracted for the 23 articles are presented in Table 1. Study appraisal is presented in Table 2.

The characteristics of the immediate neonatal environment and the risk of MAP transmission (question 1) were addressed in 18¹²⁻²⁹ of 23 manuscripts. (Table 3) Eleven articles reported a significant association between the immediate neonatal environment and MAP infection. Contamination of udders with manure¹² group housing of periparturient cows,²⁹ and presence of more than 1 cow in the maternity pen²⁸ were 3 factors that increased the risk of being a MAP infected herd. Benedictus et al¹³ found a relationship between lifelong infection status of calves born from negative dams and calving pen contamination. Calves exposed to a

contaminated calving pen by infected cattle or shedding cattle between 3 and 10 days of life were more likely to become infected by MAP and to have a positive fecal culture compared to calves not exposed. Odds ratio varied from 2.2 to 3.9 if infected cattle contaminated the calving pen and varied from 3.6 to 6.6 if shedding cattle were in the calving pen. Ridge et al in 2005²⁵ found an increased risk of infection when calving occurred in a shed or a calving pad compared to a paddock. Ridge et al in 2010²⁶ found that calving in a paddock or in a shed compared to a calving pad increased the risk of MAP transmission.

Çetinkaya et al¹⁵ demonstrated a protective effect of calving in an individual pen when the cows are at grass. Goodger et al¹⁹ identified that scores in the newborn calf care category, which includes time of removal from the dam, was significantly correlated with the apparent prevalence of MAP in dairy herds. Nielsen and Toft²³ found that proper management of the calving area (proper hygiene of the feeding area, more straw) reduced the odds of MAP infection at the herd level. Cashman et al¹⁴ found that the probability of having a MAP positive culture was significantly decreased as the percentage of calving attended increased.

A case-control study by Johnson-Ifeorunlu and Kaneene²⁰ reported an association that was contrary to common thinking. In this study, washing cows' udders before parturition was associated with an increased risk of infection with MAP.

The risk of MAP transmission through colostrum ingestion (question 2) was addressed in 11^{12,14,18,19,21,22,27,28,30-32} of 23 manuscripts (Table 4). A significant association between the type of colostrum fed to calves and MAP transmission was detected in 4 manuscripts. Dieguez et al¹⁸ found that feeding colostrum from ELISA-positive cows increased the risk of being an infected herd by MAP. Nielsen's study³¹ was specifically designed to study colostrum as a risk factor for MAP infection in dairy cattle. The risk of a cow having a positive ELISA is greater

for cows that, when they were calves, had been fed pooled colostrum from multiple cows than it was for cows that had been fed colostrum from their own dams. Calves fed pooled colostrum from multiple cows were at greater risk of testing positive once adult to an in-house milk ELISA compared to calves fed colostrum only from their own dam. In Stabel's³⁰ randomized control trial, 6 calves were fed colostrum from their dam (DC) and 5 calves received pasteurized colostrum (PC). The DC calves were allowed to nurse their dam for 8 h after birth, received milk from their dam for 3 weeks and milk replacer for the next 3 weeks. The PC calves were separated from their dam immediately after birth before they could nurse and were fed milk replacer for 6 weeks. After weaning, the 11 calves were housed together until 1 year of age. There was no significant difference between serum ELISA results, fecal shedding of MAP and positive culture of MAP from post-mortem tissues of the 2 groups. The only significant difference noted was that IFN- γ secretion was higher in DC calves compared to PC calves at 5 months of age. In Goodger's study,¹⁹ newborn care was significantly associated with the prevalence of MAP in dairy herds. Newborn calf care included colostrum management factors: cleanliness of udder and bottles, and if the colostrum was pooled.

The risk of MAP transmission through milk ingestion (question 3) was addressed in 13^{12,14,15,17,21,22,24-28,30,31} of 23 manuscripts (Table 5). A significant association between the type of milk fed to calves and MAP transmission was detected in 4 manuscripts. Nielsen's study³¹ was specifically designed to study colostrum and milk as risk factors for MAP transmission in dairy cattle. Calves suckling with foster cows had an odds ratio of 2.012 (95% CI: 1.370-2.956) to be ELISA positive compared to calves fed milk replacer. In-house milk ELISA was repeated up to 4 times a year on all lactating cows. Ridge et al²⁵ demonstrated that feeding waste milk to calves was significantly associated with increased occurrence of MAP infection

based on serum ELISA and clinical cases. In a subsequent study, Ridge et al²⁶ found that feeding waste milk to calves decreased the risk of MAP transmission. In McNab's case-control study,²¹ being a high risk herd, based on the herd mean LAM-ELISA optical density and the distribution of individual LAM-ELISA results among the herds, was positively associated with the proportion of newborn calves fed no raw milk.

Group-housing calves as a risk of MAP transmission (question 4) was addressed in 11^{13-16,20,21,23,24,28,29,33} of 23 manuscripts (Table 6). Four studies found a significant association between group-housing of preweaned calves and MAP transmission. Tiwari et al²⁸ found that group-housing pre-weaned calves in winter was associated with the number of ELISA-positive cows in a herd. Benedictus et al¹³ confirmed in a 20-year longitudinal study the risk of transmission of MAP to calves raised with a future high shedder (>100 colony forming units of MAP/gram of feces on culture). Calves born within 90 days after the birth of a future high shedder were 19.1 times more likely to become infected with MAP. Wells and Wagner²⁹ found that group housing of calves before weaning increased the risk of being a herd infected with MAP. Cashman et al¹⁴ found that herds raising calves in individual pens had decreased odds of a positive culture for MAP on the milk sock filter residue.

The contact between calves and adult cow feces and the risk of MAP transmission (question 5) was addressed in 14^{14,17-20,22-25,27-29,33,34} of 23 manuscripts (Table 7). A significant association between MAP transmission and contact between calves and adult cow feces was detected in 5 manuscripts. Norton et al²⁴ found an almost dose-response relationship between the frequency of grazing calves in a hospital paddock and the odds of being a high incidence herd. Herds where calves were housed with adults before 6 months of age were more likely to be infected by MAP.¹⁸ Obasanjo et al³⁴ found a similar association in herds for which calves

between 0 and 6 weeks of age were exposed to adult feces. An experimental study³³ demonstrated that calves in contact with adult fecal shedders are at higher risk of becoming infected. In Goodger's study,¹⁹ a regression analysis identified that newborn care was significantly associated with the prevalence of MAP in dairy herds. Herds having high score for management practices were less likely to be infected with MAP. Questions relevant to evaluate the contact between calves and adult cow feces were included in the manure handling category and were: manure equipment not used for feeding, young stock not near adult manure and barn cleaner not near calves.

Table 1 Data extracted from the 23 articles included in the systematic review

Authors	Year	Country	Study Design*	Number Animals/ Herds (Study Unit in Bold)	Case Definition	Diagnostic Tests
Correia-Gomes et al ¹⁷	2010	Portugal	Cross-sectional	5294 cows/ 122 herds	Milk ELISA + = cow + One cow + = herd +	Milk ELISA ^d
Ridge et al ²⁶	2010	Australia	Retrospective cohort	137 herds	ELISA + or clinical case of JD after 2 nd whole herd test = herd +	ELISA (not specified)
Ansari-Lari et al ¹²	2009	Iran	Cross-sectional	110 herds	PCR + on bulk-tank milk = herd +	IS900-PCR
Norton et al ²⁴	2009	New Zealand	Cross-sectional	427 herds	Perception of clinical case by veterinarians, farmers' records	Not done
Pithua et al ³²	2009	USA	Randomized-control clinical trial	497 calves/ 12 JD endemic herds	ELISA, FC or both + at 30, 42 or 54 months of age	ELISA IDEXX ^a HEYM
Tiwari et al ²⁸	2009	Canada	Cross-sectional	7689 cows/ 257 herds	ELISA + = cow +. Count ELISA+ cows/farm	ELISA IDEXX ^a /BIOCOR ^b
Benedictus et al ¹³	2008	USA	Longitudinal	≈ 400 cows from 1 herd over 20 years	FC+ (twice/year all ≥2 year old and some young stock) = cow +	HEYM
Cashman et al ¹⁴	2008	Ireland	Cross-sectional	59 herds	PCR or culture + of milk sock filters = herd + ; 6 times over 24m	PCR, Culture
Dieguez et al ¹⁸	2008	Spain	Cross-sectional	5528 cows > 1 year old/ 101 herds	Herd -: no ELISA+ cows or only one ELISA+ but no cows with CS Herd +: 2-4 ELISA + cows or 1 ELISA + and at least 1 with CS Highly + herd: ≥ 5 ELISA + cows or 2-4 ELISA + and at least 2 cows with CS	ELISA IDEXX ^a
Nielsen et al ³¹	2008	Denmark	Cross-sectional	93,994 cows/ 799 herds	ELISA + = cow +	In-house ELISA ¹
Stabel ³⁰	2008	USA	Randomized controlled clinical trial	6 DC calves 5 PC calves	FC+, ELISA+ or ↑ INF-γ/month Culture or PCR+ on necropsy tissues at 12 months of age	HEYM, ELISA ^c , INF-γ ^h , IS900 PCR

Table 1 (Continued)

Authors	Year	Country	Study Design*	Number Animals/ Herds (Study Unit in Bold)	Case Definition	Diagnostic Tests
Tavornpanich et al ²⁷	2008	USA	Cross-sectional	60 lactating cows per herd/ 21 herds	Low to zero seroprevalence herd: ≤ 2 ELISA+ cows; high seroprevalence: ≥ 3 ELISA + cows	ELISA IDEXX ^a
Nielsen et Toft ²³	2007	Denmark	Follow-up prevalence	All lactating cows/ 97 herds	Continuous OD milk ELISA	In-house ELISA ¹
Van Roermund et al ³³	2007	Netherlands	Experimental	A) 2X 5 calves 1w old + 2X 6 cows B) 2X 5 donor calves + 2X 5 receiver calves	Culture + (feces or necropsy tissues), ELISA+ or ↑ INF-γ Animals kept until 43-48m of age	Culture ² , ELISA Pourquier ^d , INF-γ ⁱ ,
Ridge et al ²⁵	2005	Australia	Cross-sectional	All cows over 2 years tested annually/ 54 herds	ELISA + or clinical case of JD after 2 nd whole herd test	ELISA ^f
Muskens et al ²²	2003	Netherlands	Cross-sectional	All cows ≥ 3 year old/ 370 herds	≥ 1cow ELISA + in herd < 34 cows and ≥ 2 cows ELISA + in herd ≥ 34 cows = herd + ≥ 2 ELISA + cows per herd or 1 ELISA + cow with ≥ 5% culled with CS of JD = herd + ≥ 2 ELISA + cows = herd +	ELISA IDEXX ^e
Wells and Wagner ²⁹	2000	USA	Cross-sectional	31,745 cows/ 967 herds		ELISA IDEXX ^a
Johnson-Ifearulundu and Kaneene ²⁰	1998	USA	Case-control Cross-sectional	46 case herds-37 control herds		ELISA IDEXX ^g
Çetinkaya et al ¹⁵	1997	England	Cross-sectional	2,953 herds	Reporting a case in 1993 or in 1994	Not done
Obasanjo et al ³⁴	1997	USA	Cross-sectional	33 herds	One FC + = herd + Whole herd testing from 6 months to 2 years	HEYM

Table 1 (Continued)

Authors	Year	Country	Study Design*	Number Animals/ Herds (Study Unit in Bold)	Case Definition	Diagnostic Tests
Goodger et al ¹⁹	1996	USA	Cross-sectional	All cows from 24 herds	Herds already known to have MAP: 1 clinical case/year or ≥ 2 + FC in past year MAP apparent prevalence from ELISA + cows	ELISA IDEXX ^a
Collins et al ¹⁶	1994	USA	Cross-sectional	4,990 cows/ 158 herds	ELISA + = cow + One cow = herd + Random sample of adult milking cows, on herd size basis	ELISA ³
McNab et al ²¹	1992	Canada	Case-control	56 case herds-58 control herds	Herd mean LAM-ELISA OD and distribution of individual LAM-ELISA	LAM-ELISA

* Study design in accordance with description of the study in materials and methods not always according to author definition.

CS: Clinical Signs; DC: Dam Colostrum; FC: Fecal Culture; HEYM: Herrold's egg yolk medium; INF- γ : Interferon-gamma; JD: Johne's Disease; LAM-ELISA: Lipoarabinomannan enzyme-immuno-assay; OD: Optical Density; PC: Pasteurized Colostrum

^aIDEXX Herdchek ELISA; IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA

^bBIOCOR Paracheck ELISA; BIOCOR Animal Health Inc., Omaha, NE, USA

^cParachek, PRIONICS AG, Schlieren-Zurich, Switzerland

^dInstitut Pourquier, Montpellier, France

^eHerdcheck Mpt Ab, Idexx Skandinavia AB, Sweden

^fJohne's Absorbed EIA Kit; CSL, Parkville, Australia

^gIDEXX Laboratories, Portland, ME

^hBovigam, Prionics, Lincoln, NE

ⁱBovigram, CSL Ltd., Parkville, Australia

¹Nielsen SS. Variance components 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;49:384-387.

²Jorgensen JB. An improved medium for culture of Mycobacterium paratuberculosis from bovine faeces. *Acta Vet Scand* 1982;23:325-335.

³Yokomizo Y, Merkal RS, Lyle PA. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G1 antibody to a protoplasmic antigen of Mycobacterium paratuberculosis. *Am J Vet Res* 1983;44:2205-2207.

Table 2 Data extracted from the 23 articles for support to causal association and results of the study appraisal

Authors	Year	Herds Selection	Time lag between questionnaire and testing	Potential Bias	Internal Validity	External Validity
Correia-Gomes et al ¹⁷	2010	Random sample from program, stratified by municipalities	6 months for visits (Nov 03-April 04) Testing + questionnaire at same time	Misclassification	Low	Moderate
Ridge et al ²⁶	2010	Random selection, from Program	6 months for visits; testing over 18 years (May 90-March 08)	Misclassification	Moderate	Moderate
Ansari-Lari et al ¹²	2009	From 3 districts with more than 80% of dairies in the region	March to August 06	Misclassification	Moderate	Moderate
Norton et al ²⁴	2009	Farmers nominated by veterinarians	1999 No testing	Misclassification	Low	Moderate
Pithua et al ³²	2009	Endemic herds But randomization for calves	N/A	N/A	High	Moderate
Tiwari et al ²⁸	2009	Stratified 2-stages random sampling	Questionnaire during visits	Misclassification	Low	High
Benedictus et al ¹³	2008	N/A	N/A	N/A	High	Low
Cashman et al ¹⁴	2008	Not random, apparently free of endemic MAP	Testing Sept 01-Aug 03) Data from current (2003) and historical (1994-2002) practices	Recall	Moderate	Moderate
Dieguez et al ¹⁸	2008	Random, stratified by areas	First half of 2004	Misclassification	Low	High
Nielsen et al ³¹	2008	From program	Mailed March 07-reminder 1 month later (data from Jan 99-Dec 06)	Misclassification (try to minimize) Recall	Low	Moderate
Stabel ³⁰	2008	N/A Randomization of calves	N/A	N/A	High	Low
Tavornpanich et al ²⁷	2008	From clientele of a practice Typical of region (size, management)	Questionnaire Aug-Nov 01 Testing Jan-June 04 (2.5 years later)	Misclassification (but minimized by testing later)	Low	Low
Nielsen and Toft ²³	2007	Not random, part of a project Higher in size	Questionnaire from Aug 99-Dec 99 Testing 26 months later	Misclassification (but minimized by testing later)	Moderate	Moderate

Table 2 (Continued)

Authors	Year	Herds Selection	Time lag between questionnaire and testing	Potential Bias	Internal Validity	External Validity
Van Roermund et al ³³	2007	N/A	N/A	N/A	High	Low
Ridge et al ²⁵	2005	From program	Visits June-Nov 02 Testing since 96 or 97 in most herds	Misclassification	Low	Moderate
Muskens et al ²²	2003	Random	Questionnaire + Testing July-Oct 98	Misclassification	Low	High
Wells and Wagner ²⁹	2000	Stratified random sample	Questionnaire Jan-May 96 (practices currently used and 3 years prior)	Misclassification (try to minimize) Recall	Low	High
Johnson-Ifearulundu and Kaneene ²⁰	1998	Stratified, multi-stage sampling	Questionnaire (data from 1993) + Testing June-Dec 96	Misclassification (try to minimize) Recall	Low	High
Çetinkaya et al ¹⁵	1997	Random, stratified in 3 regions	Questionnaires mailed March-Sept 95; no testing	Misclassification	Low	High
Obasanjo et al ³⁴	1997	From program	Phone interviews July-Oct 93 Last herd testing Sept 89-April 93	Misclassification	Low	Low
Goodger et al ¹⁹	1996	Inclusion criteria, known to have MAP	Visits for testing Nov 92 – March 93 Visits for questionnaire 6-12 months later	Misclassification	Low	Low
Collins et al ¹⁶	1994	Random, stratified by herd size	Testing Oct 89-June 90; Questionnaires mailed (date unknow)	Misclassification	Low	High
McNab et al ²¹	1992	Stratified random	Not mentioned, questionnaire on-farm	Misclassification try to be reduced by asking changes in practices within the past 5 years, but create a recall	Low	High

Table 3 Manuscripts that studied risk factors concerning neonatal environment (question 1): results from univariate and multivariate analyses.

Authors	Risk Factors Examined	Univariate Analysis	Multivariate Analysis
Correia-Gomes ¹⁷	(1) CA: yes or no; (2) hours to separate dam-calf: ≤ 6h; 7-12h; > 12h	NS	Not included in final model
Ridge ²⁶	<u>CA</u> : Calving pad vs shed vs paddock	CA: $P = 0.259$	Calving in a paddock HR 2.94 (CI 1.289-6.708) or in a shed HR 6.61 (CI 1.693-25.786) increased risk of MAP transmission $P < 0.01$
Ansari-Lari ¹²	(1) Calves with dam > 3h; (2) Separate CA; (3) Contaminated udders of periparturient cows with manure	Udder contaminated with manure (3) $P < 0.2$	Contamination udders of periparturient cows with manure (3) OR 6.38 (CI 1.29-31.49) $P = 0.02$
Norton ²⁴	(1) Calf-dam contact after birth;	NS	CA included in model for biological importance but NS
Tiwari ²⁸	<u>CA/management</u> : (1) Time with dam; (2) Cleanliness of teat area; (3) Use for sick cows; (4) Location; (5) Number of cows*	More 1 cow in maternity pen (5) CR 1.5 (SE 0.26)	More 1 cow in maternity pen (5) CR 1.7 (CI 1.2-2.2) $P < 0.01$
Benedictus ¹³	CA contamination for calves born from MAP negative dam (Shedding/infected animals vs negative and unknown)	Calves between 3-13 days of age in a contaminated CA $P < 0.05$	ND
Cashman ¹⁴	(1) Calf-dam separation; (2) Calving attendance; (3) Time allowed to suckle their dam; (4) Pre-calving udder clipping	Probability of positive culture significantly reduced as % calving attended increased (2) $P < 0.05$	ND too small data set
Dieguez ¹⁸	(1) Separate CA; (2) Time of separation calf-dam; (3) Udder/teat washed before collection or calf suckling	NS	Not included in model
Tavornpanich ²⁷	(1) Time separation calf-dam; <u>CA</u> : (2) Separated from sick cows/lactating; (3) Frequency of bedding changes (4) Group vs separate pen	NS	Not included in model
Nielsen ²³	<u>CA</u> : (1) Used for sick cows; (2) No specific CA; (3) 7 aspect of CA hygiene	ND	Hygiene in feeding area (3) OR 2.70 (CI 1.04-6.8) for 3 rd best vs best Amount of straw in bedding (3) OR 3.0 (CI 1.21-8.1) for worst vs best
Ridge ²⁵	(1) <u>CA</u> : Calving pad vs shed vs paddock; (2) Time before calf removed from dam	ND	Calving in paddock decreased risk of MAP transmission (1) $P = 0.047$

Table 3 (Continued)

Authors	Risk Factors Examined	Univariate Analysis	Multivariate Analysis
Muskens ²²	(1) Separate CA; (2) $\geq 90\%$ cows calved in CA; (3) $\geq 90\%$ cows calved in clean CA; (4) Non-calving cattle in CA; (5) Calf removed from dam immediately	Separate calving area (1) $P = 0.06$; $\geq 90\%$ cows calved in CA (2) $P = 0.08$; Non-calving cattle in CA (4) $P = 0.05$	NS
Wells ²⁹	(1) With dam >24 h; (2) CA for sick cows; (3) Bedding for CA; (4) Group housing periparturient; (5) Teats and udder washed before colostrum collected or calves suckle	Group housing periparturient (4) $P = 0.01$	Group housing periparturient (4) OR 1.5 (CI 1.0-2.3) $P = 0.06$
Johnson-Ifearulundu ²⁰	(1) Separation (in hours) calf-dam; (2) Washing cows' teats and udder prior to parturition; <u>Maternity pen</u> : (3) Used for calving; (4) Used for sick cows; (5) Frequency of cleaning	(2) Washing teats and udder; (3) Maternity pen for parturition;	Washing udders before parturition (2) OR 8.66 (CI 1.87-40.08) $P = 0.006$
Çetinkaya ¹⁵	(1) <u>CA</u> (when cows at grass and when housed): outside, inside (group or individual); (2) Time calf with dam	(1) CA (grassed and housed) $P \leq 0.25$; (2) NS	(1) Calving: individual pen when cows at grass OR 0.21 (CI 0-0.93) $P = 0.04$ (2) Included in model for biological importance but NS
Goodger ¹⁹	(1) <u>Newborn calf care</u> : a) colostrum management: clean udder, clean bottles; b) removal from dam. (2) <u>CA</u> : a) individual, b) bedding, c) cleaning	Descriptive	Newborn calf care significantly associated with MAP apparent prevalence (1) $P = 0.001$ and interaction terms $P < 0.002$ $R^2 = 0.90$
Collins ¹⁶	(1) Calving location; (2) Separation dam-calf	(1) Calving location: summer $P = 0.11$; winter $P = 0.35$ (2) Calf-dam separation $P = 0.25$	NS
Mc Nab ²¹	(1) <u>CA</u> : calving pen, tie stall, free stall or lot, pasture; (2) <u>Contact newborn</u> : only dam, cows close to calving, adults not closed to calving	Descriptive	NS

CA: Calving Area; CI: 95% Confidence Interval; CR: Count Ratio; HR: Hazard ratio; ND: not done; NS: Not significant; OR: Odd Ratio; SE: Standard error

*Details of questionnaire obtained from the author, not in the manuscript

Table 4 Manuscripts that studied risk factors concerning colostrum (question 2): results from univariate and multivariate analyses

Author, Year	Risk Factors Examined	Univariate Analysis	Multivariate Analysis
Ansari-Lari ¹² Pithua ³²	Pooled Raw maternal (MC) versus plasma-derived commercial replacer (CC)	NS At all ages (ELISA+ or FC+): CC 7.6% (18/236) vs MC 11.9% (31/261) OR 0.523 (CI 0.272-1.003) <i>P</i> = 0.051	Not included in model Logistic regression both test all ages: OR 0.523 (<i>P</i> = 0.051) Weibull model both tests: HR: 0.559 (<i>P</i> = 0.056) Less likely to be MAP ELISA and culture + if pasteurized. NS Not included in final model
Tiwari ²⁸	(1) Pooled all cows; (2) pooled MAP neg. cows; (3) 4 types: fresh, frozen, fermented, heat treated*	NS	Not included in final model
Cashman ¹⁴	(1) Pooled; (2) multiple suckling	NS	ND to small data set
Dieguez ¹⁸	From MAP+ cows	<i>P</i> <0.001	OR 87.3 (CI 15.7-483.9) <i>P</i> <0.001
Nielsen ³¹	From multiple cows	Descriptive	From multiple cows OR 1.243 (CI 1.089-1.418); <i>P</i> = 0.0012
Stable ³⁰	Dam Colostrum (DC) versus pasteurized colostrum (PC)	ND	INF lower for PC vs DC at 5 months <i>P</i> <0.005
Tavornpanich ²⁷	Pooled (never, sometimes, always)	NS	Not included in final model
Muskens ²² Goodger ¹⁹	Not from dam <u>Newborn calf care:</u> Colostrum management: not pooled	NS Descriptive	Not included in final model High score for new born calf care significantly associated with MAP apparent prevalence (<i>P</i> = 0.001) + significant interactions NS
Mc Nab ²¹	(1) Pooled; (2) nurse dam	Descriptive	NS

CC: Commercial colostrum; CI: 95% Confidence Interval; FC: Fecal culture; HR: Hazard Ratio; MC: Maternal colostrum; ND: not done; NS: Not significant; OR: Odd Ratio

*Details of questionnaire obtained from the author, not in the manuscript

Table 5 Manuscripts that studied risk factors concerning milk (question 3): results from univariate and multivariate analyses.

