

Université de Montréal

Détection des troupeaux laitiers infectés par *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* via la culture fécale et impact des mesures de contrôle des maladies entériques contagieuses sur l'incidence d'excrétion fécale individuelle

par Juan Carlos Arango Sabogal

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph. D.)
en sciences vétérinaires

Août 2017

© Juan Carlos Arango Sabogal, 2017

RÉSUMÉ

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* (MAP) est l'agent étiologique de la paratuberculose (PTB) une maladie entérique contagieuse, chronique et incurable des ruminants, qui est associée à des pertes significatives pour l'industrie laitière. Le MAP a été associé à la maladie de Crohn chez l'humain mais le lien de causalité n'a pas encore été démontré. Les programmes de contrôle de la PTB visent à diminuer la transmission via la mise en place de bonnes pratiques de régie. Au Québec, le programme de prévention et contrôle (PVQPCP) a été lancé en 2007. Dans le PVQPCP, un questionnaire d'analyse du risque d'introduction et transmission de MAP est administré lors de l'adhésion. Le statut des fermes est déterminé avec la culture de prélèvements de l'environnement (CPE), une stratégie qui a été évaluée dans les grands troupeaux en stabulation libre aux États-Unis. Les résultats non interprétables (NI), dus à la surcroissance microbienne des échantillons, sont un frein à la détermination du statut des troupeaux. Les objectifs de cette thèse sont : 1) déterminer l'impact de l'adhésion des fermes laitières en stabulation entravée dans le PVQPCP sur l'incidence de l'excrétion fécale de MAP et 2) améliorer la stratégie de détection des troupeaux laitiers infectés par MAP.

Pour le premier objectif, un modèle à risque proportionnel de Cox a été utilisé pour comparer l'incidence d'excrétion fécale des vaches nées avant et après l'adhésion de la ferme au PVQPCP. Pour le deuxième objectif, 7 échantillons de l'environnement et 2 échantillons groupés (vaches malades et vaches maigres) ont été prélevés dans 24 troupeaux à statut connu (19 positifs et 5 négatifs) et comparés avec des prélèvements individuels (sanguins et fécaux) de toutes les vaches du troupeau. Dans un deuxième temps, la performance de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) avant et après l'incubation des échantillons dans le système automatisé a été évaluée sur 154 échantillons issus de l'environnement pour lesquels le statut à la culture bactérienne avait été déterminé au préalable (62 NI, 62 négatifs et 30 positifs).

Les résultats de cette thèse ont démontré que l'incidence et le risque d'excrétion fécales de MAP étaient significativement moindres chez les vaches nées après l'adhésion

de la ferme dans le PVQPCP que chez les vaches nées avant (IR=0,4; 95% IC: 0,2-0,8; HR=0,48; 95% IC: 0,23-0,98). L'hygiène inadéquate des vaches en préparation au vêlage (HR=3,4; 95% IC: 1,4-8,3) et le contact des veaux avec les vaches adultes ou leurs fèces (HR=2,7; 95% IC: 1,1-6,6) étaient significativement associés à un risque élevé d'excrétion fécale de MAP. De plus, la sensibilité de la CPE, si elle était répétée 2 fois, par rapport au statut du troupeau à MAP selon notre définition de cas était de 44% (IC 95%: 20%-70%). Elle est de 32% (IC 95%: 13%-57%) en utilisant aléatoirement le résultat d'un seul prélèvement. La meilleure stratégie d'échantillonnage était la combinaison des échantillons de la fosse, de l'écurie, du groupe de vaches malades et du groupe de vaches maigres. Finalement, la PCR a détecté l'ADN de MAP dans 1,6% des échantillons de l'environnement NI. La performance de la PCR était meilleure lorsqu'elle a été réalisée après *vs* avant l'incubation des échantillons en milieu liquide dans le système automatisé BACTEC ($P = 0,004$).

Ainsi, les résultats de cette thèse démontrent une diminution de l'excrétion fécale individuelle chez les vaches nées après l'adhésion des fermes au le PVQPCP. Cette diminution est probablement une conséquence de la réduction du risque de transmission à l'intérieur du troupeau via la mise en place de pratiques de régie qui évitent le contact des veaux avec les vaches adultes ou leurs fèces. La CPE est la meilleure stratégie (peu coûteuse et non invasive) par rapport aux tests individuels (culture or ELISA), pour déterminer le statut des troupeaux. Elle détecte notamment les troupeaux à haute prévalence, mais aussi ceux à faible prévalence. L'utilisation de la PCR sur les échantillons NI contribue à améliorer le processus de culture de MAP en augmentant la sensibilité et la spécificité et en évitant des délais et des coûts supplémentaires liés à la prise des nouveaux échantillons et aux cultures additionnelles.

Mots clés : *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*, troupeaux laitiers en stabulation entravée, incidence de l'excrétion fécale, programmes de prévention et contrôle, culture de prélèvements de l'environnement, statut des troupeaux, surcroissance microbienne.

ABSTRACT

Paratuberculosis is a chronic and contagious enteric disease of ruminants caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). This disease is responsible for significant economic losses and the bacteria itself has been associated to Crohn's disease in humans; even though the causal link has not been established. Paratuberculosis control programs focus on reducing MAP transmission by implementing better management practices that target infection routes. In Québec, a Voluntary Paratuberculosis Prevention and Control Program (QVPPCP) was launched in 2007. Upon enrolment in the QVPPCP, a risk assessment questionnaire is administered to determine the risk of introduction and transmission of MAP into the herd. Herd status is then determined by environmental sampling (ES). The ES has been previously evaluated mostly in large free-stall dairy herds in the US. Microbial overgrowth can interfere with the correct assessment of MAP herd status when non-interpretable (NI) results are obtained from environmental samples. The objectives of this thesis are: 1) to determine the impact of enrolment in the QVPPCP on the incidence of fecal excretion of MAP and 2) to improve the detection of MAP infected tie-stall dairy herds.

A cohort study was design to answer to the first objective. The incidence of fecal excretion of cows born before and after the enrolment of the farms in the QVPPCP was compared using a Cox proportional hazards model. The second objective included two other studies. In one study, 7 environmental and 2 targeted pool samples were collected from 24 herds with MAP known status (19 positive and 5 negative herds) and compared with serum and fecal individual samples from all the adult cows in the herd. The other study evaluated the performance of the polymerase chain reaction (PCR) before and after the incubation of the samples in the automated system. The PCR was performed on 154 samples (62 NI, 62 negative and 30 positive).

It was demonstrated that the incidence and hazard of fecal excretion were significantly lower for cows born after the enrolment of the farm in the QVPPCP than for cows born before (incidence rate ratio=0.4; 95% CI: 0.2-0.8 and hazard ratio (HR)=0.48; 95% CI: 0.23-0.98). Poor calving cow hygiene (HR=3.4; 95% CI: 1.4-8.3) and contact

between pre-weaned heifers and adult cows or their feces (HR=2.7; 95% CI: 1.1-6.6) were significantly associated with an increased hazard of fecal excretion of MAP. In addition, the sensitivity of environmental culture was 44% (95% CI: 20%-70%) when combining results from 2 different samplings and 32% (95% CI: 13%-57%) when results from only 1 random sampling were analyzed. It was found that the best sampling strategy was to combine samples from the manure pit, gutter, sick cows, and cows with poor body condition. Finally, a total of 1.6% of the NI environmental samples had detectable MAP DNA. The PCR had a significantly greater performance when applied after the culture than before the culture ($P = 0.004$).