Authors	Risk Factors Examined	Univariate Analysis	Multivariate Analysis
Correia-Gomes ¹⁷ Ridge ²⁶	Exclusively dam milk: yes or no Antibiotic and waste milk	NS $P = 0.132$	Not included in final model Protective effect of feeding antibiotic/waste milk HR 0.42 (CI 0.247-0.720) $P < 0.001$
Ansari-Lari ¹²	Unpasteurized milk	ND (all calves fed unpasteurized milk)	ND (all calves fed unpasteurized milk)
Norton ²⁴	(1) Penicillin milk; (2) nurse cows	NS	NS
Tiwari ²⁸	(1) Pooled all cows; (2) pooled MAP neg. cows; (3) astitic (clinic or high SCC) or antibiotic residue*	NS	Not in final model
Cashman ¹⁴	(1) Milk mixed with colostrum; (2) Pooled milk	NS	ND too small data set
Nielsen ³¹	(1) <u>Different sources milk</u> : a) replacer, b) bulk tank, c) pooled high SCC, d) bulk tank if insufficient milk high SCC; (2) Foster cows	Descriptive	Suckling foster cows (2) OR 2.012 (CI 1.37-2.956) $P = 0.0004$
Stabel ³⁰ Tavornpanich ²⁷	Milk from infected dam Unsalable milk	ND $P = 0.34$ (NS if $P \geq 0.2$) but in final model for biological importance	Not discussed Posterior probability for risk factor = 0,712 NS but ASSOCIATION
Ridge ²⁵	Replacer, whole, whole+colostrum, whole+antibiotic residues	Descriptive	Feeding 'antibiotic milk' $P < 0.001$ increased risk of MAP infection
Muskens ²²	Only fed milk replacer	$P = 0.04$ sero+ 25.2% vs sero- 15.7%	NS
Çetinkaya ¹⁵	Pooled, milk replacer	NS	Included in model for biological importance but NS
Mc Nab ²¹	Raw milk	Descriptive	Newborn calves to weaning fed no raw milk more in high-risk (case) herds $P = 0.02$

CI: 95% Confidence Interval; ND: not done; NS: Not significant; OR: Odd Ratio; SCC: Somatic cell count *Details of questionnaire obtained from the author, not in the manuscript

Table 6 Manuscripts that studied risk factors concerning group-housing of calves (question 4), results from univariate and multivariate analyses.

Authors	Risk Factors Examined	Univariate Analysis	Multivariate Analysis
Norton ²⁴	Individual vs Group	NS	Not included in final model
Tiwari ²⁸	For pre-weaned: group/individual pens, hutches (summer vs winter)	Group-housing in winter $P = 0.15$	Group-housing in winter CR 2.0 (CI 1.3-2.8) $P < 0.01$
Benedictus ¹³	Calf-to-calf transmission (exposure to futur high shedder) calves from test-neg dam and no contamination in calving area	4/14 infected were born within 90d after birth of future high shedder (X ² =12.7; $P = 0.0004$; Fisher 2-sided: $P = 0.0064$; OR 19.1) 3/4 born 30-90d after (X ² =6.91; $P < 0.0086$; Fisher 2-sided: $P = 0.036$; OR 9.7)	ND
Cashman ¹⁴	Individual calf pens	Individual pens=> odds milk sock filter culture + significantly lower $P < 0.05$ (OR 0.21; CI 0.04-1.0)	ND (too small data set)
Nielsen ²³	Calves <2 months: single pen or other	ND	NS
van Roermund ³³	Infection calf to calf	R (3months) = 0.9 (CI 0.1-3.2; one sided test H ₀ : $R \leq 1 \Rightarrow P = 0.64$; H ₀ : $R \geq 1 \Rightarrow P = 0.61$ (NS, but transmission possible)	ND
Wells ²⁹	Group housing for calves prior to weaning during preceding year	$P = 0.05$	$P = 0.04$ if grouped OR 1.5 (CI 1.0-2.3)
Johnson-Ifearulundu ²⁰	Individual calves hutches or not	NS	Not included in final model
Çetinkaya ¹⁵	Individual pens (never, first 30d, more 30d)	$P \leq 0.25$	NS
Collins ¹⁶	Calves housing before weaning (calf barn, hutches, pens in cow barn, other)	Calf housing before weaning $P = 0.33$	Not included in final model
McNab ²¹	Housing newborn calves to weaning: individual tied, indoor pens, outdoor hutch or pen	Descriptive	Heifer calves, weaning to 8m, individually tied in summer $P = 0.02$ (Not neonatal calves)

ND: not done; NS: Not significant; CR: Count Ratio; OR: Odd Ratio; CI: 95% Confidence Interval

Table 7 Manuscripts that studied risk factors concerning contact with adult cow feces (question 5): results from univariate and multivariate analyses.

Authors	Risk Factors Examined	Univariate Analysis	Multivariate Analysis
Correia-Gomes ¹⁷ Norton ²⁴	Pasture share with cows (1) Age at 1st contact with adult (2) Calves in hospital paddock	$P < 0.25$ Sometimes=Low incidence (OR 1.98; CI 1.25-3.15); frequently =High incidence (OR 4.53; CI 1.62-2.69)(2)	NS Paddock frequently = high incidence (2) OR 5.92 (CI 1.37-25.48)
Tiwari ²⁸	Equipment for manure and heifer feed	NS	Not in final model
Cashman ¹⁴	Slurry spread on calf pasture, calves grazed adult pasture (animal waste and hygiene management)	NS	ND too small data set
Dieguez ¹⁸	(1) <6months housed with adults (2) Fed pasture or herbage treated with manure	Housing with adult <6m (1) ($P < 0.001$); herbage with manure (2) ($P < 0.001$)	Replacement animals housed with adult cattle <6 months (1) ($P = 0.026$; OR 4.59 (CI 1.20-17.6)
Tavornpanich ²⁷	(1) Heifers $\leq 6m$ exposed to adult manure (2) Manure-handling equipment to feed (3) Lagoon	Manure-calves (1) $P = 0.09$ Manure-feed (2) $P = 0.19$ Lagoon (3) $P = 0.13$	NS Posterior probability: Manure- calves (1) 0.68; Manure-feed (2) 0.662; Lagoon (3) 0.680
Nielsen ²³	Calves <2 months separated from cows (Y vs N)	ND	NS
van Roermund ³³	Cow-calves transmission	MLE estimator for R (3 m) is 2.7 with CI 1.,1-6.6; one sided test $H_0: R \leq 1 \Rightarrow P = 0.019$ (H_0 rejected), $H_0: R \geq 1 \Rightarrow P = 0.99$	ND
Ridge ²⁵	Unweaned calves housing: adequately separated from adult cattle and their effluent		NS suggestive association between adequate separation of the calf shed from adult cattle, feces of adults or effluent and reduced BJD incidence $P = 0.07$
Muskens ²²	Age in months when calves no longer housed separately from adults	Average: sero- = 8.6 ± 8.7 ; sero+ = 10.2 ± 8.4 $P = 0.11$	NS
Wells ²⁹	Heifers <12m: (1) Common feed or water sources with adult (2) Equipment to handle manure and their feed	Heifers <12m sharing feed/water with adults was associated with JD status (1) but inverse direction...spurious association	Not included in model

Table 7 (Continued)

Authors	Risk Factors Examined	Univariate Analysis	Multivariate Analysis
Johnson-Ifearulundu ²⁰	Common equipment for feed and manure; common feed and water source between calves and adults; feed for calves on fields manure spread	$P \leq 0.95$ and 70 or more observations for 3 factors so offered to multiple regression	NS
Obasanjo ³⁴	(1) Exposure calves 0-6weeks to adults feces (2) Young stock contact adult feces from same equipment used for clean (3) Feces spread on forage fed to any age group	(1) OR 8.3 (CI 1.4-47.5); (2) OR 6.4 (CI 1.0-38.8); (3) OR 10.3 (CI 1.8-60)	Any practice leading to exposure of calves 0-6 weeks to feces of adult cows (1) OR 30.5 (1.2-808.7)
Goodger ¹⁹	(1) Milk-fed calf care=pens void of adult manure (2) Manure handling=young stock not near adult manure, barn cleaner not near calves, manure equip. for feeding	Descriptive	$R^2=0.90$; high score for manure handling significantly associated with MAP apparent prevalence (2) (main effect $P < 0.001$ & interactions terms significant)

CI: 95% Confidence Interval; ND: not done; NS: Not significant; OR: Odd Ratio;

Discussion

Based upon the present systematic review, contact with adult cow feces appears to be the most important risk factor for MAP transmission. Contact of calves with feces from adult cows was a risk factor for MAP transmission with high odds ratio (range, 4.59-30.5). Contact with adult cow feces represented a specific question, but appeared to be addressed by a surrogate variable in other questions. Calving environment, colostrum, milk or housing might be a surrogate measure of fecal contamination. For example, it was found that suckling of foster cows (question 3: milk) increased the risk of being MAP infected. In this situation, the exact role of MAP (milk or feces on the teats) can't be determined with certainty. Another example is question 5, concerning the neonatal environment. Most of the risk factors were closely related to fecal contamination (hygiene), for example, cleanliness of the calving area and udder washed before collection of colostrum.

The source of colostrum or milk as a risk factor for MAP transmission appeared to be of less relevance because most of the studies with moderate or high support for a causal association did not find an association between these risk factors and MAP transmission. There were 3 studies designed specifically to examine the impact of colostrum source. Of the 2 studies classified as high in the study appraisal, 1 did not find a significant association between ingestion of maternal colostrum and risk of MAP transmission³² and the other 1 found only an increase in INF- γ in DC calves.³⁰ The 3rd study, classified as low in the study appraisal, found an increased risk of MAP transmission when colostrum from multiple cows was fed but with a small OR of 1.243 (95% CI: 1.089-1.418).³¹

The most common study design used was cross-sectional study. This type of observational study provides little evidence of causality and is considered moderately relevant to 'real-

world' situations.³⁵ When a management practice is identified to be more prevalent in MAP infected herds, it does not provide any evidence that it is a risk factor involved in MAP transmission. Also important, there is no certainty that the risk factor was present before the exposure to MAP in cross-sectional studies. The same applies to case-control studies. Wells and Wagner²⁹ studied not only associations between risk factors and herd status for Johne's disease but also associations with the herd manager's familiarity with Johne's disease and the prior diagnosis of Johne's disease in a herd. In herds where managers were familiar with Johne's disease, the cows were 1.5 times more likely to have their teats and udder washed before colostrum was collected or the calf was allowed to suckle, compared with herds where managers were not familiar with the disease. Also, in herds with a previous diagnosis of Johne's disease, newborn calves were 3.4 times more likely to be separated from the dam less than 1 hour after birth compared to herds where the disease was not previously diagnosed. This may explain why some studies found associations that seemed opposite to what might be expected according to common knowledge. In cohort studies, where the risk factor or exposure is recorded before disease occurs, an inverse association can be found if the cohort is not followed long enough, because Johne's disease has a very long incubation period.⁶ This can be especially true for retrospective or historical cohort studies in which recalling historical management practices can be very subjective and a source of recall bias.

Ridge published 2 different studies on herd management practices and transmission of Johne's disease in dairy herds in Victoria, Australia.^{25,26} The relation between some management practices and Johne's disease transmission in the herds differed between the 2 studies. For example, in the 2005 study, feeding waste milk to calves was a significant risk factor for Johne's transmission, but surprisingly, was found to be a protective factor in the

2010 study. The first survey to assess calf rearing practices was done in 2002 and the second 1 between July 2005 and January 2006. The herd status for MAP (clinical cases or ELISA positive cow) was updated in March 2008. The author stated that between the 2 surveys, several changes had been made concerning calf management practices. Once again, because of the long incubation period of Johne's disease, a herd that was being fed waste milk in the past could find infected cows several years after the management practice was discontinued since a cow may develop the disease several years later. In this case, a selection bias is possible in terms of the survey constructs with regard to the farmers knowing the status of the herd and adjusting their behaviours according to their status.

Systematic review is the study design that gives the strongest level of evidence.³⁶ The search method and criteria for inclusion are transparent and repeatable. In this study, gathering information from good primary studies allows summarizing knowledge to answer questions on a specific topic. We searched a major medical database and an additional agricultural database that only added 2 different papers to the review. Some studies never get published, and the language of publication can be a barrier for accessing the results. We searched for studies written in 3 different languages and only found relevant studies written in English. Studies that found significant results are more likely to get published and may be published in peer-reviewed journals. So, we might have created a bias toward studies that found significant results. Also, because of the timelines of a systematic review, we did not search non-peer reviewed journals and proceedings from conferences.³⁷

Most systematic reviews focus on only 1 research question. We decided to study 5 different questions concerning risk factors for MAP infection of dairy calves in order to cover all of the different possibilities of MAP transmission. It might have been less laborious to review the

literature with only 1 specific question, but we may not have identified the close relationship between risk factors. Moreover, we would have minimized the importance of contact with adult cow feces in MAP transmission because that risk factor was identified by many questions as discussed previously.

Information concerning the different risk factors of MAP transmission to calves was summarized qualitatively. With this systematic review, it was not possible to compile quantitative data of the different studies and conduct a meta-analysis. Different study designs were used, the case definition for a MAP-positive cow or MAP-positive herd was variable, the diagnostic tests to detect a MAP infection differ and finally, the statistical analysis of the data varied. For all of these reasons, a meta-analysis was not realistically feasible. Instead, we decided to classify qualitatively the studies according to the strength of the causal association between risk factor and MAP using a checklist of 3 different criteria. Although we attempted to make this appraisal repeatable, such classification remains subjective and can be viewed as a potential bias because systematic reviews are meant to be objective studies. On the other hand, it enables us to weigh the results, significant or not, in the different studies.

Paratuberculosis was first diagnosed in 1885, in Germany and the first report in North America was in 1908, in Pennsylvania, USA.³⁸ For almost a hundred years, studies were focused on understanding the pathophysiology of the disease. Interestingly, studies relevant to any of the 5 questions were published only in the past 20 years. Epidemiology and risk factor studies are relatively recent science. Although multiple studies have been done to find risk factors involved in MAP transmission, to our knowledge, this is the first systematic review on risk factors associated with transmission of MAP to calves.

From this study, we can conclude that the contact of calves with adult cow feces is the most important risk factor for MAP transmission, as all 5 questions studied were addressing the fecal-oral route of transmission.

Acknowledgments

The 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.

References

1. Streeter RN, Hoffsis GF, Bech-Nielsen S, et al. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am J Vet Res* 1995;56:1322-1324.
2. Sweeney RW, Whitlock RH, Rosenberger AE. *Mycobacterium paratuberculosis* Cultured from Milk and Supramammary Lymph-Nodes of Infected Asymptomatic Cows. *J Clin Microbiol* 1992;30:166-171.
3. Taylor TK, Wilks CR, Mcqueen DS. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the Milk of a Cow with Johnes Disease. *Vet Rec* 1981;109:532-533.
4. Whittington RJ, Windsor PA. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. *Vet J* 2009;179:60-69.
5. Windsor PA, Whittington RJ. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Vet J* 2009.
6. Whitlock RH, Buergelt C. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1996;12:345-356.
7. Collins MT, Gardner IA, Garry FB, et al. Consensus recommendations on diagnostic testing for the detection of paratuberculosis in cattle in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 2006;229:1912-1919.
8. Groenendaal H, Nielen M, Hesselink JW. Development of the Dutch Johne's disease control program supported by a simulation model. *Prev Vet Med* 2003;60:69-90.
9. Groenendaal H, Nielen M, Jalvingh AW, et al. A simulation of Johne's disease control. *Prev Vet Med* 2002;54:225-245.
10. Sargeant JM, Amezcua MDR, Rajic A, et al. A Guide to Conducting Systematic Review in Agri-Food Public Health: Public Health Agency of Canada, Guelph, Ontario. Available at <http://www.angelfire.com/co4/civph/english.pdf> 2005;84.
11. Sanderson RO, Beata C, Flipo RM, et al. Systematic review of the management of canine osteoarthritis. *Vet Rec* 2009;164:418-424.
12. Ansari-Lari M, Haghkhah M, Bahramy A, et al. Risk factors for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Fars province (Southern Iran) dairy herds. *Trop Anim Health Prod* 2009;41:553-557.

13. Benedictus A, Mitchell RM, Linde-Widmann M, et al. Transmission parameters of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in a dairy herd going through a control program. *Prev Vet Med* 2008;83:215-227.
14. Cashman W, Buckley J, Quigley T, et al. Risk factors for the introduction and within-herd transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) infection on 59 Irish dairy herds. *Ir Vet J* 2008;61:464-467.
15. Cetinkaya B, Erdogan HM, 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.
16. Collins MT, Sockett DC, Goodger WJ, et al. Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for, bovine paratuberculosis in Wisconsin. *J Am Vet Med Assoc* 1994;204:636-641.
17. Correia-Gomes C, Mendonca D, 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.
18. Dieguez FJ, Arnaiz I, Sanjuan ML, et al. Management practices associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection and the effects of the infection on dairy herds. *Vet Rec* 2008;162:614-617.
19. 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.
20. Johnson-Ifeorlundu YJ, Kaneene JB. Management-related risk factors for *M. paratuberculosis* infection in Michigan, USA, dairy herds. *Prev Vet Med* 1998;37:41-54.
21. McNab WB, Meek AH, Martin SW, et al. Associations between lipoarabinomannan enzyme-immuno-assay test results for paratuberculosis and farm-management factors. *Prev Vet Med* 1992;13:39-51.
22. Muskens J, Elbers ARW, Weering HJv, et al. Herd management practices associated with paratuberculosis seroprevalence in Dutch dairy herds. *J Vet Med Ser B* 2003;50:372-377.
23. Nielsen SS, 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.
24. Norton S, Heuer C, Jackson R. A questionnaire-based cross-sectional study of clinical Johne's disease on dairy farms in New Zealand. *N Z Vet J* 2009;57:34-43.

25. Ridge SE, Baker IM, Hannah M. Effect of compliance with recommended calf-rearing practices on control of bovine Johne's disease. *Aust Vet J* 2005;83:85-90.
26. Ridge SE, Heuer C, Cogger N, et al. Herd management practices and the transmission of Johne's disease within infected dairy herds in Victoria, Australia. *Prev Vet Med* 2010;95:186-197.
27. Tavoranpanich S, Johnson WO, Anderson RJ, et al. Herd characteristics and management practices associated with seroprevalence of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* infection in dairy herds. *Am J Vet Res* 2008;69:904-911.
28. 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.
29. Wells SJ, 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.
30. Stabel JR. Pasteurization of colostrum reduces the incidence of paratuberculosis in neonatal dairy calves. *J Dairy Sci* 2008;91:3600-3606.
31. Nielsen SS, Bjerre H, Toft N. Colostrum and milk as risk factors for infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2008;91:4610-4615.
32. Pithua P, Godden SM, Wells SJ, et al. 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.
33. van Roermund HJ, Bakker D, Willemsen PT, et al. Horizontal transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in an experimental setting: calves can transmit the infection to other calves. *Vet Microbiol* 2007;122:270-279.
34. Obasanjo I, Grohn YT, 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.
35. Dohoo I, Martin W, Stryhn H. *Veterinary Epidemiologic Research*. 2nd Edition ed. Charlottetown, P.E.I.: VER Inc, 2010.
36. Holmes MA. Evaluation of the evidence. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2007;37:447-462.

37. Lean IJ, Rabiee AR, Duffield TF, et al. Invited review: Use of meta-analysis in animal health and reproduction: Methods and applications. *J Dairy Sci* 2009;92:3545-3565.
38. Behr MA, Collins DM. *Paratuberculosis : organism, disease, control*. Wallingford, UK/Cambridge, MA: CABI; 2010.

Chapitre 3 : Evaluation of environmental sampling to predict *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* prevalence in Québec tie-stall dairy herds

Article soumis au Journal of Dairy Science

E. Doré*, J. Paré†, G. Côté‡, S. Buczinski*, J.-H. Fairbrother§, O. Labrecque§, S. Rangel*, J.-P. Roy*, G. Fecteau*

*Département de sciences cliniques, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

†Agence Canadienne d'Inspection des Aliments, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

‡Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, Québec, QC, Canada

§Laboratoire d'épidémiosurveillance animale du Québec, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

Running Head: **MAP ENVIRONMENTAL SAMPLES IN TIE-STALL HERDS**

Présentation du résumé de recherche au congrès de l'association canadienne d'épidémiologie et de médecine préventive vétérinaire, Saint-Hyacinthe, Québec, mai 2011 au 30th American College of Veterinary Internal Medicine Forum, Nouvelles-Orléans, Louisiane, Juin 2012.

Contribution à l'article de chacun des auteurs.

E. Doré: Élaboration du protocole de l'étude. Analyse des résultats de culture de MAP. Écriture de l'article. J. Paré : Aide à l'analyse des résultats et à l'écriture de l'article. G. Côté : Révision de l'article. Responsable de programme de contrôle et de prévention de la paratuberculose au Québec. S. Buczinski : Révision de l'article. J.-H. Fairbrother : Élaboration du protocole de culture de MAP en milieu solide afin de faire le dénombrement des colonies. Révision de l'article. O. Labrecque : Élaboration du protocole de culture de MAP en milieu liquide. Révision de l'article. S. Rangel : Étude de l'utilisation du PCR lors du diagnostic de MAP par la culture. J.-P. Roy : Révision de l'article. G. Fecteau : Aide à l'analyse des résultats et à l'écriture de l'article.

INTERPRETIVE SUMMARY

Estimation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* prevalence in tie-stall dairy herds using environmental samples

By Doré et al. The relationship between the detection of positive environmental culture of MAP and the prevalence of individual fecal shedding in Québec tie-stall dairy herds was studied. As the number of positive cultures of environmental samples increased, the prevalence of individual fecal shedding increased. Environmental sampling is an effective diagnostic method that might allow detection of positive tie-stall herds and provides an estimate of fecal shedding prevalence.

Key words: paratuberculosis, environment, dairy cattle, tie-stall

ABSTRACT

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) causes Johne's disease, a chronic and incurable enteric disease of ruminants. Culture of environmental samples is an effective diagnostic method to evaluate the presence of MAP in a herd. The objective of this study was to evaluate the relationship between the number of environmental samples positive for MAP and the prevalence of individual fecal shedding in Québec tie-stall dairy herds.

Tie-stall dairy herds known to be infected with MAP were selected for the study (n=13). An individual fecal sample was taken on all cattle 24 months and older. Environmental samples from 3 different sites were taken in duplicate during the same visit. All samples were first cultured using the BD BACTEC™ MGIT™960 system. Samples positive with this technique were cultured on HEYM to determine MAP colony count. Spearman Rank correlation was used to estimate the correlation between the prevalence of individual fecal shedding of MAP and the proportion of positive environmental samples. In four herds, MAP was neither detected in the environment nor in individual fecal cultures. In five herds, MAP was not detected in the environment but was detected in individual fecal cultures (prevalence between 1.6 and 3.8%). The other four herds had at least one positive environmental samples and an estimated prevalence that ranged between 6.3% and 31.1%, based on individual fecal cultures. The number of positive cultures of environmental samples was associated with the prevalence of individual fecal shedding of MAP in tie-stall dairy herds. Time to detection of an individual fecal sample by the BD BACTEC™ MGIT™960 system appeared to be an interesting indicator of MAP bacterial load. Environmental sampling is a diagnostic method that might allow detection of tie-stall herds positive for MAP and provide an estimate of fecal shedding prevalence.

INTRODUCTION

Paratuberculosis or Johne's disease is a chronic enteric disease affecting ruminants worldwide. The causative agent is *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). The importance of this disease is due to the economic losses and the zoonotic potential of MAP. Economic losses are associated with decreased milk production (Hendrick et al., 2005b; Lombard et al., 2005; Beaudeau et al., 2007), premature culling (Lombard et al., 2005; Raizman et al., 2009; Smith et al., 2010) and reduced carcass yield (Raizman et al., 2009). MAP has been associated with Crohn's disease in humans but has not been proven to be the causative agent (Waddell et al., 2008; Davis and Madsen-Bouterse, 2012).

The long incubation period of 2 to 10 years (Whitlock and Buergelt, 1996) and the intermittent fecal shedding make early diagnosis difficult. Indeed, efforts to control this disease in dairy herds cannot only rely on test and cull strategies but most importantly, on implementation of good heifer husbandry practices (Ridge et al., 2010; Garry, 2011).

MAP can survive for long period outside its host. For example, MAP survived 246 days (35 weeks) in naturally infected cow feces kept outdoors (Lovell et al., 1944) and the sheep S strain survived 385 days (55 weeks) in a dry, fully shaded environment (Whittington et al., 2004). Whitlock et al. (1992) reported for the first time the contamination of the environment in dairy farms by MAP in a field study. In the past few years, several studies have shown that culture of environmental samples can be used to determine MAP herd status (Raizman et al., 2004; Berghaus et al., 2006; Lombard et al., 2006; Aly et al., 2009; Pillars et al., 2009b). The recommended strategy for the determination of the infection status of dairy herds is to perform environmental cultures (Collins et al., 2006).

Raizman et al. (2004) have found an association between the colony counts of environmental sample cultures and the estimated prevalence of fecal shedding. In herds where the cow alleyways and manure storage areas were both negative on culture, the prevalence was estimated between 0.3 and 4%. In herds where both sites demonstrated a high number (heavy load) of MAP colonies (mean ≥ 50 colonies/tube), prevalence of fecal shedding was estimated between 53 and 73%. Berghaus et al. (2006) have shown that the proportion of ELISA-positive cows was significantly correlated with the proportion of positive environmental sample cultures.

In the province of Québec, Canada, average herd size is 60 cows and 92.1% of the dairy herds are tie-stalls (Canada, 2011). Average herd size was 217 cows in the study by Raizman et al. (2004) who examined 62 free-stall and 46 tie-stall herds, and 680 cows in the study by Berghaus et al. (2006) who examined 23 free-stall herds. There is a need to investigate association between bacterial load or proportion of positive environmental sample cultures and prevalence of MAP in smaller tie-stall herds. Another particularity of Québec dairy herds, when compared to United States herds where most of the studies on environmental sampling have been realized, is the absence of lagoon system to recycle waste water and dispose of manure. The manure is placed in a manure pit and, less frequently in a manure pile. In 2002, 12.1% of Quebec dairy herds had at least two seropositive cows to paratuberculosis (Côté G. INSA/CQIASA/MAPAQ. 2003: 23pp)

We hypothesized that bacterial contamination of MAP in the environment (number of positive sites) is correlated with the prevalence of fecal shedding of MAP (prevalence of positive individual fecal culture and bacterial load) in Québec tie-stall dairy herds.

The objective of this study was to determine the relationship between the detection of MAP in the environment and the prevalence of fecal shedding in Québec tie-stall dairy herds. Secondary objectives were 1) to describe the relationship between the bacterial load of MAP in individual fecal cultures and results of environmental cultures and 2) to determine whether the time for detection of a positive sample on liquid medium correlated with the bacterial load assessed by the colony count on solid medium.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

Tie-stall dairy herds included in the study were recruited amongst the herds enrolled in the Québec Paratuberculosis Voluntary Control Program (“Programme volontaire de prévention et de contrôle de la paratuberculose au Québec”). Inclusion criteria was to be a herd infected with MAP in the past 18 months, as determined by bacteriologic culture of the agent, either from an environmental or an individual sample or from a necropsy. All herds with these criteria and willing to participate in the study were recruited. Herds where the only diagnostic method used was serum or milk ELISA were excluded from this study.

Sample Collection

During the same visit, individual fecal samples and environmental samples were collected by the attending veterinarian. Each sample was stored in a plastic container at 4°C and shipped to the provincial animal diagnostic laboratory (Laboratoire d'épidémiosurveillance animale du Québec) within 48 hours. Two grams of each sample was weighed and stored at -70°C until tested.

Individual fecal samples (IFS): All cows older than 24 months were sampled, except for dry cows out on pasture at the time of the farm visit. Fecal samples were collected directly from the rectum using lubricant and a new rectal sleeve for each cow.

Environmental Sampling (ES): Environmental samples were collected according to the protocol used in the Québec control program which was inspired by the protocol recommended by the USDA¹. Briefly, the veterinarians received written instructions to

¹ (http://ahdc.vet.cornell.edu/docs/Johnes_Disease_Program_Sampling_and_Testing.pdf)

collect 2 environmental samples from 3 different sites, for a total of six samples on each farm. The first site corresponded to an area where manure from the majority of adult cattle accumulates (e.g. gutter, gutter cleaner). The second site was a manure storage area (e.g. manure pit, manure pile, temporary manure storage area) and the third site was another manure concentration area chosen by the veterinarian (e.g. dry cow pen, fresh cow pen). Each composite sample consisted of 4 subsamples per location. Approximately 20 grams per sample were submitted.

Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Liquid culture: Environmental and individual fecal samples were processed according to the 3 day procedure for detection of MAP in the BD BACTEC™ MGIT™960 system (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA), as recommended by the manufacturer. ([www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L0009181\(200911\).pdf#page=2&view=Fit](http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L0009181(200911).pdf#page=2&view=Fit)).

Day 1: After thawing for 30-60 minutes at room temperature, 2 g of feces of environmental samples were added to 17.5 mL of sterile water, mixed thoroughly and kept at room temperature for 30 minutes. The supernatant (2.5 mL) was added to 2.5 mL of 15% yeast extract and 0.2 mL of 10% sodium pyruvate, mixed thoroughly, and incubated 90 minutes at 35-37 °C. This fecal preparation was added to 25 mL of brain heart infusion broth containing 0.9% hexadecylpyridinium chloride and 0.3 mL of 5% green malachite solution. The suspension was incubated overnight (18-24 hours) at 35-37°C.

Day 2: After centrifugation at 900 x g for 30 minutes, the supernatant was discarded. The pellet was resuspended in 1 mL of an antibiotic solution containing 100 µg/ml of vancomycin,

100 µg/ml of nalidixic acid and 25 µg/ml of amphotericin B. The suspension was incubated overnight (18-24 hours) at 35-37 °C. Tubes of MGIT Para TB, containing a fluorescence indicator and Middlebrook 7H9 modified broth with Mycobactin J, were supplemented with 1.5 mL of an additive cocktail containing Para TB supplement (bovine albumin, catalase, casein and oleic acid), vancomycin, nalidixic acid, amphotericin B, egg yolk and sterile deionized water. The tubes were kept overnight at room temperature.

Day 3: The concentrated sample suspensions prepared on day 2 were mixed and 0.1 mL of each suspension was inoculated in a supplemented MGIT Para TB tube which was inserted in the BD BACTEC™ MGIT™960 and incubated for up to 49 days. The time, in days, required for detection of a positive individual fecal sample was recorded. The remaining concentrated suspension was frozen at -70 °C.

The only difference in the treatment of environmental and individual fecal samples was the concentration of antibiotics used in the additive cocktail. The concentration of nalidixic acid was higher (200 µg/mL; 10 times more) for environmental samples.

A smear for acid-fast bacteria using a fluorescence technique with auramine-rhodamine was performed on each positive sample signaled by the BD BACTEC™ MGIT™960 to confirm the presence of acid-fast bacteria in the cultured samples. The acid-fast bacteria seen on the smear were confirmed to be MAP using the TaqMan®MAP PCR.

Samples that signaled positive in the BD BACTEC™ MGIT™960 for which no acid-fast bacteria were seen on the acid-fast smear were declared contaminated. For all contaminated samples (n=188), the content of the supplemented MGIT Para TB tube that was kept frozen at -70 °C since the day it was signaled positive in the BD BACTEC™ MGIT™960, was eventually examined using TaqMan®MAP PCR.

All samples confirmed to be MAP by the PCR were classified as positive. All other samples were classified as negative.

Colony counts: All liquid cultures for MAP confirmed as positive for MAP by acid-fast staining and PCR were cultured on Herrold's egg yolk medium (HEYM) to estimate the MAP colony count. After thawing at $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 0.1 mL (100 μL) of day 2 treated fecal samples were inoculated in each of 4 tubes of HEYM supplemented with mycobactin J, nalidixic acid, vancomycin and amphotericin B, and in one tube without mycobactin J. A positive control was also inoculated. The tubes were incubated at $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 12 weeks. The tubes were kept in a slanted position and the caps were left unsealed until the liquid appearance on the slant disappeared (1 or 2 weeks). Then, the caps were sealed and the tubes placed in an upright position. MAP colonies are small, white and shiny. These colonies were counted, up to 75 colonies per tube, once fully grown at 8 and 12 weeks. Result of the colony count were recorded for each tube as no growth (NG); contaminated (fungi) or colony count. The samples were classified according to the tube with the highest colony count as no growth (if all 4 tubes had no growth), contaminated (if all 4 tubes had fungi growth which prohibited MAP colony count), low (1-10 colonies), moderate (11-75 colonies) or heavy (more than 75 colonies). The same classification was used for individual and environmental samples.

Statistical Analysis

Descriptive statistics were performed. A Spearman Rank correlation test was used to estimate the correlation between the prevalence of individual fecal shedding and the number of positive environmental samples using Excel (Microsoft Office, 2007). Other analyses were performed using EpiTools epidemiological calculators (Sergeant, 2012). A χ^2 Fisher exact test was used to determine the association between the presence of heavy shedder in a herd and

environmental contamination. A non-parametric test (Kruskal-Wallis) was used to compare the different category of results for the colony counts with time to detection of a positive sample by the BACTEC™ MGIT™960. Statistical significance was determined at $P < 0.05$.

RESULTS

A total of 13 tie-stall dairy herds were sampled between March and July 2010. Eleven different veterinarians were involved. The delay between initial diagnosis of MAP in the herd and sampling for the present study varied from 2.5 to 13 months (median: 3.5; mean: 6.3 months). The number of cows older than two years in each herd varied from 26 to 140 (median: 67; mean: 70). Estimated prevalence of fecal shedding per herd varied from 0 to 31.1% (median: 2.9%; mean: 5.4%). Four herds demonstrated respectively 1/6, 2/6, 4/6 and 5/6 positive environmental samples and an estimated individual fecal prevalence of 10.4%, 6.3%, 7.7% and 31.1% (Table 1). In five herds, MAP was not detected in the environment but was detected in individual fecal cultures (prevalence between 1.6 and 3.8%). In four herds, MAP was neither detected in the environment nor in individual fecal cultures. A significant correlation was identified between the proportion of positive environmental cultures and the proportion of positive individual fecal culture ($P < 0.001$).

Among 77 environmental samples, MAP was isolated in 4/18 samples from the manure pit, 3/15 from the gutter cleaner, 2/16 from the gutter, 1/4 from the fresh cow pen, 1/1 from the outside pen, 1/5 from the temporary manure storage area, 0/6 from the dry cow pen and 0/1 from the sick cow pen. The temporary manure storage area sample found positive for MAP, was detected by PCR but the culture was contaminated. None of 11 samples for which the specific site of sampling was not indicated (2 from a manure storage site and 9 from a manure concentration site) was positive for MAP on culture.

Cultures on HEYM medium revealed 21 individual fecal samples positive for MAP out of the 32 (66%) found positive for MAP with the BD BACTEC™ MGIT™960 (3 were lost to

contamination). Important variation was noted in the colony counts of the 4 tubes for each sample, in some cases with counts varying from 0 to >75 colonies for the same sample.

In all 4 herds in which MAP was detected in environmental samples, at least one individual fecal sample had a heavy bacterial load (Table 1). In 2 herds where no MAP was isolated from environmental samples, an individual fecal sample with a heavy load of MAP was also present. A significant association between the presence of a heavy bacterial load in an individual fecal sample and environmental detection of MAP was detected with a Fisher's exact test ($P = 0.02$).

The relationship between the time to detection of a positive individual fecal sample by the BD BACTEC™ MGIT™960 and the colony counts results are presented in Figure 1. Time to detection of an individual fecal sample with a heavy load of MAP was significantly lower ($P < 0.05$) than any other bacterial load category.

The PCR performed on 188 contaminated samples (181 IFC, 7 ES) revealed six new positive samples for MAP DNA. Five were from individual fecal sample and one was from an environmental sample (temporary manure storage area). Because positive cultures were not available, the colony counts were not done on these six samples.

DISCUSSION

Results of this study suggest that the number of positive cultures of environmental samples is associated with MAP herd prevalence in tie-stall dairy herds. Culture of environmental samples appeared to be a useful diagnostic test to identify infected herds with a prevalence of fecal shedders at or above 6.3%. The 9 herds with a prevalence of fecal shedding at or below 3.8% had no environmental sample positive for MAP in this study. In a longitudinal study over 5 years, Pillars demonstrated that in herds with a prevalence of fecal shedding below 2%, environmental samples positive on culture for MAP were never observed (Pillars et al., 2009a). The environment of herds with a low prevalence of fecal shedding might be contaminated by MAP but the intensity of contamination is below the detection threshold. If MAP is present in low quantity, the probability to sample it with environmental sampling would be lower than in an environment highly contaminated with MAP. Herds with an environment highly contaminated with MAP and a high prevalence of fecal shedders are at greater risk of MAP transmission (Sweeney et al., 2012) and suffer greater economic losses from the disease (Smith et al., 2010). These are the herds that should be identified as MAP positive in priority and the culture of environmental samples appears to be a good screening test for these herds.

In all 13 herds, the presence of MAP had previously been confirmed. In four herds, MAP was not cultured from environmental samples nor from individual fecal samples. This could be explained by a lack of sensitivity of environmental and individual sample cultures to diagnose MAP in low prevalence herds. The sensitivity of the environmental samples culture was evaluated to be of 40% (95% confidence interval (CI): 26-54%) in a study using individual fecal sample as the reference test (Smith et al., 2011). The sensitivity of the radiometric fecal

culture in low prevalence herds, when compared to the tissue culture as the gold standard, was only 19% and in high prevalence herds was 53% (Sockett et al., 1992). The specificity of fecal culture for MAP, however, is reported to be nearly 100% (Whitlock et al., 2000). The lack of detection in previously confirmed MAP infected herds may also be due to some variability in the status of a herd over time. Indeed, 8 herds previously identified as infected by environmental sampling had negative environmental cultures at the time of this study. Moreover, 4 of these were also negative in all individual fecal cultures. The current study design did not allow accounting for purchase and sale of cattle. In Québec in 2009, the culling rate was 32% (http://www.agrireseau.qc.ca/bovinslaitiers/documents/valacta_lplq_2011-03_Remplacer%20co%C3%BBte%20cher.pdf). It is possible that a cow excreting large quantities of MAP was responsible for the environmental contamination observed in the past and sold before sampling for this study was done. However, results indicate that there is an important variation in detection through environmental sampling and that repeat sampling may alleviate these discrepancies. Further studies on repeated environmental sampling are necessary to establish the optimal frequency of sampling to monitor the disease status of a herd.

It is interesting to note that herds in this study participate in a voluntary control program that instructed them good husbandry practices to follow in order to decrease MAP transmission. The control program was launched in November 2007 and the sampling for this study, occurred in 2010. The long course of the disease makes it difficult to measure the impact of changes in husbandry practices that might have been put in place in these herds.

Results suggest that detection of MAP in the environment may indicate the presence of a heavy shedder in the herd. Despite the few herds included in the study, a significant

association was found between the presence of a heavy fecal shedder and the detection of MAP in the environment. However, presence of a heavy fecal shedder was also possible (2/5) when MAP was not cultured from environmental samples. These findings suggest that herds with positive environmental samples may aim to decrease their risk of transmission by identifying cattle shedding MAP in their feces and subsequently cull these from the herd. The amount of MAP fecal shedding may be quantified to identify the heavy shedders. It is recommended to cull immediately heavy shedders in order to decrease environmental contamination and the risk of MAP transmission to other animals (Sweeney et al., 2012).

Cultures on HEYM medium revealed 21 individual fecal samples positive for MAP out of the 32 (66%) found positive for MAP with the BD BACTEC™ MGIT™960 (3 were lost to contamination). For those positive on HEYM, a high within sample variability was also observed between the four tubes colony counts. Culture on solid medium is known to be less sensitive than culture on liquid medium. In a study comparing culture methods (Eamens et al. (2000), the HEYM medium detected 26 positive fecal samples out of 38 (68%) and the radiometric method in the BACTEC™ 460 detected 34 out of 38 (89%). Culture on HEYM medium is also longer (12 weeks) than the culture in the BD BACTEC™ MGIT™960 system (7 weeks). To diagnose an animal shedding MAP in his feces, the BD BACTEC™ MGIT™960 system is more sensitive and faster, but culture on HEYM medium allows enumerating MAP colonies to determine the amount of shedding. The usefulness of evaluating the amount of MAP shedding by cows is to cull them strategically as described above.

A faster and less expensive way to identify heavy shedders is possible without using solid HEYM medium for culture. Time to detection of a positive sample by the BD BACTEC™ MGIT™960 system can be used as an indicator of bacterial load. The mean time to detection

was lower for heavy bacterial load than for all other samples. A similar correlation between colony forming units and time to detection of a positive sample by the BD BACTEC™ MGIT™960 system was demonstrated in another study (Shin et al., 2007). Time to detection of a positive sample by another system for culture of MAP on liquid medium, the para-Jem culture system (TREK Diagnostic Systems Inc., Cleveland, OH, USA), has also been correlated to the amount of shedding. High fecal shedders were detected in less than 21 days, moderate shedders between 21 and 28 days and low shedders in more than 28 days (Adaska and Whitlock, 2012). This study was not designed specifically to correlate amount of fecal shedding and time to detection in BD BACTEC™ MGIT™960 system, but results obtained suggested that a time to detection of a positive sample less than 15 days could indicate a heavy fecal shedder.

CONCLUSION

Culture of environmental samples seems to be a useful diagnostic test to identify high-prevalence MAP infected tie-stalled herds. As the number of positive environmental samples increased the herd fecal shedding prevalence also increased. It might be useful to determine the bacterial load of individual fecal samples in order to identify heavy shedders for removal from the herd. These heavy shedders can be identified according to a short time of detection by the liquid culture system and not only by solid culture that requires up to 12 weeks of incubation.

ACKNOWLEDGEMENTS

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 and by the Pfizer Clinical Fund of the Faculté de médecine vétérinaire of the Université de Montréal.

REFERENCES

- Adaska, J.M and Whitlock, R.H., 2012. Low rate of detectable in utero transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in a dairy herd with a low prevalence of Johne's disease. J. Vet. Diag. Invest. 24, 153-155.
- Aly, S.S., Anderson, R.J., Whitlock, R.H., Fyock, T.L., McAdams, S., Adaska, J.M., Jiang, J., Gardner, I.A., 2009. Reliability of environmental sampling to quantify *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* on California free-stall dairies. J. Dairy Sci. 92, 3634-3642.
- Beaudeau, F., Belliard, M., Joly, A., Seegers, H., 2007. Reduction in milk yield associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map) infection in dairy cows. Vet. Res. 38, 625-634.
- Berghaus, R.D., Farver, T.B., Anderson, R.J., Jaravata, C.C., Gardner, I.A., 2006. Environmental sampling for detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* on large California dairies. J. Dairy Sci. 89, 963-970.
- Canada, G.o., 2011. Canadian Dairy Information Centre: Dairy barn by type in Canada 2011. Accessed Dec. 20, 2012. www.infolait.gc.ca/index_e.php?s1=df-fcil&s2=farm-ferme&page=barn.
- Collins, M.T., Gardner, I.A., Garry, F.B., Roussel, A.J., Wells, S.J., 2006. Consensus recommendations on diagnostic testing for the detection of paratuberculosis in cattle in the United States. J. Am. Vet. Med. Assoc. 229, 1912-1919.
- Davis, W.C., Madsen-Bouterse, S.A., 2012. Crohn's disease and *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*: The need for a study is long overdue. Vet. Immunol. Immunopathol. 145, 1-6.
- Eamens, G.J., Whittington, R.J., Marsh, I.B., Turner, M.J., Saunders, V., Kemsley, P.D., Rayward, D., 2000. Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease. Vet. Microbiol. 77, 357-367.
- Garry, F., 2011. Control of paratuberculosis in dairy herds. Vet. Clin.North Am. Food Anim. Pract. 27, 599-607, vii.
- Hendrick, S.H., Kelton, D.F., Leslie, K.E., Lissemore, K.D., Archambault, M., Duffield, T.F., 2005. Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. 227, 1302-1308.
- Lombard, J.E., Garry, F.B., McCluskey, B.J., Wagner, B.A., 2005. Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows. J. Am. Vet. Med. Assoc. 227, 1975-1981.

- Lombard, J.E., Wagner, B.A., Smith, R.L., McCluskey, B.J., Harris, B.N., Payeur, J.B., Garry, F.B., Salman, M.D., 2006. Evaluation of environmental sampling and culture to determine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* distribution and herd infection status on US dairy operations. *J. Dairy Sci.* 89, 4163-4171.
- Lovell, R.M., Levi, M., Francis, J., 1944. Studies on the survival of Johne's bacilli. *J. Comp. Pathol.* 54, 120-129.
- Pillars, R.B., Grooms, D.L., Kaneene, J.B., 2009a. Longitudinal study of the distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment of dairy herds in the Michigan Johne's disease control demonstration herd project. *Can Vet.* 50, 1039-1046.
- Pillars, R.B., Grooms, D.L., Woltanski, J.A., Blair, E., 2009b. Prevalence of Michigan dairy herds infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as determined by environmental sampling. *Prev Vet Med* 89, 191-196.
- Raizman, E.A., Fetrow, J.P., Wells, S.J., 2009. Loss of income from cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* prior to calving compared with cows not shedding the organism on two Minnesota dairy farms. *J. Dairy Sci.* 92, 4929-4936.
- Raizman, E.A., Wells, S.J., Godden, S.M., Bey, R.F., Oakes, M.J., Bentley, D.C., Olsen, K.E., 2004. The distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in the environment surrounding Minnesota dairy farms. *J. Dairy Sci.* 87, 2959-2966.
- Ridge, S.E., Heuer, C., Cogger, N., Heck, A., Moor, S., Baker, I.M., Vaughan, S., 2010. Herd management practices and the transmission of Johne's disease within infected dairy herds in Victoria, Australia. *Prev. Vet. Med.* 95, 186-197.
- Sergeant, E., 2012. Epitools epidemiological calculators. Accessed Dec. 20, 2012. AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease <http://epitools.ausvet.com.au>.
- Shin, S.J., Han, J.H., Manning, E.J., Collins, M.T., 2007. Rapid and reliable method for quantification of *Mycobacterium paratuberculosis* by use of the BACTEC MGIT 960 system. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1941-1948.
- Smith, R.L., Schukken, Y.H., Pradhan, A.K., Smith, J.M., Whitlock, R.H., Van Kessel, J.S., Wolfgang, D.R., Grohn, Y.T., 2011. Environmental contamination with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in endemically infected dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 102, 1-9.
- Smith, R.L., Strawderman, R.L., Schukken, Y.H., Wells, S.J., Pradhan, A.K., Espejo, L.A., Whitlock, R.H., Van Kessel, J.S., Smith, J.M., Wolfgang, D.R., Grohn, Y.T., 2010. Effect of Johne's disease status on reproduction and culling in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 93, 3513-3524.