Thus, the results of this thesis show a reduction of the fecal excretion of MAP in cows born after enrolment of farms in the QVPPCP. The lower fecal excretion is probably a consequence of the reduction of the risk of within-herd transmission of MAP which is likely achieved through the implementation of better management practices aiming to reduce the contact of calves with adult cows or their feces. ES is the best sampling strategy as compared to costly individual tests (culture or ELISA) for detecting MAP-infected tie-stall dairy herds. It is a non-expensive and non-invasive technique for detecting mainly high MAP prevalence herds. However, our results show that it also detects low MAP prevalence herds. Performing a PCR on overgrown environmental samples contributes to MAP culture process improvement increasing the sensitivity and specificity, and reducing the turnaround laboratory time.

Keywords : *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, tie-stall dairy herds, incidence of fecal excretion, prevention and control program, environmental sampling, herd status, microbial overgrowth.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES FIGURES	xv
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xvi
DÉDICACE	xix
REMERCIEMENTS	xx
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
CHAPITRE 2 : REVUE DE LITTÉRATURE	6
2.1 Généralités de la paratuberculose.....	7
2.1.1 Importance de la paratuberculose.....	7
2.1.1.1 Distribution de la paratuberculose.....	8
2.1.1.2 Pertes économiques associées à la paratuberculose	8
2.1.1.3 Association de MAP avec la maladie de Crohn	9
2.1.1.4 Impacts de la paratuberculose sur les marchés d’exportation	10
2.1.1.5 Modèle intéressant pour le contrôle des maladies entériques contagieuses avec porteurs sains ou difficiles à détecter	11
2.1.2 Agent causal : <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	11
2.1.2.1 Souches de MAP	13
2.2 Épidémiologie et pathogenèse de la paratuberculose	14
2.2.1 Transmission de MAP	14
2.2.2 Âge des animaux et risque d’infection par MAP	15
2.2.3 Pathogenèse de la paratuberculose.....	16
2.2.3.1 Stade silencieux.....	19
2.2.3.2 Stade subclinique.....	21

2.2.3.2.1 Patrons d'excrétion fécale et animaux « super excréteurs »	22
2.2.3.3 Stades clinique et clinique avancé	23
2.3 Dépister de la paratuberculose	24
2.3.1 Tests diagnostiques pour la paratuberculose	24
2.3.1.1 Tests directs pour le dépistage <i>antemortem</i> de la paratuberculose	25
2.3.1.1.1 Histopathologie	25
2.3.1.1.2 Bactérioscopie	26
2.3.1.1.3 Culture bactérienne	26
2.3.1.1.3.1 Décontamination des échantillons fécaux	26
2.3.1.1.3.2 Incubation des échantillons dans le système automatisé	31
2.3.1.1.3.3 Identification de MAP	31
2.3.1.1.3.4 Interprétation des résultats des étapes impliqués dans le processus de culture	32
2.3.1.1.3.5 Surcroissance microbienne	33
2.3.1.1.4 Réaction en chaîne par polymérase	34
2.3.1.2 Tests indirects pour le dépistage de la paratuberculose	36
2.3.1.2.1 Test ELISA	36
2.3.1.3 Questionnaire d'analyse de risque	37
2.3.1.4 Performance des tests individuels selon le stade d'infection de l'animal	38
2.3.2 Stratégies de dépistage de la paratuberculose	40
2.3.2.1 Déterminer le statut d'un troupeau	40
2.3.2.1.1 Culture bactérienne des prélèvements de l'environnement	40