- Sweeney, R.W., Collins, M.T., Koets, A.P., McGuirk, S.M., Roussel, A.J., 2012. Paratuberculosis (Johne's disease) in cattle and other susceptible species. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 26, 1239-1250.
- Waddell, L.A., Rajic, A., Sargeant, J., Harris, J., Amezcua, R., Downey, L., Read, S., McEwen, S.A., 2008. The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* - A systematic review. *Can. J. Public Health* 99, 145-155.
- Whitlock, R.H., Buergelt, C., 1996. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet. Clin.North Am. Food Anim. Pract.* 12, 345-356.
- Whitlock, R.H., Wells, S.J., Sweeney, R.W., Van Tiem, J., 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol.* 77, 387-398.
- Whittington, R.J., Marshall, D.J., Nicholls, P.J., Marsh, I.B., Reddacliff, L.A., 2004. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2989-3004.

Conferences

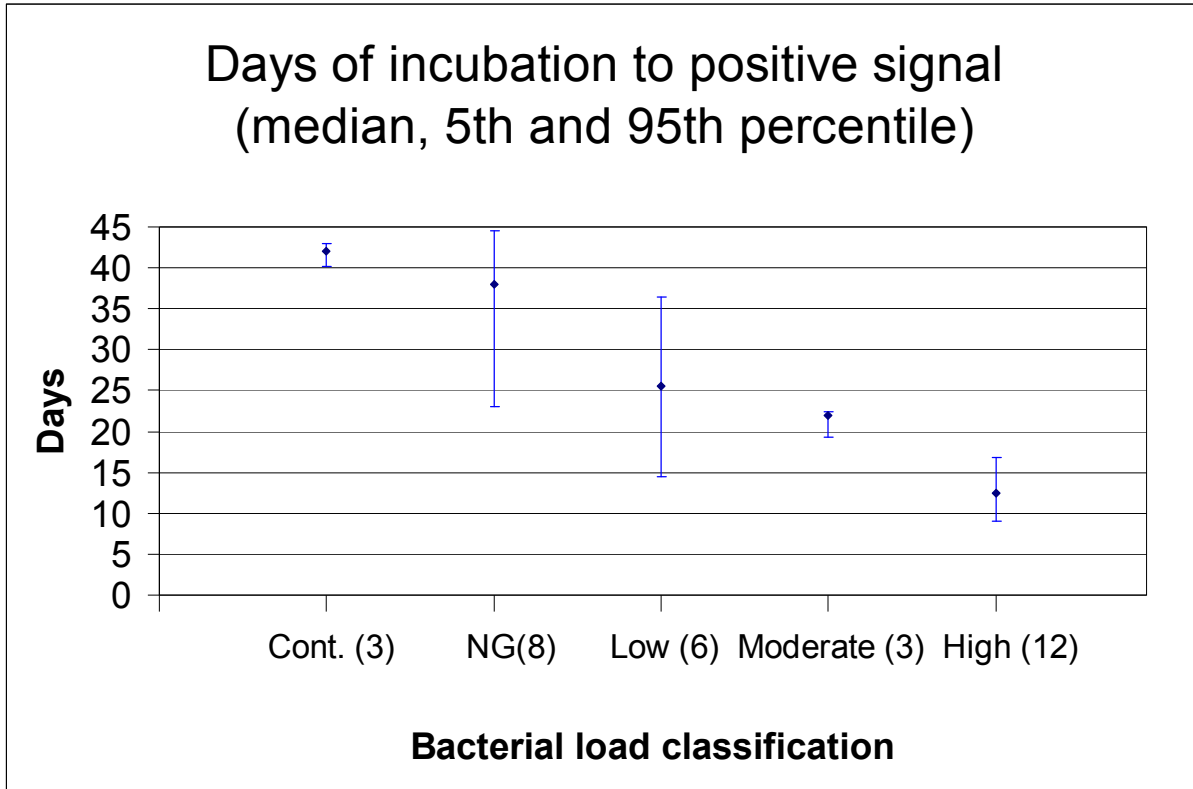
- Whitlock R. H., A. E. Rosenberger, M. Siebert, and R. Sweeney. 1992. Environmental contamination on dairy farms with cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. Pages 84-87 in Proc. XVII World Buiatrics Congress, St-Paul, MN

Table 1. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in individual and environmental samples in Québec tie-stall dairy herds.

Herd #	Initial Diagnosis	Delay ¹ (months)	Individual Fecal Samples			Environmental Samples	
			Nb tested	Nb Positive (%)	Bacterial load in positive samples	Nb Positive ²	Bacterial load in positive samples
1	Necropsy	2.5	45	14 (31.1)	6 Heavy 1 Moderate 3 Low 4 NG	5	2 Heavy 2 Moderate 1 Low
2	1/6 ES	10.5	26	2 (7.7)	2 Heavy	4	2 Heavy 2 Moderate
3	2/6 ES	11	79	5 (6.3)	1 Heavy 1 Low 2 NG 1 ND	2	1 Heavy 1 Moderate
4	1/6 ES	3.5	67	7 (10.4)	1 Heavy 1 Moderate 1 Low 3 Cont 1 ND	1	1 ND
5	1/6 ES	13	53	2 (3.8)	1 Heavy 1 Moderate	0	NA
6	2/6 ES	4.5	69	2 (2.9)	1 Heavy 1 NG	0	NA
7	1/6 ES	2.5	44	1 (2.3)	1 NG	0	NA
8	2/6 ES	2.5	140	3 (2.1)	3 ND	0	NA
9	2 +IFS	3	61	1 (1.6)	1 Low	0	NA
10	1/6 ES	11.5	54	0 (0)	NA	0	NA
11	1/6 ES	12	90	0 (0)	NA	0	NA
12	1/6 ES	3	105	0 (0)	NA	0	NA
13	1/6 ES	2.5	79	0 (0)	NA	0	NA

Cont: Contaminated; ES = environmental sample; IFS = individual fecal sample; NA = Not Available; Nb = number; ND = not done (sample identified as positive on PCR retrospectively); NG = no growth; ¹Delay between initial diagnosis and sampling for the study; ² 6 samples tested per herd except herd #11 where 5 were tested.

Figure 1. Time to detection in days (median, 5th and 95th percentile) of a positive individual fecal sample of MAP¹ by the BD BACTEC™ MGIT™960 according to culture results² on solid medium (4 tubes HEYM with mycobactin J).



¹ MAP = *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

²Classification of MAP shedding according to the tube with the highest colony count: Cont. = Contamination in all 4 tubes; NG = No growth in all 4 tubes; Low = 1-10 ufc/tube; Moderate = 11-75 ufc/tube; Heavy = > 75 ufc/tube

Discussion générale

La paratuberculose a été décrite pour la première fois il y a plus d'un siècle (Johns and Frothingham, 1895) et pourtant les recherches sont encore nombreuses aujourd'hui, car plusieurs aspects de cette maladie ne sont pas entièrement compris. Ce mémoire de maîtrise traitait de deux aspects différents de cette maladie, mais qui sont tout de même en lien: l'épidémiologie et le diagnostic.

Revue systématique de la littérature

L'aspect épidémiologique consistait en une revue systématique de la littérature afin de mieux cibler l'importance des différents facteurs de risque potentiels dans la transmission du MAP aux veaux durant la période néonatale. Le protocole initial de recherche mentionnait qu'une méta-analyse des facteurs de risque associés à la dissémination du MAP à l'intérieur d'un troupeau serait réalisée. Ce qui est avantageux avec la méta-analyse, c'est qu'elle permet de combiner les résultats de plusieurs études indépendantes afin de tirer des conclusions basées sur un plus grand nombre de cas (Glass, 1976). Afin de recueillir les diverses études, il faut d'abord procéder à une revue systématique de la littérature. Durant ce processus, il est vite apparu évident que la réalisation subséquente d'une méta-analyse ne serait pas possible. Afin de combiner les résultats de diverses études à l'aide de tests statistiques il importe que ces études aient une certaine homogénéité. Tout d'abord, les objectifs de chacune des études variaient passablement. Des 23 articles retenus, seulement 4 avaient pour objectif de vérifier un ou des facteurs de risque spécifiques de la transmission du MAP. Deux essais cliniques randomisés ont été réalisés afin de comparer l'incidence de la paratuberculose chez les veaux nourris avec du colostrum non traité et ceux nourris avec du colostrum pasteurisé (Stabel, 2008) ou commercial (Pithua, 2009). Une étude transversale étudiait spécifiquement le colostrum et le lait comme facteurs de risque de l'infection par le MAP (Nielsen, 2008). Finalement, une étude expérimentale a démontré que la transmission de l'infection d'un veau à

un autre était possible (van Roermund et al., 2007). Les autres articles étudiaient simultanément plusieurs facteurs de risque possible et ce souvent à l'aide d'administration d'un questionnaire. Ensuite, la définition d'un cas de la maladie était très variable entre les études. Par exemple, un troupeau pouvait être considéré infecté par le MAP si un cas clinique avait été rapporté, si une seule vache était positive à l'ELISA ou bien si la culture fécale était positive pour le MAP. Dans la majorité des cas (n=18), l'unité d'étude était le troupeau et rarement l'animal (n=5). De plus, les tests diagnostiques utilisés n'étaient pas les mêmes. Le test ELISA sur le sérum était le test le plus fréquemment utilisé (n=14), mais la provenance de la trousse diagnostique était rarement la même. La grande variabilité des articles recensés n'a donc pas permis de faire des analyses statistiques pour regrouper les données des divers cas.

Le titre de cette revue systématique mentionne que les facteurs de risque associés à la transmission du MAP aux veaux laitiers sont étudiés. Toutefois, afin de savoir si un facteur de risque est vraiment en cause dans la transmission du MAP ou pour mesurer l'effet d'un facteur de risque sur la transmission du MAP c'est plutôt l'infection par le MAP qui est mesuré. Il faut que la bactérie soit transmise à son hôte avant de pouvoir causer une infection. Pour qu'il y ait un risque d'infection par le MAP il faut nécessairement que cela soit associé à un risque d'exposition. Le risque d'exposition est le risque que l'animal côtoie le MAP dans son environnement. Le risque de transmission est le risque que le MAP pénètre l'organisme de l'animal. Toutefois, un risque de transmission ne résultera pas assurément en une infection. Par exemple, dans l'étude expérimentale qui a permis de démontrer que le MAP pouvait être transmis entre les veaux, ce ne sont pas tous les veaux de l'étude qui sont devenus infectés par le MAP ou du moins les tests utilisés pour détecter l'infection par le MAP ne se sont pas avérés positifs pour tous les veaux (van Roermund et al., 2007). Suite à une transmission du MAP, il est possible qu'il n'y ait pas d'infection soit parce que la charge bactérienne était trop faible, soit en raison d'une résistance de l'hôte. Il est aussi possible que l'infection ne soit pas encore détectable par les tests diagnostiques si l'animal est testé lors de la phase silencieuse de l'infection. Comme la période d'incubation de cette maladie est longue, il devient encore plus difficile de faire corréler un facteur avec le risque de transmission.

La revue systématique de la littérature permet tout de même de compiler les résultats de plusieurs études afin de tirer des conclusions plus fiables grâce à l'utilisation de méthodes systématiques (Sargeant et al., 2006). La sélection des articles a été faite selon un processus répétable et pour assurer une rigueur de l'analyse des résultats, chaque étude a été évaluée selon une grille préétablie. Les articles ont ainsi pu être classifiés selon leur validité interne et leur validité externe. Les résultats de chaque article ont ainsi été évalués en fonction de la validité des études. Pour déterminer la validité externe, c'est-à-dire la pertinence de généraliser les résultats d'une étude à d'autres populations 2 critères ont été choisis, soit la méthode d'échantillonnage et la taille de l'échantillon étudié. Ces 2 critères étaient spécifiés dans chacune des études et la validité qui en découle pourrait permettre d'inférer les résultats à toutes populations, c'est-à-dire à tous types de ferme laitière, peu importe le pays d'origine. La pertinence de ces 2 critères pour évaluer la validité externe des études est discutable. Il a été considéré que plus la taille de l'échantillon étudié était grande plus les résultats trouvés seraient généralisables à d'autres populations (population externe). Une méthode d'échantillonnage aléatoire permet en théorie d'obtenir un échantillon qui sera plus représentatif de la population source et plus facilement généralisable. Toutefois d'autres critères auraient pu être utilisés, comme par exemple des critères plus spécifiques au type d'élevage des fermes laitières. En utilisant de tels critères, les résultats de plusieurs de ces études ne pourraient pas être généralisés aux élevages laitiers du Québec. Par exemple, les études réalisées en Australie où les pâturages sont très utilisés par les bovins laitiers et aux États-Unis où la majorité des troupeaux sont à stabulation libre n'ont peut-être pas des conclusions applicables aux troupeaux laitiers du Québec qui sont en majorité à stabulation entravée et où les pâturages très peu utilisés par les bovins laitiers.

Une particularité de cette revue systématique de la littérature est qu'elle tentait de répondre simultanément à 5 différentes questions. Chacune des questions n'était évidemment pas étudiée par les 23 articles. La sélection des articles avec 5 questions de front s'est avérée plus longue. Il aurait été plus simple de faire la recherche d'articles afin de répondre à une seule question et d'étudier un seul facteur de risque potentiel de la transmission du MAP. Toutefois, il s'est avéré fort utile et judicieux d'avoir fait la revue systématique sur plusieurs facteurs de risque à la fois, car cela a permis de déterminer que la plupart des facteurs de

risque sont reliés les uns aux autres. Le contact des veaux durant la période néonatale avec du fumier de vaches adultes s'est avéré être le facteur de risque le plus important dans la transmission du MAP. Les veaux pourraient également s'infecter avec du fumier de vache excréant le MAP qui aurait contaminé le colostrum ou le lait qu'ils vont boire sans même entrer en contact avec la vache.

L'étude des facteurs de risque impliqués dans la transmission du MAP est plutôt récente puisque les articles de la revue systématique ont été publiés dans les 20 dernières années et pourtant la maladie est reconnue depuis plus de 100 ans. Ceci est explicable, car l'épidémiologie est une science encore jeune (Rothman and Grennland, 1998). La paratuberculose est une maladie qui a beaucoup été étudiée par les épidémiologistes et qui l'est encore. Sa longue période d'incubation et les porteurs asymptomatiques rendent difficile de prouver le lien de causalité entre un facteur de risque et l'infection par le MAP. Les études épidémiologiques se concentrent maintenant sur la démonstration de l'efficacité des programmes de contrôle préconisant de bonnes pratiques d'élevage des génisses de remplacement en combinaison avec le diagnostic des individus atteints. De telles études ont été faites aux États-Unis (Ferrouillet et al., 2009; Collins et al., 2010), au Canada (Sorge et al., 2010) et au Danemark (Nielsen and Toft, 2011) et une étude est présentement en cours dans les troupeaux du Québec. Encore une fois en raison de la longue période d'incubation de la maladie, ces études doivent s'échelonner sur plusieurs années afin de pouvoir démontrer que les changements de pratiques ont un effet sur l'incidence de la maladie.

Diagnostic du MAP dans les troupeaux laitiers à stabulation entravée

Le deuxième volet de cette maîtrise a été voué à l'étude d'une méthode diagnostique permettant d'identifier les troupeaux infectés par le MAP. La culture d'échantillons de l'environnement pour détecter la présence du MAP a été étudiée dans des troupeaux américains qui ont des caractéristiques différentes des troupeaux du Québec. Les troupeaux québécois comportent un plus petit nombre de vaches et la majorité sont à stabulation entravée et non à stabulation libre. Au Québec, la gestion du fumier se fait la plupart du temps dans une

fosse et le système de récupération des eaux usées de la lagune pour nettoyer les planchers n'existe pas. Il a donc été décidé que cette approche diagnostique devait être validée dans les troupeaux laitiers à stabulation entravée du Québec.

Au début de ce projet de maîtrise, plusieurs données de culture d'échantillons de l'environnement étaient disponibles grâce au programme volontaire de prévention et de contrôle de la paratuberculose au Québec. De plus, les producteurs avec des fermes connues positives au MAP qui désiraient maintenant connaître le statut individuel des vaches ont été recrutés. Certains auteurs rapportaient une association entre la quantité de MAP dans l'environnement et la prévalence individuelle du MAP au sein du troupeau. La quantité de MAP dans l'environnement avait été déterminée soit par le nombre d'échantillons positifs pour le MAP (Berghaus et al., 2006), soit par la quantité de colonies de MAP dénombrée sur milieu de culture solide (Raizman et al., 2004). Comme mentionné précédemment, les troupeaux laitiers étudiés dans ses études américaines différaient de la majorité des troupeaux québécois. Les 23 troupeaux étudiés par Berghaus et al. étaient à stabulation libre et comportaient en moyenne 680 vaches. De plus, même les conditions climatiques de la Californie où s'est faite cette étude diffèrent passablement de celles du Québec, notamment par l'absence de périodes de gel et dégel. C'est donc ainsi que l'étude investiguant s'il existe une association entre la prévalence du MAP dans l'environnement et la prévalence individuelle d'excrétion fécale dans les troupeaux laitiers québécois à stabulation entravée a vu le jour.

Malgré le peu de troupeaux inclus dans l'étude, une association significative entre le nombre d'échantillons de l'environnement positifs au MAP et la prévalence individuelle d'excrétion fécale du MAP a été identifiée. Cette méthode diagnostique pourrait permettre de déterminer la prévalence individuelle de vache excrétaant le MAP dans le fumier sans avoir à tester chaque animal individuellement, ce qui aurait pour avantage de réduire drastiquement les coûts du diagnostic. Pour l'instant, 6 échantillons de l'environnement sont prélevés. Si chaque culture coûte environ 30\$, le coût total serait de 180\$. Si chacune des vaches devait être prélevée et qu'un troupeau renferme en moyenne 60 vaches, le coût total serait de 1800\$ (30\$ X 60 vaches) et à cela s'ajouteraient les honoraires pour le temps de prélèvement. La

culture des échantillons de l'environnement serait donc un moyen fiable, simple et peu coûteux afin de classer les troupeaux laitiers en fonction de la prévalence d'excrétion du MAP. Cette méthode serait un moyen de "dépistage" à utiliser en première ligne afin d'identifier les troupeaux affectés par le MAP. Toutefois, cette méthode diagnostique a également des inconvénients. Elle ne permet pas d'identifier directement les animaux excréteurs du MAP et ne permet pas non plus de quantifier l'excrétion individuelle des animaux positifs pour le MAP. Il peut donc être nécessaire, en deuxième ligne, d'avoir recourt à la culture fécale individuelle afin d'identifier et d'éliminer les animaux positifs pour le MAP.

Les 4 troupeaux de l'étude ayant eu des cultures positives pour le MAP dans leur environnement avaient également au moins une vache forte excrétrice de MAP, c'est-à-dire qu'elle excrétrait une grande quantité de MAP dans ses fèces. Par contre, certains troupeaux avaient également une vache forte excrétrice sans toutefois que MAP soit isolé de l'environnement lors de l'étude. La culture de l'environnement n'est donc pas un test sensible à 100% car elle ne permet pas de détecter tous les troupeaux avec des individus positifs pour le MAP et ce même si ces individus l'excrètent en grande quantité dans leurs fèces. Toutefois, tous les troupeaux de l'étude ayant des individus excréteurs de MAP dans leurs fèces et pour lesquels MAP n'a pas été détecté dans l'environnement, avaient une prévalence individuelle d'excrétion du MAP inférieure à 4%. Les 13 troupeaux de l'étude avaient tous été préalablement diagnostiqués avec du MAP au cours des mois précédents. Il est possible que les animaux qui contribuaient grandement à la contamination de l'environnement aient été réformés et que le MAP ne soit plus isolé des fèces des vaches ou très peu. Cela pourrait être le cas du troupeau où MAP avait été isolé des fèces de deux animaux ayant de la diarrhée et qui ont probablement été réformés suite à l'obtention du résultat. Lors de l'étude, MAP n'a pas été isolé de l'environnement de ce troupeau et seulement isolé du fumier d'une vache en faible quantité. Pour les autres troupeaux, les animaux auraient été réformés sans connaître leur statut pour le MAP car le dépistage systématique du MAP au niveau des individus n'avait pas été fait avant la mise en place de l'étude. Par contre, cela n'explique pas pourquoi certains troupeaux sont maintenant exempts de MAP dans l'environnement, mais qu'ils ont toujours un animal fortement excréteur.

Aussi, le temps de détection dans le milieu de culture liquide (BD BACTEC™ MGIT™960) pour un échantillon de fèces d'une vache forte excrétrice était significativement inférieur au temps de détection des autres échantillons. Il pourrait s'avérer utile de rapporter le nombre de jours avant la détection d'un échantillon positif pour le MAP afin de cibler les animaux fortement excréteurs du MAP sans avoir à utiliser les milieux de culture solide qui requièrent un minimum de 12 semaines d'incubation alors qu'un échantillon fortement contaminé par le MAP peut être déclaré positif en seulement une douzaine de jours. Selon les résultats de cette étude, si un échantillon de fèces d'une vache est détecté positif pour le MAP dans le BD BACTEC™ MGIT™960 en moins de 15 jours, la vache peut être considérée fortement excrétrice du MAP dans ses fèces. Le peu d'échantillons testés dans l'étude ne permet pas de donner des intervalles de temps pour les échantillons de fèces d'animaux modérément et faiblement excréteurs. De tels intervalles de temps ont été déterminés pour un autre système de culture pour MAP en milieu liquide, le *para-Jem culture system* (TREK Diagnostic Systems Inc., Cleveland, OH, USA). Les fèces d'animaux fortement excréteurs de MAP sont détectées positifs par ce system en moins de 21 jours, les fèces d'animaux modérément excréteurs entre 21 et 28 jours et les fèces d'animaux faiblement excréteurs en plus de 28 jours (Adaska and Whitlock, 2012).

Pour permettre l'évaluation de la quantité de MAP dans les échantillons, des milieux de culture solide (HEYM) permettant le dénombrement des colonies de MAP ont été utilisés pour la première fois au LÉAQ de Saint-Hyacinthe. Afin de déterminer la méthode de classification idéale des échantillons selon le niveau d'excrétion du MAP, une recherche de la littérature a été faite. Cela a permis de voir qu'il n'existe pas de consensus sur le mode de classification et que chaque laboratoire a sa propre interprétation. La classification utilisée pour notre étude était celle fournie par la compagnie BD. Les graphiques représentant le nombre de colonies dénombrées dans chacun des 4 tubes de tous les échantillons analysés sont présentés en annexe. Aux États-Unis, une politique nationale établie par des chercheurs d'expérience sur la maladie de Johne, recommande aux laboratoires qui font la culture de MAP sur milieu solide à déclarer un animal fortement excréteur si son échantillon de fèces contient plus de 50 ufc par tube (Whitlock et al., 2009). Un échantillon de fèces contient

environ 1, 050 ufc de MAP par gram de fèces si 50 ufc sont dénombrées par tube de culture en milieu solide (Whitlock et al., 2005).

L'intérêt de détecter les animaux fortement excréteurs de MAP est de prioriser leur réforme. Il est en effet recommandé de réformer immédiatement les animaux qui excrètent de grandes quantités de MAP et pour les animaux faiblement à modérément excréteurs, de les réformer à la fin de leur lactation (Sweeney et al., 2012). L'équipe de chercheurs sur la paratuberculose de l'University of Pennsylvania ont élaboré deux concepts qui expliquent l'importance de connaître l'intensité d'excrétion du MAP dans les fèces. Premièrement le concept de *Super Shedder* ou super excréteur qui concerne un animal excréteur plus de 10, 000 ufc de MAP par gramme de fèces. Ces animaux super excréteurs peuvent même excréter jusqu'à 1,000,000 ufc de MAP par gramme de fèces, et ce sans démontrer de signes cliniques de la maladie. Il est donc impératif de détecter ces animaux qui sont une source majeure de contamination dans le troupeau car il contamine l'environnement avec plus de MAP que 160 animaux fortement excréteurs ou 20,000 faiblement excréteurs (Whitlock et al., 2005). Le coût-bénéfice de différentes stratégies diagnostiques afin de détecter les vaches super excrétrices a été évalué dans un troupeau Californien où 19 vaches super excrétrices sur 3, 577 vaches ont été détectées (Aly et al., 2012). Le risque de contamination des aliments et de l'eau étant moindre dans les stabulations entravées qu'en stabulation libre, l'importance de ces animaux super excréteurs dans les troupeaux entravés du Québec reste à définir. Le deuxième concept est celui du *passing-through* ou *passive shedding* que l'on peut traduire par excrétion passive. Ce concept a vu le jour il y a maintenant 20 ans avec une étude expérimentale durant laquelle le MAP était inoculé oralement à des taures. Dès 18 heures suite à l'inoculation, le MAP était excrété dans les fèces de ces 6 taures. Aux jours 3 et 4 l'excrétion était la plus importante pour cesser au jour 7 (Sweeney et al., 1992c). À la nécropsie, MAP n'a pas été isolé des nœuds lymphatiques mésentériques, seulement de la muqueuse iléale. Par contre, les taures n'ayant été euthanasiées qu'après 28 jours, nous pouvons argumenter que la maladie n'a probablement eu le temps de se développer. L'ingestion de 100, 000 ufc de MAP résulterait en la croissance d'une ufc sur un des quatre tubes de milieu solide (Whitlock et al., 2009). Dans les troupeaux laitiers québécois à stabulation entravée, il serait judicieux de refaire la culture fécale sur les animaux faiblement excréteurs du MAP afin de s'assurer que ces animaux

n'excrètent pas simplement le MAP de façon passive. Il serait probable que la nourriture de ces animaux ait pu être contaminée par du fumier contenant du MAP qui se trouvait sur des bottes ou instruments.

Une limite importante de cette étude est attribuable à un biais de sélection. Les troupeaux sélectionnés pour l'étude faisaient tous partie du programme volontaire de contrôle de la paratuberculose, donc avait un sûrement un désir de travailler afin de diminuer la prévalence et l'incidence de la maladie au sein de leur troupeau. Les troupeaux sélectionnés étaient tous des troupeaux infectés par le MAP ou du moins des troupeaux dans lesquels un diagnostic d'infection par le MAP avait été fait dans les 18 mois précédant l'étude. Comme cette maladie a une longue période d'incubation, il est fort probable que des animaux soient toujours infectés par le MAP au sein du troupeau quelques mois après un diagnostic initial et ce malgré la mise en place de bonnes pratiques de régie pour en diminuer l'incidence. Toutefois, il existe un risque minime que le MAP ait été détecté dans l'environnement, car une vache récemment achetée (donc infectée par le MAP ailleurs que dans le troupeau) l'excrétait en grande quantité dans ses fèces et qu'elle ait été vendue avant d'avoir pu contaminer d'autres animaux du troupeau (biais de classification).

Conclusion

Ces deux études ont permis d'améliorer notre savoir sur 2 aspects différents de la paratuberculose : les facteurs de risque de la transmission et le diagnostic de la maladie aux seins des troupeaux laitiers.

Premièrement, le facteur de risque qui apparaît le plus important dans la transmission du MAP aux veaux durant la période néonatale est le contact avec le fumier de vaches adultes. Afin de prévenir l'infection au sein des troupeaux laitiers, il serait primordial de s'assurer que les veaux ne puissent pas avoir de contact avec le fumier des vaches adultes. Il importe aussi de tenir compte que ce contact est aussi possible de façon indirecte et qu'il n'est probablement pas suffisant de simplement séparer le veau des vaches adultes. Par exemple, le fumier contaminé par le MAP pourrait également se retrouver dans le colostrum servi aux veaux.

Deuxièmement, la méthode de la culture d'échantillons de l'environnement comme moyen diagnostique du MAP aux seins des troupeaux laitiers à stabulation entravée du Québec semble prometteuse. Il semble que la prévalence de vaches excréant le MAP dans leurs fèces soit associée au nombre de sites de l'environnement qui sont positifs à la culture pour le MAP. Les troupeaux dans lesquels MAP a été isolé de l'environnement avaient également au moins une vache forte excrétrice de MAP dans le fumier. Finalement, les échantillons de fumier des vaches fortes excrétrices de MAP sont détectés significativement plus rapidement par le système de culture en milieu liquide.

Les études au sein des troupeaux laitiers du Québec doivent se poursuivre afin de déterminer l'impact des mesures de contrôle sur la prévalence de la maladie et plus particulièrement l'impact de la prévention du contact des veaux avec le fumier de vaches adultes. L'utilisation des échantillons de l'environnement pour la détection du MAP au sein

des troupeaux laitiers entravés pourra être bonifiée en déterminant quels sites sont les plus sensibles pour la détection du MAP.

Bibliographie

- Adaska, J.M., Whitlock, R.H., 2012. Low rate of detectable in utero transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in a dairy herd with a low prevalence of Johne's disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24, 153-155.
- Alinovi, C.A., Ward, M.P., Lin, T.L., Moore, G.E., Wu, C.C., 2009a. Real-time PCR, compared to liquid and solid culture media and ELISA, for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology* 136, 177-179.
- Alinovi, C.A., Ward, M.P., Lin, T.L., Wu, C.C., 2009b. Sample handling substantially affects Johne's ELISA. *Preventive Veterinary Medicine* 90, 278-283.
- Alonso-Hearn, M., Molina, E., Geijo, M., Vazquez, P., Sevilla, I., Garrido, J.M., Juste, R.A., 2009. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from muscle tissue of naturally infected cattle. *Foodborne Pathogens and Disease* 6, 513-518.
- Aly, S.S., Anderson, R.J., Whitlock, R.H., Fyock, T.L., McAdams, S., Adaska, J.M., Jiang, J., Gardner, I.A., 2009. Reliability of environmental sampling to quantify *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* on California free-stall dairies. *Journal of Dairy Science* 92, 3634-3642.
- Aly, S.S., Anderson, R.J., Whitlock, R.H., Fyock, T.L., McAdams, S.C., Byrem, T.M., Jiang, J., Adaska, J.M., Gardner, I.A., 2012. Cost-effectiveness of diagnostic strategies to identify *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* super-shedder cows in a large dairy herd using antibody enzyme-linked immunosorbent assays, quantitative real-time polymerase chain reaction, and bacterial culture. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24, 821-832.
- Aly, S.S., Mangold, B.L., Whitlock, R.H., Sweeney, R.W., Anderson, R.J., Jiang, J., Schukken, Y.H., Hovingh, E., Wolfgang, D., Van Kessel, J.A., Karns, J.S., Lombard, J.E., Smith, J.M., Gardner, I.A., 2010. Correlation between Herrold egg yolk medium culture and real-time quantitative polymerase chain reaction results for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in pooled fecal and environmental samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 22, 677-683.
- Aly, S.S., Thurmond, M.C., 2005. Evaluation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of dairy cows attributable to infection status of the dam. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 227, 450-454.
- Ansari-Lari, M., Haghkhah, M., Mahmoodi, F., 2012. Association of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection with milk production and calving interval in Iranian Holsteins. *Tropical Animal Health and Production* 44, 1111-1116.

- Antman, E.M., Lau, J., Kupelnick, B., Mosteller, F., Chalmers, T.C., 1992. A comparison of results of meta-analyses of randomized control trials and recommendations of clinical experts. Treatments for myocardial infarction. *Journal of the American Medical Association* 268, 240-248.
- Ayele, W.Y., Bartos, M., Svastova, P., Pavlik, I., 2004. Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Veterinary Microbiology* 103, 209-217.
- Ayele, W.Y., Svastova, P., Roubal, P., Bartos, M., Pavlik, I., 2005. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1210-1214.
- Beard, P.M., Daniels, M.J., Henderson, D., Pirie, A., Rudge, K., Buxton, D., Rhind, S., Greig, A., Hutchings, M.R., McKendrick, I., Stevenson, K., Sharp, J.M., 2001a. Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 1517-1521.
- Beard, P.M., Stevenson, K., Pirie, A., Rudge, K., Buxton, D., Rhind, S.M., Sinclair, M.C., Wildblood, L.A., Jones, D.G., Sharp, J.M., 2001b. Experimental paratuberculosis in calves following inoculation with a rabbit isolate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 3080-3084.
- Beaudeau, F., Belliard, M., Joly, A., Seegers, H., 2007. Reduction in milk yield associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map) infection in dairy cows. *Veterinary Research* 38, 625-634.
- Belknap, E.B., Getzy, D.M., Johnson, L.W., Ellis, R.P., Thompson, G.L., Shulaw, W.P., 1994. *Mycobacterium paratuberculosis* infection in two llamas. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 204, 1805-1808.
- Benedictus, A., Mitchell, R.M., Linde-Widmann, A., Sweeney, R., Fyock, T., Schukken, Y.H., Whitlock, R.H., 2008. Transmission parameters of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in a dairy herd going through a control program. *Preventive Veterinary Medicine* 83, 215-227.
- Berghaus, R.D., Farver, T.B., Anderson, R.J., Jaravata, C.C., Gardner, I.A., 2006. Environmental sampling for detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* on large California dairies. *Journal of Dairy Science* 89, 963-970.
- Bielanski, A., Algire, J., Randall, G.C., Surujballi, O., 2006. Risk of transmission of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* by embryo transfer of in vivo and in vitro fertilized bovine embryos. *Theriogenology* 66, 260-266.

- Canada, G.o., 2011. Canadian Dairy Information Centre: Dairy barn by type in Canada 2011. Accessed Dec. 20, 2012. www.infolait.gc.ca/index_e.php?s1=dff-fcil&s2=farm-ferme&page=barn.
- Chi, J., VanLeeuwen, J.A., Weersink, A., Keefe, G.P., 2002. Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum*. Preventive Veterinary Medicine 55, 137-153.
- Chiodini, R.J., 1996. Immunology: resistance to paratuberculosis. The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 12, 313-343.
- Christensen, J., Gardner, I.A., 2000. Herd-level interpretation of test results for epidemiologic studies of animal diseases. Preventive Veterinary Medicine 45, 83-106.
- Clark, D.L., Jr., Koziczowski, J.J., Radcliff, R.P., Carlson, R.A., Ellingson, J.L., 2008. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: comparing fecal culture versus serum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction. Journal of Dairy Science 91, 2620-2627.
- Clarke, C.J., 1997. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. Journal of Comparative Pathology 116, 217-261.
- Collins, D.M., Gabric, D.M., De Lisle, G.W., 1989. Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. FEMS Microbiology Letters 51, 175-178.
- Collins, D.M., Gabric, D.M., de Lisle, G.W., 1990. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. Journal of Clinical Microbiology 28, 1591-1596.
- Collins, M.T., 2011. Diagnosis of paratuberculosis. The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 27, 581-591, vi.
- Collins, M.T., Eggleston, V., Manning, E.J., 2010. Successful control of Johne's disease in nine dairy herds: results of a six-year field trial. Journal of Dairy Science 93, 1638-1643.
- Collins, M.T., Gardner, I.A., Garry, F.B., Roussel, A.J., Wells, S.J., 2006. Consensus recommendations on diagnostic testing for the detection of paratuberculosis in cattle in the United States. Journal of the American Veterinary Medical Association 229, 1912-1919.
- Collins, M.T., Wells, S.J., Petrini, K.R., Collins, J.E., Schultz, R.D., Whitlock, R.H., 2005. Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 12, 685-692.

- Cook, K.L., Britt, J.S., 2007. Optimization of methods for detecting *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in environmental samples using quantitative, real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 69, 154-160.
- Corn, J.L., Manning, E.J., Sreevatsan, S., Fischer, J.R., 2005. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging birds and mammals on livestock premises. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 6963-6967.
- Côté, G., 2003. Rapport Final. 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. Institut national de santé animale. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, 23 p.
- Cousins, D.V., Whittington, R., Marsh, I., Masters, A., Evans, R.J., Kluver, P., 1999. Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable by IS900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis. *Molecular and Cellular Probes* 13, 431-442.
- Coussens, P.M., Verman, N., Coussens, M.A., Elftman, M.D., McNulty, A.M., 2004. Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: evidence for an inherent proinflammatory gene expression pattern. *Infection and Immunity* 72, 1409-1422.
- Crossley, B.M., Zagmutt-Vergara, F.J., Fyock, T.L., Whitlock, R.H., Gardner, I.A., 2005. Fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by dairy cows. *Veterinary Microbiology* 107, 257-263.
- Damato, J.J., Collins, M.T., 1990. Growth of *Mycobacterium paratuberculosis* in radiometric, Middlebrook and egg-based media. *Veterinary Microbiology* 22, 31-42.
- Daniels, M.J., Henderson, D., Greig, A., Stevenson, K., Sharp, J.M., Hutchings, M.R., 2003a. The potential role of wild rabbits *Oryctolagus cuniculus* in the epidemiology of paratuberculosis in domestic ruminants. *Epidemiology and Infection* 130, 553-559.
- Daniels, M.J., Hutchings, M.R., Greig, A., 2003b. The risk of disease transmission to livestock posed by contamination of farm stored feed by wildlife excreta. *Epidemiology and Infection* 130, 561-568.
- Dargatz, D.A., Byrum, B.A., Barber, L.K., Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Shulaw, W.P., Jacobson, R.H., Stabel, J.R., 2001. Evaluation of a commercial ELISA for diagnosis of paratuberculosis in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 218, 1163-1166.

- Davis, W.C., Madsen-Bouterse, S.A., 2012. Crohn's disease and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: The need for a study is long overdue. *Veterinary Immunology Immunopathology* 145, 1-6.
- Delvig, A.A., Lee, J.J., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M., Robinson, J.H., 2002. TGF-beta1 and IFN-gamma cross-regulate antigen presentation to CD4 T cells by macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 72, 163-166.
- de Lisle, G.W., Duncan, J.R., 1981. Bovine paratuberculosis III. An evaluation of a whole blood lymphocyte transformation test. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 45, 304-309.
- de Lisle, G.W., Samagh, B.S., Duncan, J.R., 1980. Bovine paratuberculosis II. A comparison of fecal culture and the antibody response. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 44, 183-191.
- Eamens, G.J., Whittington, R.J., Marsh, I.B., Turner, M.J., Saunders, V., Kemsley, P.D., Rayward, D., 2000. Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease. *Veterinary Microbiology* 77, 357-367.
- Eisenberg, S.W., Koets, A.P., Hoeboer, J., Bouman, M., Heederik, D., Nielen, M., 2010. Presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in environmental samples collected on commercial Dutch dairy farms. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 6310-6312.
- Eisenberg, S.W., Nielen, M., Koets, A.P., 2012. Within-farm transmission of bovine paratuberculosis: recent developments. *The Veterinary Quarterly* 32, 31-35.
- Eisenberg, S.W.F., Koets, A.D.P., Nielen, M., Heederik, D., Mortier, R., De Buck, J., Orsel, K., 2011. Intestinal infection following aerosol challenge of calves with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Veterinary Research* 42, 117.
- Ellingson, J.L., Anderson, J.L., Koziczowski, J.J., Radcliff, R.P., Sloan, S.J., Allen, S.E., Sullivan, N.M., 2005. Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *Journal of Food Protection* 68, 966-972.
- Eltholth, M.M., Marsh, V.R., Van Winden, S., Guitian, F.J., 2009. Contamination of food products with *Mycobacterium avium paratuberculosis*: a systematic review. *Journal of Applied Microbiology* 107, 1061-1071.
- Fecteau, M.E., Ross, J., Tennent-Brown, B.S., Habecker, P.L., Sreevatsan, S., Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., 2009. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* high shedding in an adult female alpaca, and its implications for the rest of the herd. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23, 1311-1314.

- Fecteau, M.E. and Whitlock, R.H., 2010. Paratuberculosis in Cattle. Pages 144-156 in Paratuberculosis : organism, disease, control. M.A. Behr and D.M. Collins, CABI, Wallingford, UK/Cambridge, MA, USA.
- Ferrouillet, C., Wells, S.J., Hartmann, W.L., Godden, S.M., Carrier, J., 2009. Decrease of John's disease prevalence and incidence in six Minnesota, USA, dairy cattle herds on a long-term management program. Preventive Veterinary Medicine 88, 128-137.
- Fischer, O.A., Matlova, L., Bartl, J., Dvorska, L., Svastova, P., du Maine, R., Melicharek, I., Bartos, M., Pavlik, I., 2003. Earthworms (Oligochaeta, Lumbricidae) and mycobacteria. Veterinary Microbiology 91, 325-338.
- Fischer, O.A., Matlova, L., Dvorska, L., Svastova, P., Bartos, M., Weston, R.T., Kopečna, M., Trčka, I., Pavlik, I., 2005. Potential risk of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* spread by syrphid flies in infected cattle farms. Medical and Veterinary Entomology 19, 360-366.
- Florou, M., Leontides, L., Kostoulas, P., Billinis, C., Sofia, M., Kyriazakis, I., Lykotrafitis, F., 2008. Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from non-ruminant wildlife living in the sheds and on the pastures of Greek sheep and goats. Epidemiology and Infection 136, 644-652.
- Gao, A., Mutharia, L., Chen, S., Rahn, K., Odumeru, J., 2002. Effect of pasteurization on survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. Journal of Dairy Science 85, 3198-3205.
- Garry, F., 2011. Control of paratuberculosis in dairy herds. The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 27, 599-607.
- Ghosh, P., Hsu, C., Alyamani, E.J., Shehata, M.M., Al-Dubaib, M.A., Al-Naeem, A., Hashad, M., Mahmoud, O.M., Alharbi, K.B., Al-Busadah, K., Al-Swailem, A.M., Talaat, A.M., 2012. Genome-wide analysis of the emerging infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the Arabian camels (*Camelus dromedarius*). PLOS One 7, e31947.
- Glass, G.V., 1976. Primary, secondary and meta-analysis of research. Educational Researcher 5, 3-8.
- Gonzalez, J., Geijo, M.V., Garcia-Pariente, C., Verna, A., Corpa, J.M., Reyes, L.E., Ferreras, M.C., Juste, R.A., Garcia Marin, J.F., Perez, V., 2005. Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. Journal of Comparative Pathology 133, 184-196.
- Grant, I.R., Ball, H.J., Rowe, M.T., 2002. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing

- establishments in the United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2428-2435.
- Harris, N.B., Robbe-Austerman, S., Payeur, J.B., 2005. Effect of egg yolk on the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using the ESP II liquid culture system. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 17, 554-560.
- Hendrick, S.H., Duffield, T.E., Kelton, D.E., Leslie, K.E., Lissemore, K.D., Archambault, M., 2005a. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays performed on milk and serum samples for detection of paratuberculosis in lactating dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 226, 424-428.
- Hendrick, S.H., Kelton, D.F., Leslie, K.E., Lissemore, K.D., Archambault, M., Duffield, T.F., 2005b. Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 227, 1302-1308.
- Higgins JPT, G.S., 2011. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* The Cochrane Collaboration Version 5.1.0, www.cochrane_handbook.org.
- Hines, M.E. 2nd, Stabel, J.R., Sweeney, R.W., Griffin, F., Talaat, A.M., Bakker, D., Benedictus, G., Davis, W.C., de Lisle G.W., Gardner, I.A., Juste R.A., Kapur, V., Koets, A., McNair, J., Pruitt, G., Whitlock, R.H., 2007. Experimental challenge models for Johne's disease: a review and proposed international guidelines. *Veterinary Microbiology* 122, 197-222.
- Holmes, M.A., 2007. Evaluation of the evidence. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 37, 447-462.
- Hostetter, J., Steadham, E., Haynes, J., Bailey, T., Cheville, N., 2003. Phagosomal maturation and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in J774 cells. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 26, 269-283.
- Johne, H.A., Frothingham, L., 1895. Ein eigenthümlicher Fall von Tuberculose beim Rind [A peculiar case of tuberculosis in a cow]. *Deutsche Zeitschrift für Tiermedizin und Vergleichende Pathologie* 21, 438-455.
- Johnson-Ifeorunlu, Y., Kaneene, J.B., Lloyd, J.W., 1999. Herd-level economic analysis of the impact of paratuberculosis on dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 214, 822-825.
- Johnson-Ifeorunlu, Y.J., Kaneene, J.B., Sprecher, D.J., Gardiner, J.C., Lloyd, J.W., 2000. The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on days open in Michigan, USA, dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine* 46, 171-181.

- Jorgensen, J.B., 1982. An improved medium for culture of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine faeces. *Acta Veterinaria Scandinavica* 23, 325-335.
- Judge, J., Kyriazakis, I., Greig, A., Davidson, R.S., Hutchings, M.R., 2006. Routes of intraspecies transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): a field study. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 398-403.
- Jungersen, G., Huda, A., Hansen, J.J., Lind, P., 2002. Interpretation of the gamma interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9, 453-460.
- Kalis, C.H., Collins, M.T., Hesselink, J.W., Barkema, H.W., 2003. Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay. *Veterinary Microbiology* 97, 73-86.
- Kalis, C.H., Hesselink, J.W., Barkema, H.W., Collins, M.T., 2000. Culture of strategically pooled bovine fecal samples as a method to screen herds for paratuberculosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12, 547-551.
- Kalis, C.H., Hesselink, J.W., Russchen, E.W., Barkema, H.W., Collins, M.T., Visser, I.J., 1999. Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine fecal samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 11, 345-351.
- Karcher, E.L., Bayles, D.O., Bannantine, J.P., Beitz, D.C., Stabel, J.R., 2008a. Osteopontin: a novel cytokine involved in the regulation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in periparturient dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 91, 3079-3091.
- Karcher, E.L., Johnson, C.S., Beitz, D.C., Stabel, J.R., 2008b. Osteopontin immunoreactivity in the ileum and ileocecal lymph node of dairy cows naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 126, 142-148.
- Khalifeh, M.S., Stabel, J.R., 2004. Effects of gamma interferon, interleukin-10, and transforming growth factor beta on the survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in monocyte-derived macrophages from naturally infected cattle. *Infection and Immunity* 72, 1974-1982.
- Khare, S., Adams, L.G., Osterstock, J., Roussel, A., David, L., 2008. Effects of shipping and storage conditions of fecal samples on viability of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 1561-1562.
- Khol, J.L., Kralik, P., Slana, I., Beran, V., Aurich, C., Baumgartner, W., Pavlik, I., 2010. Consecutive excretion of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in semen

of a breeding bull compared to the distribution in feces, tissue and blood by IS900 and F57 quantitative real-time PCR and culture examinations. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science* 72, 1283-1288.

- Kim, S.G., Kim, E.H., Lafferty, C.J., Miller, L.J., Koo, H.J., Stehman, S.M., Shin, S.J., 2004. Use of conventional and real-time polymerase chain reaction for confirmation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a broth-based culture system ESP II. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 16, 448-453.
- Kim, S.G., Shin, S.J., Jacobson, R.H., Miller, L.J., Harpending, P.R., Stehman, S.M., Rossiter, C.A., Lein, D.A., 2002. Development and application of quantitative polymerase chain reaction assay based on the ABI 7700 system (TaqMan) for detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 14, 126-131.
- Kruip, T.A., Muskens, J., van Roermund, H.J., Bakker, D., Stockhofe-Zurwieden, N., 2003. Lack of association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with oocytes and embryos from moderate shedders of the pathogen. *Theriogenology* 59, 1651-1660.
- Kudahl, A.B., Nielsen, S.S., 2009. Effect of paratuberculosis on slaughter weight and slaughter value of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 92, 4340-4346.
- Lambrecht, R.S., Carriere, J.F., Collins, M.T., 1988. A model for analyzing growth kinetics of a slowly growing *Mycobacterium* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 910-916.
- Larsen, A.B., Kopecky, K.E., 1970. *Mycobacterium paratuberculosis* in reproductive organs and semen of bulls. *American Journal of Veterinary Research* 31, 255-258.
- Larsen, A.B., Stalheim, O.H., Hughes, D.E., Appell, L.H., Richards, W.D., Himes, E.M., 1981. *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 179, 169-171.
- Lean, I.J., Rabiee, A.R., Duffield, T.F., Dohoo, I.R., 2009. Invited review: Use of meta-analysis in animal health and reproduction: Methods and applications. *Journal of Dairy Science* 92, 3545-3565.
- Lepper, A.W., Wilks, C.R., Kotiw, M., Whitehead, J.T., Swart, K.S., 1989. Sequential bacteriological observations in relation to cell-mediated and humoral antibody responses of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis* and maintained on normal or high iron intake. *Australian Veterinary Journal* 66, 50-55.
- Lombard, J.E., 2011. Epidemiology and economics of paratuberculosis. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 27, 525-535, v.

- Lombard, J.E., Garry, F.B., McCluskey, B.J., Wagner, B.A., 2005. Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 227, 1975-1981.
- Lombard, J.E., Wagner, B.A., Smith, R.L., McCluskey, B.J., Harris, B.N., Payeur, J.B., Garry, F.B., Salman, M.D., 2006. Evaluation of environmental sampling and culture to determine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* distribution and herd infection status on US dairy operations. *Journal of Dairy Science* 89, 4163-4171.
- Lovell, R.M., Levi, M., Francis, J., 1944. Studies on the survival of Johne's bacilli. *Journal of Comparative Pathology* 54, 120-129.
- Mackintosh, C.G., de Lisle, G.W., Collins, D.M., Griffin, J.F.T., 2004. Mycobacterial diseases of deer. *New Zealand Veterinary Journal* 52, 163-174.
- Manning, E.J., Kucera, T.E., Gates, N.B., Woods, L.M., Fallon-McKnight, M., 2003a. Testing for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in asymptomatic free-ranging tule elk from an infected herd. *Journal of Wildlife Diseases* 39, 323-328.
- Manning, E.J.B., Augenstein, M., Collins, M.T., Nelson, K.M., 2003b. Case report - Johne's disease: The recipient risk. *Bovine Practice* 37, 20-22.
- Marce, C., Beaudeau, F., Bareille, N., Seegers, H., Fourichon, C., 2009. Higher non-return rate associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection at early stage in Holstein dairy cows. *Theriogenology* 71, 807-816.
- Markus, H., 1904. Eine spezifische Darmentzündung des Rindes, wahrscheinlich tuberculöser. *Zeitschrift für Tiermedizin* 8, 68-78.
- McKenna, S.L., Keefe, G.P., Barkema, H.W., McClure, J., Vanleeuwen, J.A., Hanna, P., Sockett, D.C., 2004. Cow-level prevalence of paratuberculosis in culled dairy cows in Atlantic Canada and Maine. *Journal of Dairy Science* 87, 3770-3777.
- Meadus, W.J., Gill, C.O., Duff, P., Badoni, M., Saucier, L., 2008. Prevalence on beef carcasses of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA. *International Journal of Food Microbiology* 124, 291-294.
- Merkal, R.S., Miller, J.M., Hintz, A.M., Bryner, J.H., 1982. Intrauterine inoculation of *Mycobacterium paratuberculosis* into guinea pigs and cattle. *American Journal of Veterinary Research* 43, 676-678.
- Meyer, K.F., 1913. The specific paratuberculosis enteritis of cattle in America. *Journal of Medical Research* 29, 147-191.

- Moloney, B.J., Whittington, R.J., 2008. Cross species transmission of ovine Johne's disease from sheep to cattle: an estimate of prevalence in exposed susceptible cattle. *Australian Veterinary Journal* 86, 117-123.
- Momotani, E., Whipple, D.L., Thiermann, A.B., Cheville, N.F., 1988. Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Veterinary Pathology* 25, 131-137.
- Munster, P., Volkel, I., Wemheuer, W., Petschenka, J., Wemheuer, W., Steinbrunn, C., Campe, A., Schulz-Schaeffer, W.J., Kreienbrock, L., Czerny, C.P., 2011. Detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in ileocaecal lymph nodes collected from elderly slaughter cows using a semi-nested IS900 polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology* 154, 197-201.
- Munster, P., Volkel, I., Wemheuer, W., Schwarz, D., Doring, S., Czerny, C.P., 2013. A Longitudinal Study to Characterize the Distribution Patterns of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Semen, Blood and Faeces of a Naturally Infected Bull by IS 900 Semi-Nested and Quantitative Real-Time PCR. *Transboundary and Emerging Diseases* 60, 175-187. doi: 10.1111/j.1865-1682.2012.01336.x. Epub 2012 May 10.
- Nielsen, S.S., Toft, N., 2009. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Preventive veterinary medicine* 88, 1-14.
- Nielsen, S.S., Toft, N., 2011. Effect of management practices on paratuberculosis prevalence in Danish dairy herds. *Journal of Dairy Science* 94, 1849-1857.
- Okura, H., Toft, N., Nielsen, S.S., 2012. Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk at dairy cattle farms: A systematic review and meta-analysis. *Veterinary Microbiology* 157, 253-263.
- Okura, H., Toft, N., Pozzato, N., Tondo, A., Nielsen, S.S., 2011. Apparent Prevalence of Beef Carcasses Contaminated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Sampled from Danish Slaughter Cattle. *Veterinary Medicine International* 2011, 152687.
- Olsen, I., Sigurgardottir, G., Djonne, B., 2002. Paratuberculosis with special reference to cattle. A review. *The Veterinary Quarterly* 24, 12-28.
- Ott, S.L., Wells, S.J., Wagner, B.A., 1999. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Preventive Veterinary Medicine* 40, 179-192.
- Oxman, A.D., Guyatt, G.H., 1993. The science of reviewing research. *Annals of the New York Academy of Sciences* 703, 125-133; discussion 133-124.
- Pearson, L.D., 1908. A note on the occurrence in America of chronic bacterial dysentery of cattle. *American Veterinary Review* 32, 602-605.

- Perry, G.H., Vivanco, H., Holmes, I., Gwozdz, J.M., Bourne, J., 2006. No evidence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in in vitro produced cryopreserved embryos derived from subclinically infected cows. *Theriogenology* 66, 1267-1273.
- Pillars, R.B., Grooms, D.L., Kaneene, J.B., 2009a. Longitudinal study of the distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment of dairy herds in the Michigan Johne's disease control demonstration herd project. *Canadian Veterinary Journal* 50, 1039-1046.
- Pillars, R.B., Grooms, D.L., Woltanski, J.A., Blair, E., 2009b. Prevalence of Michigan dairy herds infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as determined by environmental sampling. *Preventive Veterinary Medicine* 89, 191-196.
- Pithua, P., Godden, S.M., Wells, S.J., Oakes, M.J., 2009. Efficacy of feeding plasma-derived commercial colostrum replacer for the prevention of transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Holstein calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 234, 1167-1176.
- Raizman, E.A., Fetrow, J.P., Wells, S.J., 2009. Loss of income from cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* prior to calving compared with cows not shedding the organism on two Minnesota dairy farms. *Journal of Dairy Science* 92, 4929-4936.
- Raizman, E.A., Wells, S.J., Godden, S.M., Bey, R.F., Oakes, M.J., Bentley, D.C., Olsen, K.E., 2004. The distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in the environment surrounding Minnesota dairy farms. *Journal of Dairy Science* 87, 2959-2966.
- Raizman, E.A., Wells, S.J., Jordan, P.A., DelGiudice, G.D., Bey, R.R., 2005. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging deer and rabbits surrounding Minnesota dairy herds. *Canadian Journal of Veterinary Research* 69, 32-38.
- Ridge, S.E., Heuer, C., Cogger, N., Heck, A., Moor, S., Baker, I.M., Vaughan, S., 2010. Herd management practices and the transmission of Johne's disease within infected dairy herds in Victoria, Australia. *Preventive veterinary medicine* 95, 186-197.
- Rohde, R.F., Shulaw, W.P., 1990. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the uterine flush fluids of cows with clinical paratuberculosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 197, 1482-1483.
- Rothman, J.K., Grennland, S., 1998. *Modern Epidemiology, Second Edition*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, 738 pages.
- Rowe, M.T., Grant, I.R., 2006. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and its potential survival tactics. *Letters in Applied Microbiology* 42, 305-311.

- Salgado, M., Herthnek, D., Bolske, G., Leiva, S., Kruze, J., 2009. First isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from wild guanacos (*Lama guanicoe*) on Tierra del Fuego Island. *Journal of Wildlife Diseases* 45, 295-301.
- Sargeant, J.M., Rajic, A., Read, S., Ohlsson, A., 2006. The process of systematic review and its application in agri-food public-health. *Preventive Veterinary Medicine* 75, 141-151.
- Schonenbrucher, H., Abdulmawjood, A., Failing, K., Bulte, M., 2008. New triplex real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine feces. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2751-2758.
- Scott, H.M., Sorensen, O., Wu, J.T., Chow, E.Y., Manninen, K., VanLeeuwen, J.A., 2006. Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, *Neospora caninum*, Bovine leukemia virus, and Bovine viral diarrhea virus infection among dairy cattle and herds in Alberta and agroecological risk factors associated with seropositivity. *Canadian Veterinary Journal* 47, 981-991.
- Sergeant, E., 2012. Epitools epidemiological calculators. Accessed Dec. 20, 2012. AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease <http://epitools.ausvet.com.au>.
- Sherman, D.M., Gay, J.M., Bouley, D.S., Nelson, G.H., 1990. Comparison of the complement-fixation and agar gel immunodiffusion tests for diagnosis of subclinical bovine paratuberculosis. *American Journal of Veterinary Research* 51, 461-465.
- Shin, S.J., Chang, Y.F., Huang, C., Zhu, J., Huang, L., Yoo, H.S., Shin, K.S., Stehman, S., Shin, S.J., Torres, A., 2004. Development of a polymerase chain reaction test to confirm *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in culture. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 16, 116-120.
- Shin, S.J., Han, J.H., Manning, E.J., Collins, M.T., 2007. Rapid and reliable method for quantification of *Mycobacterium paratuberculosis* by use of the BACTEC MGIT 960 system. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 1941-1948.
- Sibley, J.A., Woodbury, M.R., Appleyard, G.D., Elkin, B., 2007. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Bison (*Bison bison*) from Northern Canada. *Journal of Wildlife Diseases* 43, 775-779.
- Sidoti, F., Banche, G., Astegiano, S., Allizond, V., Cuffini, A.M., Bergallo, M., 2011. Validation and standardization of IS900 and F57 real-time quantitative PCR assays for the specific detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Canadian Journal of Microbiology* 57, 347-354.
- Sorge, U., Kelton, D., Lissemore, K., Godkin, A., Hendrick, S., Wells, S. 2010. Attitudes of Canadian dairy farmers toward a voluntary Johne's disease control program. *Journal of Dairy Science* 93, 1491-1499.

- Smith, R.L., Schukken, Y.H., Pradhan, A.K., Smith, J.M., Whitlock, R.H., Van Kessel, J.S., Wolfgang, D.R., Grohn, Y.T., 2011. Environmental contamination with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in endemically infected dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* 102, 1-9.
- Smith, R.L., Strawderman, R.L., Schukken, Y.H., Wells, S.J., Pradhan, A.K., Espejo, L.A., Whitlock, R.H., Van Kessel, J.S., Smith, J.M., Wolfgang, D.R., Grohn, Y.T., 2010. Effect of Johne's disease status on reproduction and culling in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 93, 3513-3524.
- Sockett, D.C., Carr, D.J., Collins, M.T., 1992. Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a commercial DNA probe for diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in cattle. *Canadian Journal of Veterinary Research* 56, 148-153.
- Stabel, J.R., 2000a. Cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells from cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research* 61, 754-760.
- Stabel, J.R., 2000b. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology* 77, 465-473.
- Stabel, J.R., 2008. Pasteurization of colostrum reduces the incidence of paratuberculosis in neonatal dairy calves. *Journal of Dairy Science* 91, 3600-3606.
- Stabel, J.R., Bannantine, J.P., 2005. Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 4744-4750.
- Stabel, J.R., Bosworth, T.L., Kirkbride, T.A., Forde, R.L., Whitlock, R.H., 2004. A simple, rapid, and effective method for the extraction of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA from fecal samples for polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 16, 22-30.
- Stabel, J.R., Palmer, M.V., Harris, B., Plattner, B., Hostetter, J., Robbe-Austerman, S., 2009. Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in neonatal calves after oral or intraperitoneal experimental infection. *Veterinary Microbiology* 136, 306-313.
- Stabel, J.R., Wells, S.J., Wagner, B.A., 2002. Relationships between fecal culture, ELISA, and bulk tank milk test results for Johne's disease in US dairy herds. *Journal of Dairy Science* 85, 525-531.
- Stevenson, K., Hughes, V.M., de Juan, L., Inglis, N.F., Wright, F., Sharp, J.M., 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 1798-1804.

- Stewart, D.J., Vaughan, J.A., Stiles, P.L., Noske, P.J., Tizard, M.L., Prowse, S.J., Michalski, W.P., Butler, K.L., Jones, S.L., 2006. A long-term study in Angora goats experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: clinical disease, faecal culture and immunological studies. *Veterinary Microbiology* 113, 13-24.
- Streeter, R.N., Hoffsis, G.F., Bech-Nielsen, S., Shulaw, W.P., Rings, D.M., 1995. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *American Journal of Veterinary Research* 56, 1322-1324.
- Sweeney, R.W., 1996. Transmission of paratuberculosis. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 12, 305-312.
- Sweeney, R.W., 2011. Pathogenesis of paratuberculosis. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 27, 537-546, v.
- Sweeney, R.W., Collins, M.T., Koets, A.P., McGuirk, S.M., Roussel, A.J., 2012. Paratuberculosis (Johne's disease) in cattle and other susceptible species. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 26, 1239-1250.
- Sweeney, R.W., Jones, D.E., Habecker, P., Scott, P., 1998. Interferon-gamma and interleukin 4 gene expression in cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research* 59, 842-847.
- Sweeney, R.W., Uzonna, J., Whitlock, R.H., Habecker, P.L., Chilton, P., Scott, P., 2006a. Tissue predilection sites and effect of dose on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* organism recovery in a short-term bovine experimental oral infection model. *Research in Veterinary Science* 80, 253-259.
- Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Buckley, C.L., Spencer, P.A., 1995. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 7, 488-493.
- Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., McAdams, S., Fyock, T., 2006b. Longitudinal study of ELISA seroreactivity to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected cattle and culture-negative herd mates. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18, 2-6.
- Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Rosenberger, A.E., 1992a. *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *Journal of clinical microbiology* 30, 166-171.
- Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Rosenberger, A.E., 1992b. *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. *American Journal of Veterinary Research* 53, 477-480.

- Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Rosenberger, A.E., Herr, S.A., 1992c. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* after oral inoculation in uninfected cattle. *American Journal of Veterinary Research* 53, 1312-1314.
- Tavornpanich, S., Gardner, I.A., Anderson, R.J., Shin, S., Whitlock, R.H., Fyock, T., Adaska, J.M., Walker, R.L., Hietala, S.K., 2004. Evaluation of microbial culture of pooled fecal samples for detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in large dairy herds. *American Journal of Veterinary Research* 65, 1061-1070.
- Tavornpanich, S., Muñoz-Zanzi, C.A., Well, S.J., Raizman E.A., Carpenter, T.E., Johnson, W.O., Gardner, I.A., 2008. Simulation model for evaluation of testing strategies for detection of paratuberculosis in midwestern US dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* 83, 65-82.
- Taylor, T.K., Wilks, C.R., McQueen, D.S., 1981. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne's disease. *The Veterinary Record* 109, 532-533.
- Tessema, M.Z., Koets, A.P., Rutten, V.P., Gruys, E., 2001. How does *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* resist intracellular degradation? *The Veterinary Quarterly* 23, 153-162.
- Thorel, M.F., Krichevsky, M., Levy-Frebault, V.V., 1990. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *International journal of systematic bacteriology* 40, 254-260.
- Tiwari, A., VanLeeuwen, J.A., Dohoo, I.R., Keefe, G.P., Weersink, A., 2008. Estimate of the direct production losses in Canadian dairy herds with subclinical *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Canadian Veterinary Journal* 49, 569-576.
- Tortoli, E., Cichero, P., Piersimoni, C., Simonetti, M.T., Gesu, G., Nista, D., 1999. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 3578-3582.
- van Roermund, H.J., Bakker, D., Willemsen, P.T., de Jong, M.C., 2007. Horizontal transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in an experimental setting: calves can transmit the infection to other calves. *Veterinary Microbiology*, 122, 270-279.
- van Schaik, G., Pradenas, F.M., Mella, N.A., Kruze, V.J., 2007. Diagnostic validity and costs of pooled fecal samples and individual blood or fecal samples to determine the cow- and herd-status for *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *Preventive Veterinary Medicine* 82, 159-165.

- van Weering, H., van Schaik, G., van der Meulen, A., Waal, M., Franken, P., van Maanen, K., 2007. Diagnostic performance of the Pourquier ELISA for detection of antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in individual milk and bulk milk samples of dairy herds. *Veterinary Microbiology* 125, 49-58.
- VanLeeuwen, J.A., Forsythe, L., Tiwari, A., Chartier, R., 2005. Seroprevalence of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* in dairy cattle in Saskatchewan. *Canadian Veterinary Journal* 46, 56-58.
- VanLeeuwen, J.A., Keefe, G.P., Tremblay, R., Power, C., Wichtel, J.J., 2001. Seroprevalence of infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, bovine leukemia virus, and bovine viral diarrhoea virus in maritime Canada dairy cattle. *Canadian Veterinary Journal* 42, 193-198.
- VanLeeuwen, J.A., Tiwari, A., Plaizier, J.C., Whiting, T.L., 2006. Seroprevalences of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* in beef and dairy cattle in Manitoba. *Canadian Veterinary Journal*. 47, 783-786.
- Waddell, L.A., Rajic, A., Sargeant, J., Harris, J., Amezcua, R., Downey, L., Read, S., McEwen, S.A., 2008. The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* - A systematic review. *Canadian Journal of Public Health* 99, 145-155.
- Weber, M.F., Kogut, J., de Bree, J., van Schaik, G., Nielen, M., 2010. Age at which dairy cattle become *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* faecal culture positive. *Preventive Veterinary Medicine* 97, 29-36.
- Wells, S.J., Whitlock, R.H., Lindeman, C.J., Fyock, T., 2002. Evaluation of bacteriologic culture of pooled fecal samples for detection of *Mycobacterium paratuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research* 63, 1207-1211.
- Whitlock, R.H., Buergelt, C., 1996. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 12, 345-356.
- Withlock, R.H., Gardner, I.A., Schukken, Y., Mangold, B.L., Sweeney, R.W., Van Kessel, J., Karns, J., Smith, J., Hovingh, E., Wolfgang, D., 2009. Johne's Disease: Supershedders, passive shedding and adult infection. *Proceedings 27th ACVIM Forum*, Montréal, Canada.
- Whitlock, R.H., Rosenberg, A.E., Siebert, M., Sweeney, R., 1992. Environmental contamination on dairy farms with cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Proceedings XVII World Buiatrics Congress*, St-Paul, MN, 84-87.

- Whitlock, R.H., Sweeney, R.W., Fyock, T.L., Smith, J., 2005. MAP super-shedders: another factor in the control of Johne's disease. Poster Presentation at 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen,
- Whitlock, R.H., Wells, S.J., Sweeney, R.W., Van Tiem, J., 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Veterinary Microbiology* 77, 387-398.
- Whittington, R., 2010. Cultivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Pages 244-266 in *Paratuberculosis : organism, disease, control*. M.A. Behr and D.M. Collins, CABI, Wallingford, UK/Cambridge, MA, USA.
- Whittington, R.J., Marshall, D.J., Nicholls, P.J., Marsh, I.B., Reddacliff, L.A., 2004. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 2989-3004.
- Whittington, R.J., Sergeant, E.S., 2001. Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in animal populations. *Australian Veterinary Journal* 79, 267-278.
- Whittington, R.J., Windsor, P.A., 2009. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A. critical review and meta-analysis. *Veterinary Journal* 179, 60-69.
- Williams, E.S., Snyder, S.P., Martin, K.L., 1983. Pathology of spontaneous and experimental infection of North American wild ruminants with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Veterinary Pathology* 20, 274-290.
- Windsor, P.A., Whittington, R.J., 2010. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Veterinary Journal* 184, 37-44.
- Yokomizo, Y., Kishima, M., Mori, Y., Nishimori, K., 1991. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation test for the diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science* 53, 577-584.
- Zhang, M.Z., Zhang, S., 2011. An efficient DNA extraction method for polymerase chain reaction-based detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in bovine fecal samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23, 41-48.
- Zurbrick, B.G., Czuprynski, C.J., 1987. Ingestion and intracellular growth of *Mycobacterium paratuberculosis* within bovine blood monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infection and Immunity* 55, 1588-1593.

Annexe 1: Graphiques du dénombrement des colonies de MAP

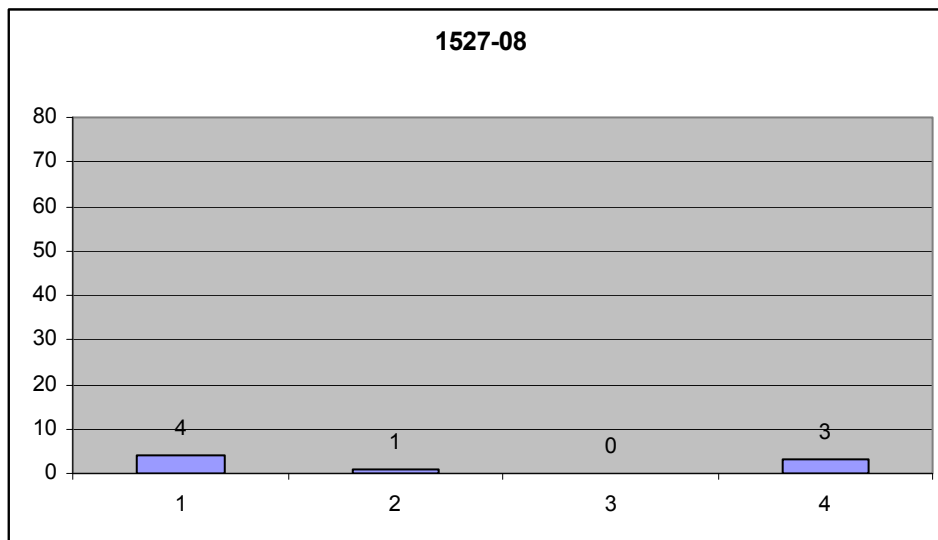
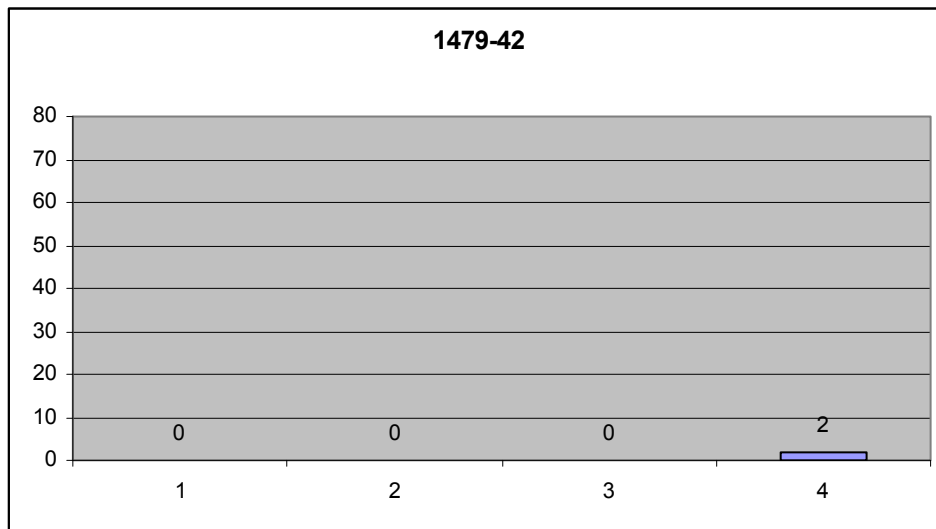
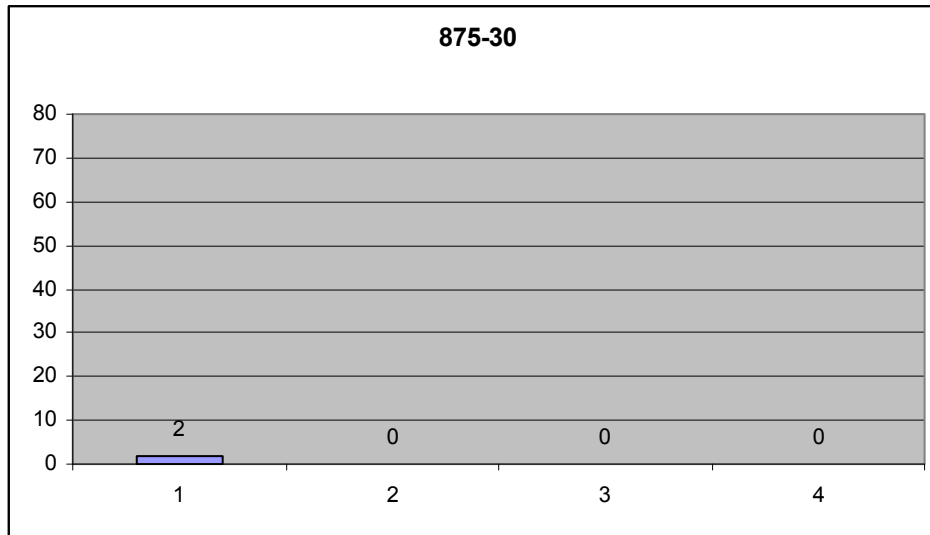
Graphiques du dénombrement des colonies de MAP sur milieu de culture solide (HEYM).

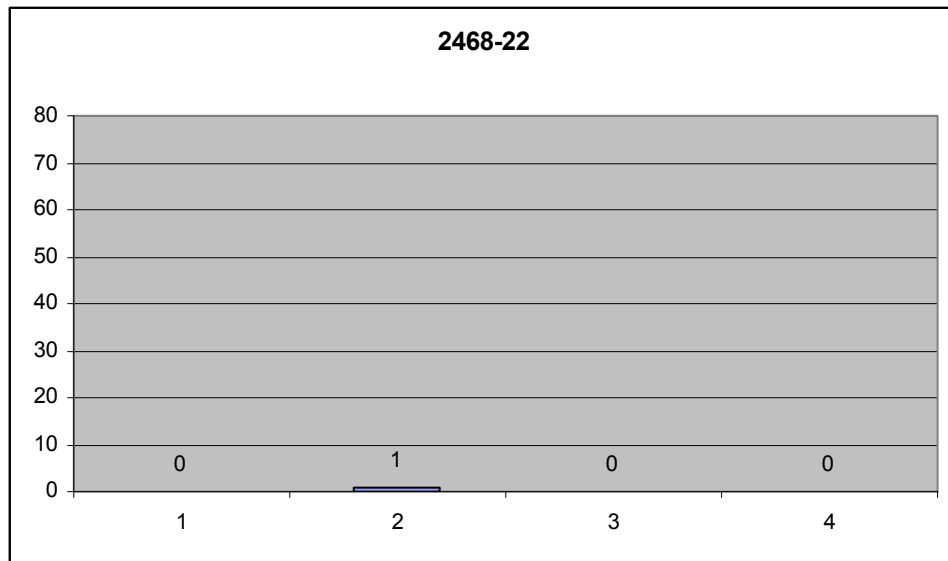
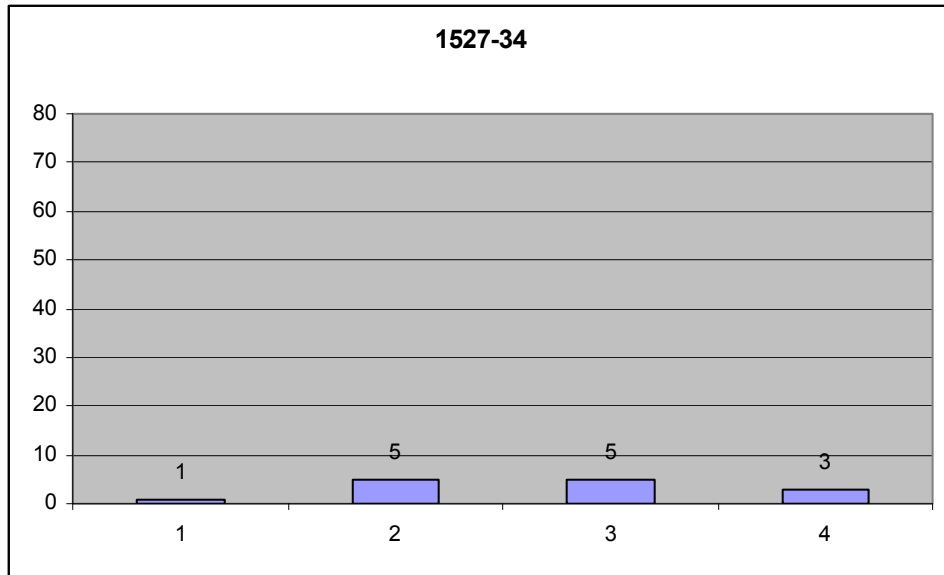
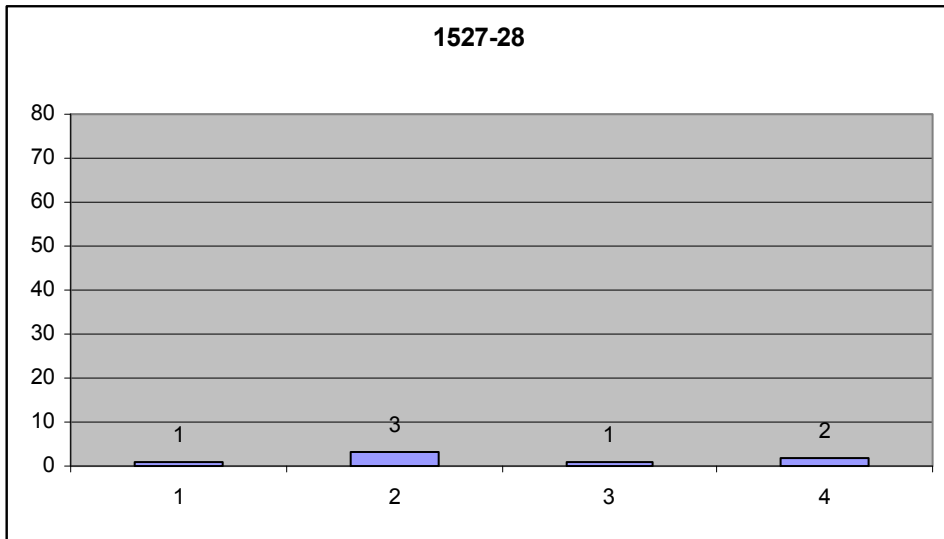
- Si pas de spécification, les échantillons sont du fumier de vache individuelle (n=29)
- En présence de contamination des 4 tubes, le dénombrement des colonies ne fut pas possible (n=3)
- Si ENV ajouté au titre, les échantillons sont de l'environnement (n=11)
- Le titre des graphiques correspond au numéro de troupeau-numéro de vache

Légende des axes :

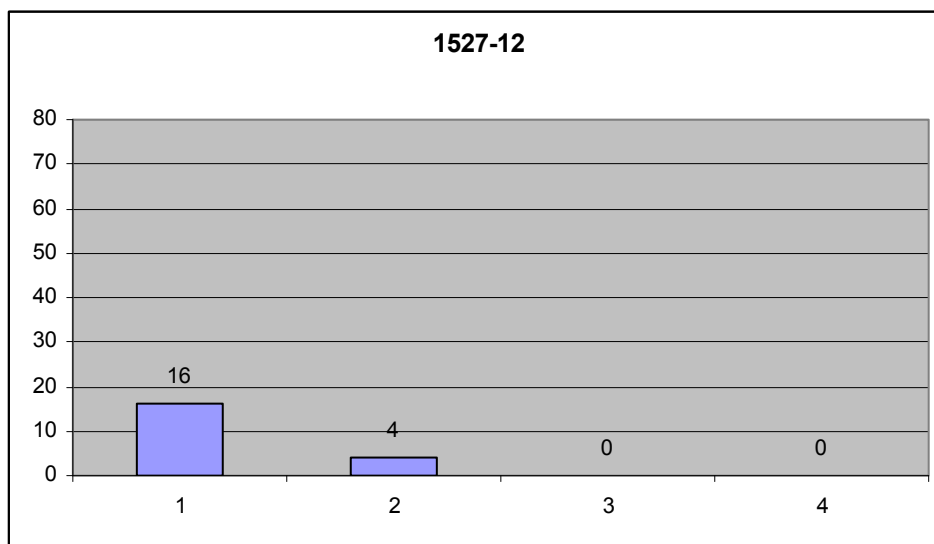
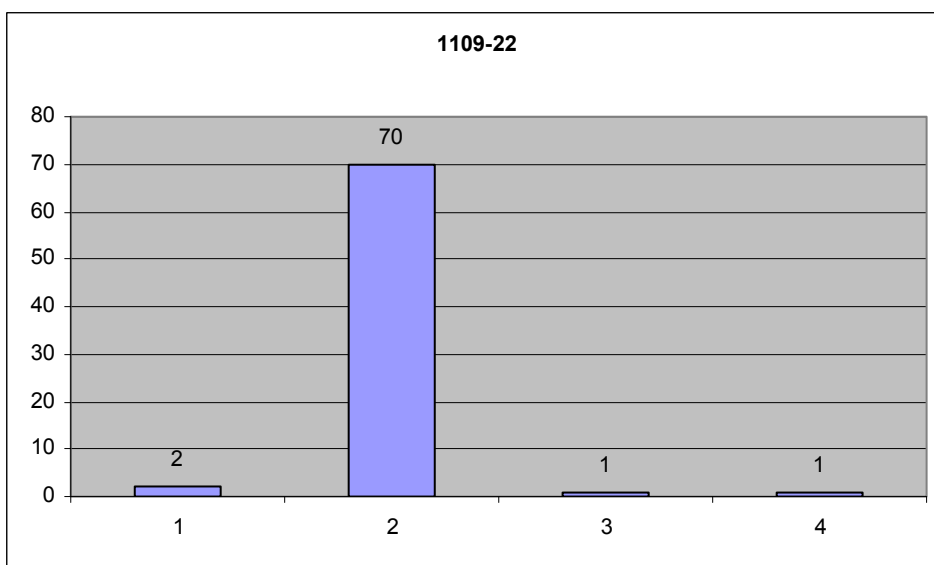
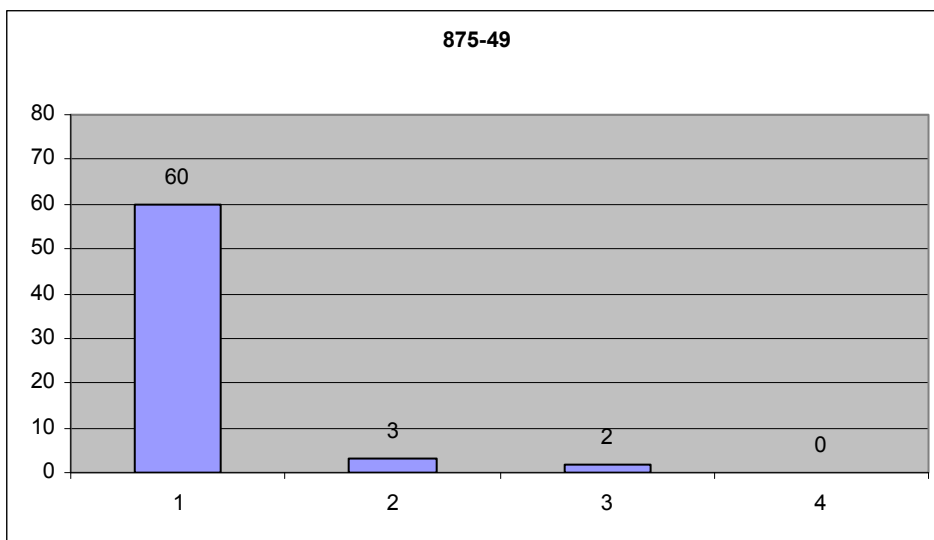
- Axe des abscisses : Nombre de colonies dénombrées par tube
- Axe des ordonnées : Numéro de chaque tube (1 à 4)

Nombre de colonies dénombrées : FAIBLE = 1-10 colonies (n=6)



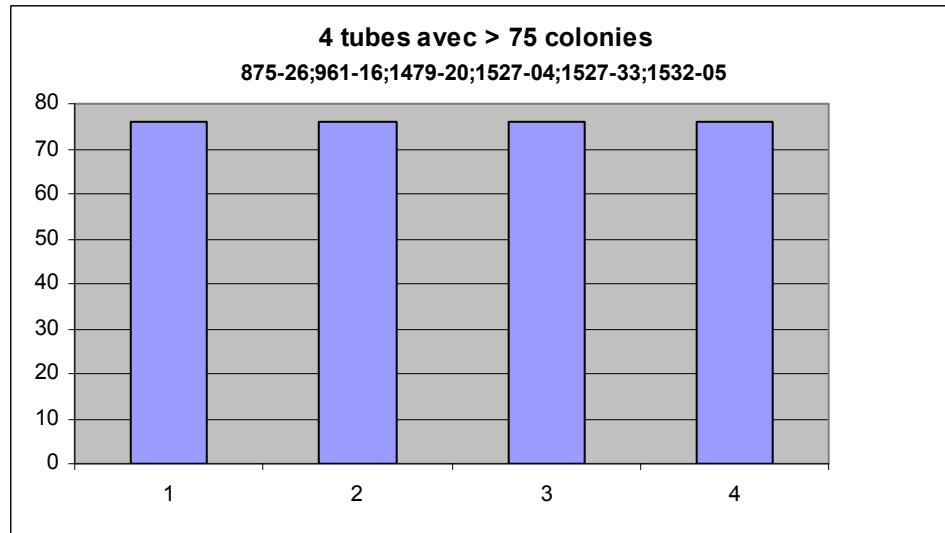


Nombre de colonies dénombrées : MODÉRÉ = 11-75 colonies (n=3)

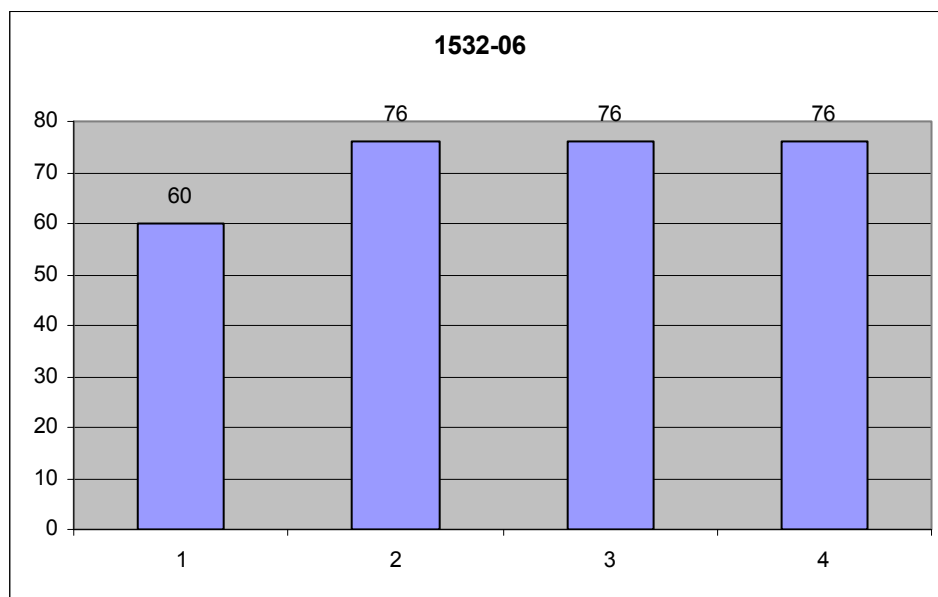


Nombre de colonies dénombrées : ÉLEVÉ = >75 colonies (n=12)

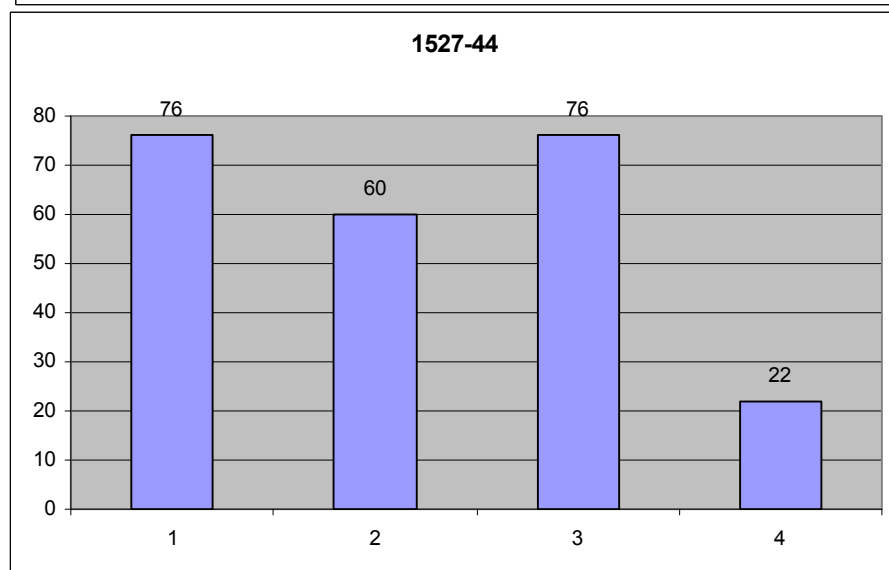
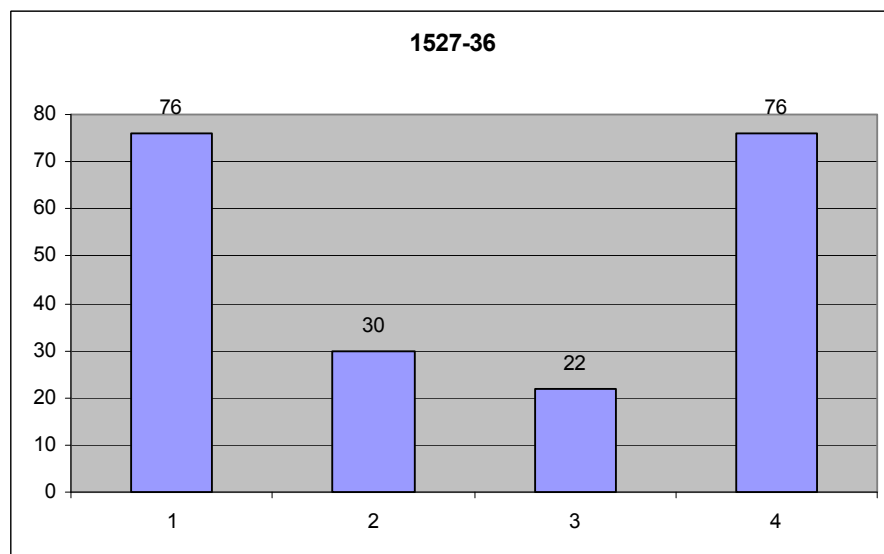
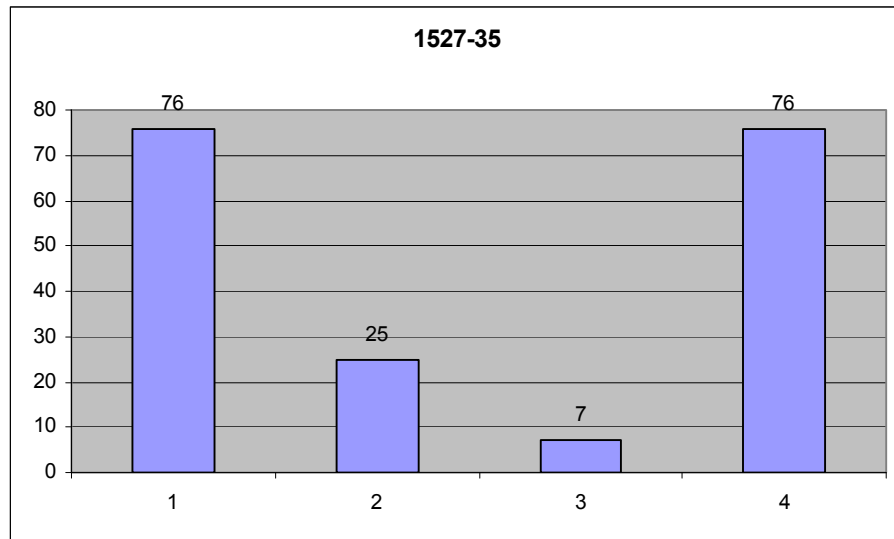
4 tubes avec > 75 colonies (n=6)



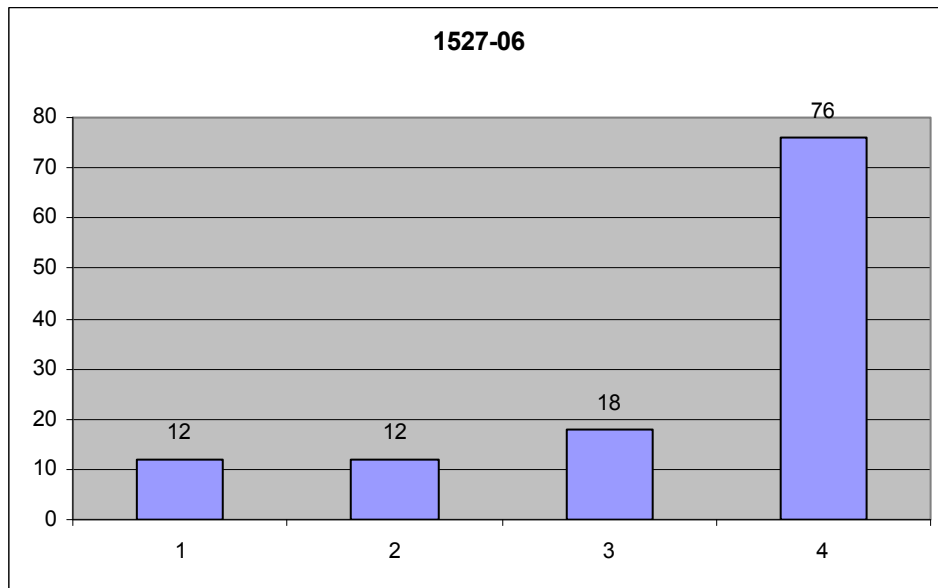
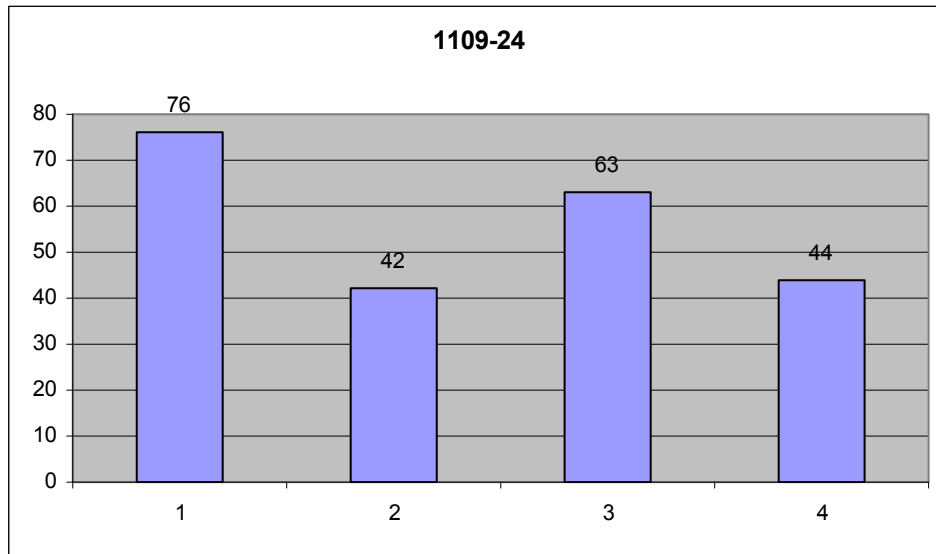
3 tubes avec > 75 colonies (n=1)



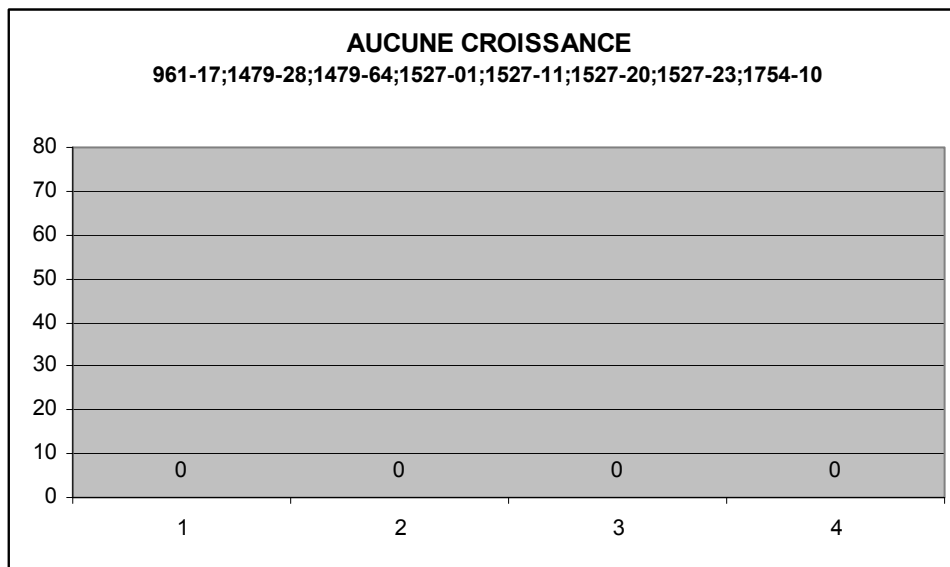
2 tubes avec > 75 colonies (n=3)



1 tube avec > 75 colonies (n=2)

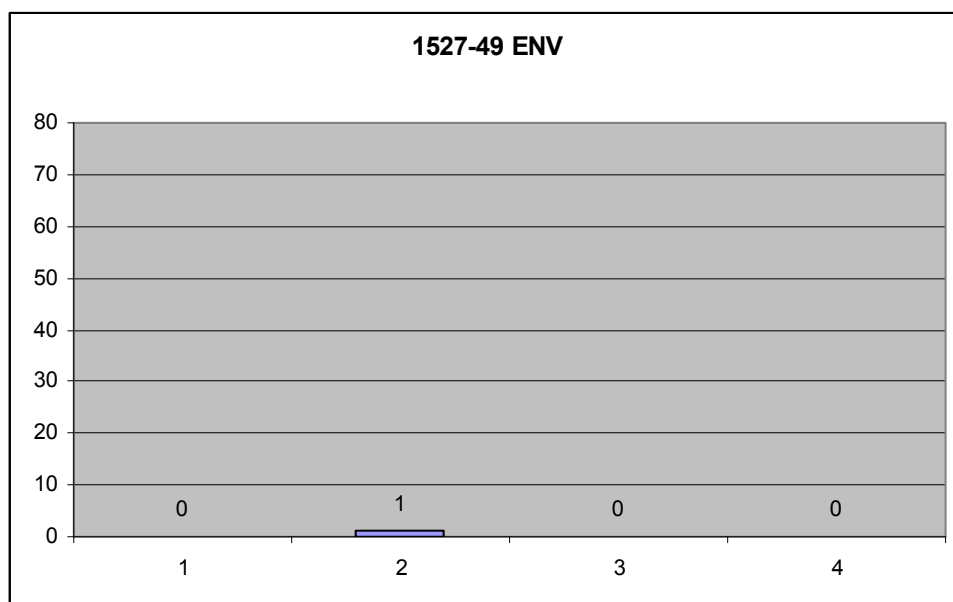


Nombre de colonies dénombrées : AUCUNE = 0 colonie (n=8)

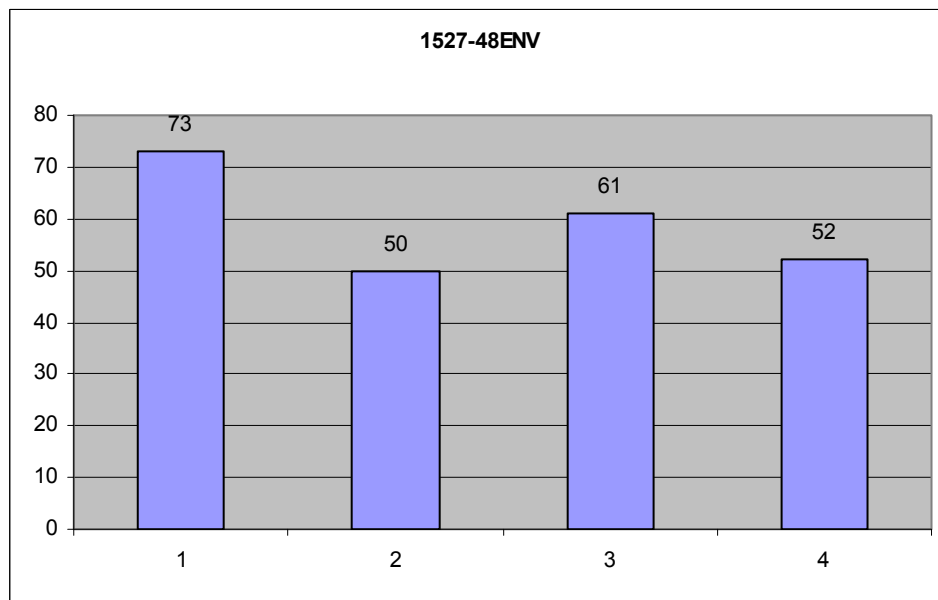
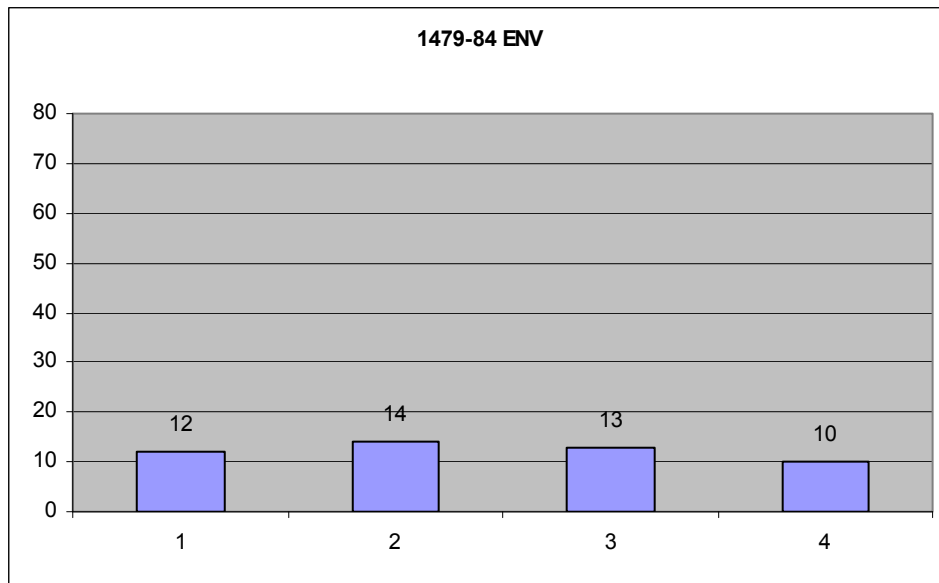


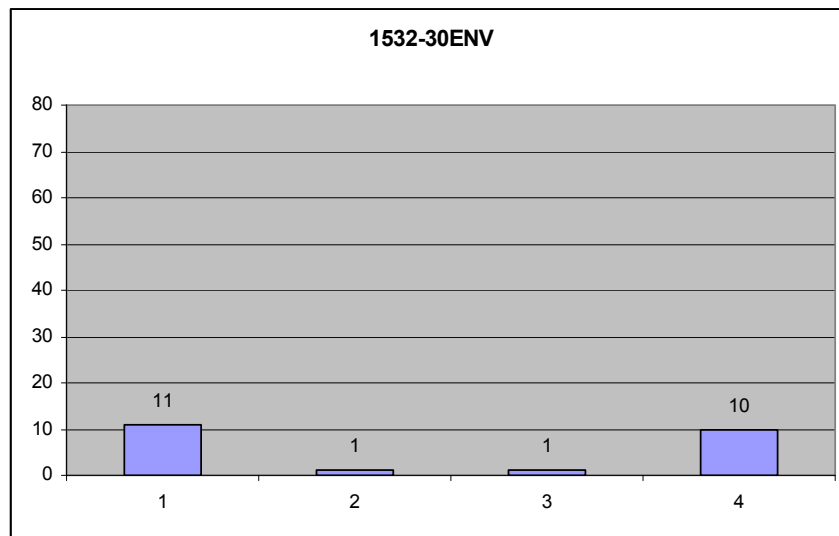
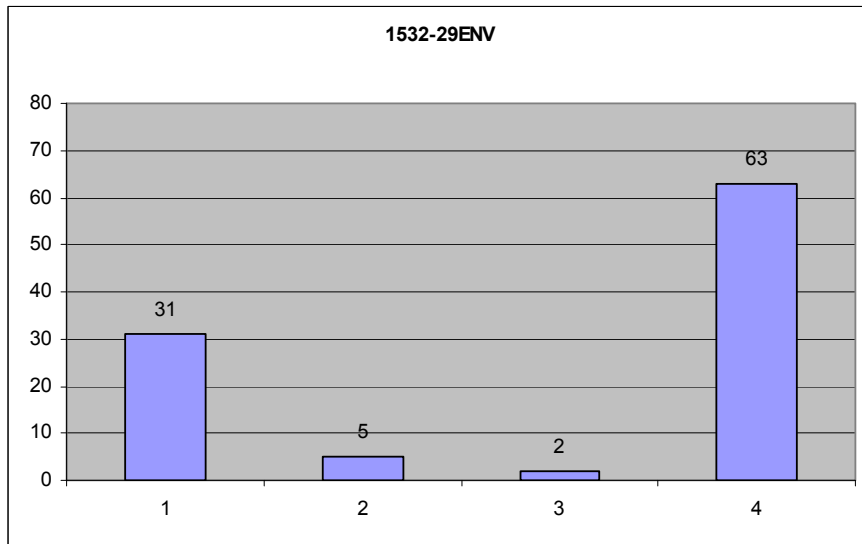
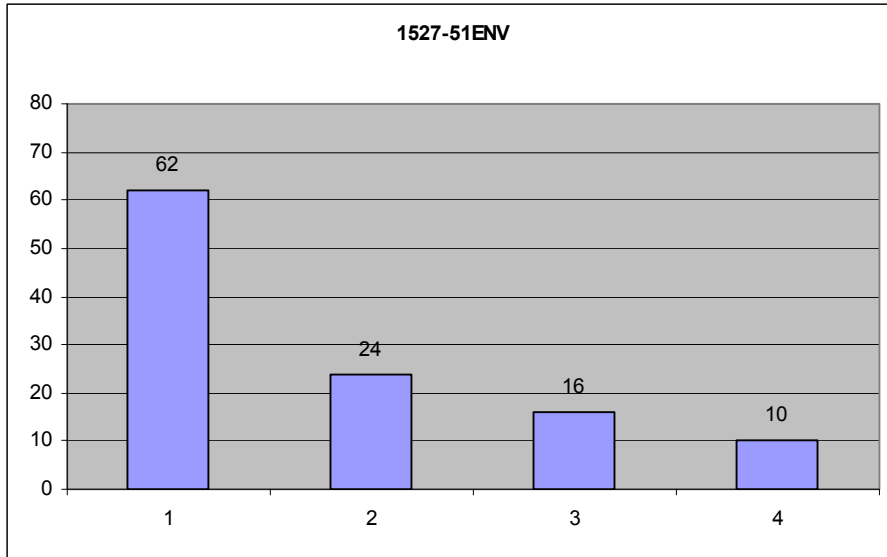
Pour les échantillons de l'environnement

Nombre de colonies dénombrées : FAIBLE = 1-10 colonies (n=1)



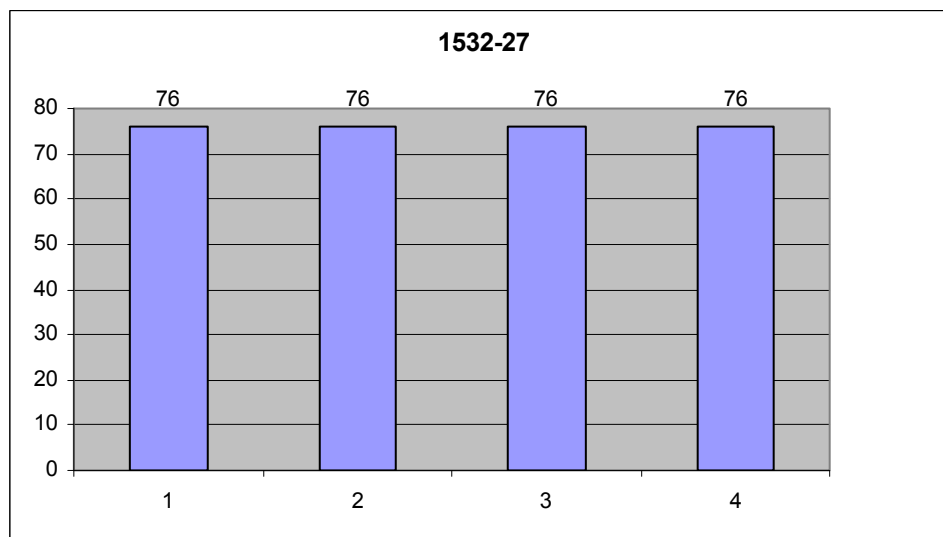
Nombre de colonies dénombrées : MODÉRÉ = 11-75 colonies (n=5)



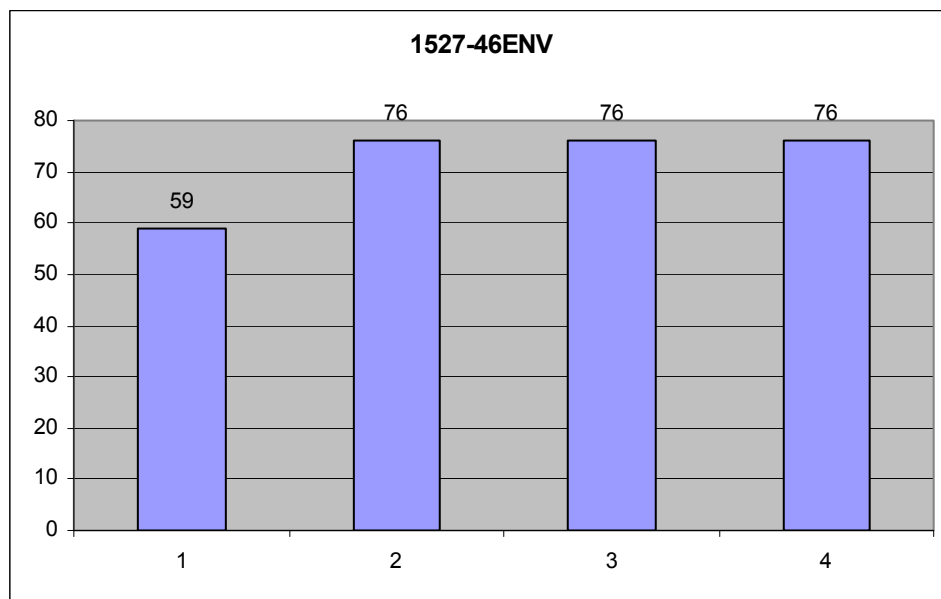


Nombre de colonies dénombrées : ÉLEVÉ =>75 colonies (n=5)

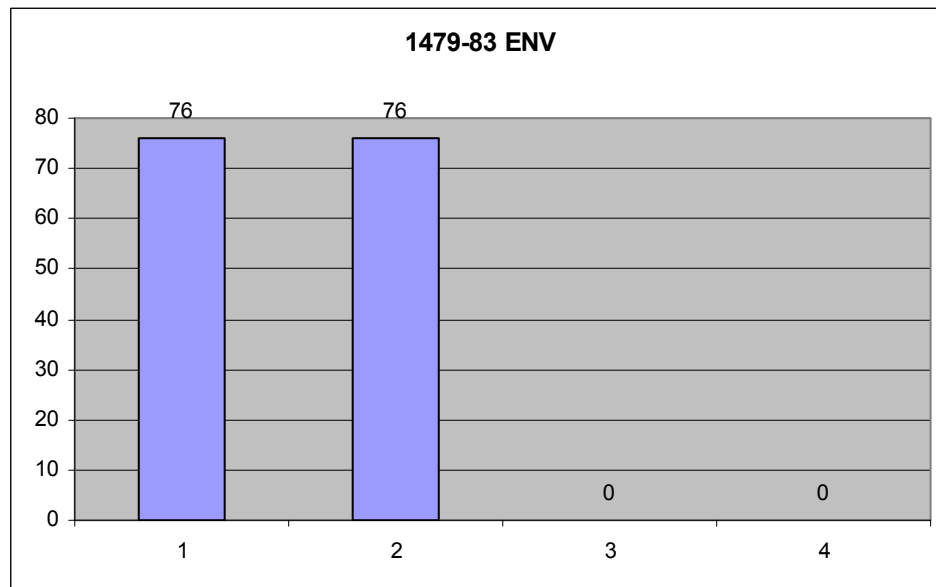
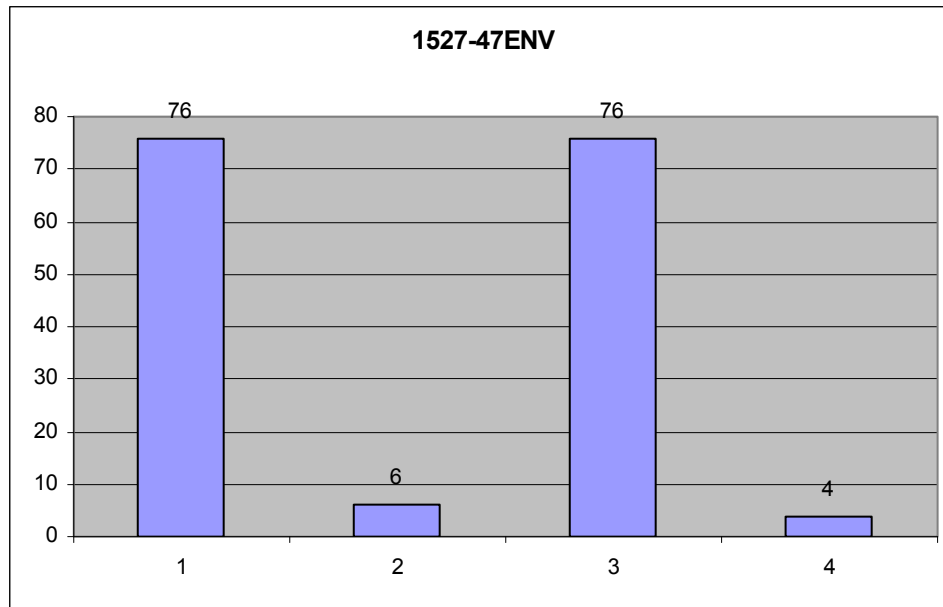
4 tubes avec > 75 colonies (n=1)



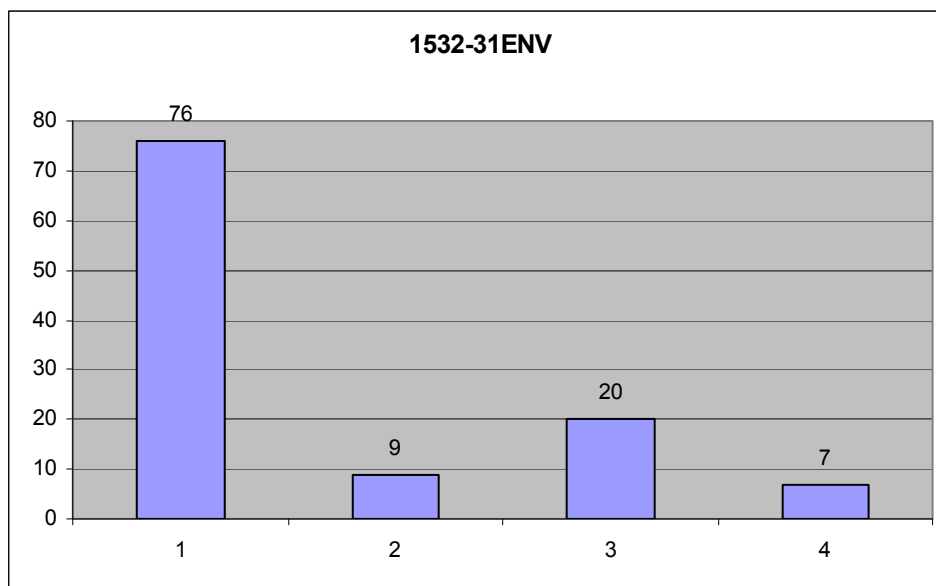
3 tubes avec > 75 colonies (n=1)



2 tubes avec > 75 colonies (n=2)



1 tube avec > 75 colonies (n=1)



Annexe 2: Web de causalité des facteurs de risque de la transmission du MAP