2.3.2.1.2	Échantillons individuels poolés	41
2.3.2.1.3	Échantillonner un sous-groupe d'animaux	42
2.3.2.1.4	Lait de réservoir	42
2.3.2.2	Estimer la prévalence de la paratuberculose dans l'élevage	43
2.3.2.3	Identifier les animaux qui contribuent à la contamination de l'environnement de la ferme afin de contrôler la maladie dans un troupeau fortement infecté	43
2.3.2.4	Identifier les animaux infectés dans un troupeau positif inscrit dans un programme de contrôle	44
2.3.2.5	Dépister les animaux avant l'introduction dans un troupeau	45
2.4	Contrôler la paratuberculose	45
2.4.1	Facteurs de risque pour la paratuberculose	46
2.4.1.1	Facteurs de risque d'introduction de MAP	46
2.4.1.2	Facteurs de risque de transmission de MAP	47
2.4.1.2.1	Facteurs de risque au vêlage	48
2.4.1.2.2	Facteurs de risque associés à l'alimentation	48
2.4.1.2.3	Facteurs de risque lors de l'élevage des veaux	49
2.4.2	Revue des publications portant sur le contrôle de MAP	50
2.4.2.1	Modèles mathématiques	50
2.4.2.1	Études de cohorte	50
2.4.3	Revue des programmes de contrôle dans le monde	51
2.4.3.1	Initiatives à l'origine des programmes de prévention et contrôle de la paratuberculose	52
2.4.3.2	Participation dans les programmes de prévention et contrôle de la paratuberculose	52

2.4.3.3 Objectifs des programmes de prévention et contrôle de la paratuberculose.....	53
2.4.3.4 Éléments clés des programmes de prévention et contrôle de la paratuberculose.....	54
2.4.3.5 Stratégies de dépistage utilisées dans les programmes de prévention et contrôle de la paratuberculose.....	56
2.4.3.6 Défis les plus fréquemment rencontrés dans les programmes de prévention et contrôle de la paratuberculose	57
2.4.3.7 Leçons retenues dans les programmes de prévention et contrôle de la paratuberculose.....	57
CHAPITRE 3 : HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	59
CHAPITRE 4 : INCIDENCE D'EXCRÉTION FÉCALE DE MYCOBACTERIUM AVIUM SSP. PARATUBERCULOSIS CHEZ LES VACHES LAITIÈRES NÉES AVANT ET APRÈS L'ADHÉSION DES FERMES AU PROGRAMME VOLONTAIRE QUÉBÉCOIS DE PRÉVENTION ET CONTRÔLE.....	61
4.1 Introduction.....	66
4.2 Materials and Methods.....	69
4.3 Results.....	77
4.4 Discussion.....	80
4.5 Conclusions.....	88
4.6 References.....	104
CHAPITRE 5 : DÉTECTION DE <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i> SSP. <i>PARATUBERCULOSIS</i> DANS LES TROUPEAUX LAITIERS EN STABULATION ENTRAVÉE À L'AIDE DE LA CULTURE BACTÉRIENNE DES PRÉLÈVEMENTS DE L'ENVIRONNEMENT ET DES ÉCHANTILLONS POOLÉS CIBLÉS	109
5.1 Introduction.....	113
5.2 Materials and Methods.....	115
5.3 Results.....	120
5.4 Discussion.....	123

5.5 References	127
CHAPITRE 6 : ÉVALUATION DE LA PCR SUR DES ÉCHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX NON INTERPRÉTABLES CULTIVÉS POUR <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i> SSP. <i>PARATUBERCULOSIS</i>	137
6.1 Introduction	140
6.2 Materials and Methods	143
6.3 Results	146
6.4 Discussion	149
6.5 References	154
CHAPITRE 7 : DISCUSSION GÉNÉRALE	161
7.1 Impact de l'adhésion des fermes laitières en stabulation entravée dans le PVQPCP et de la mise en place de mesures de contrôle des maladies entériques contagieuses sur l'incidence de l'excrétion fécale de MAP	162
7.2 Amélioration de l'identification des troupeaux laitiers infectés par MAP	170
7.3 Enjeux et défis liés à la réalisation d'une étude longitudinale de 5 ans	180
7.4 Perspectives futures	185
7.4.1 Optimisation du score de risque d'introduction et de transmission de MAP	186
7.4.2 Sensibilité et spécificité de la culture fécale en milieu liquide à l'aide d'une analyse de classe latente	188
7.4.3 Évaluation de la PCR directe sur les échantillons issus de l'environnement pour la détection des troupeaux positifs à MAP	189
7.4.4 Corrélation entre la culture de prélèvements de l'environnement et la prévalence à la culture fécale individuelle à l'intérieur du troupeau	188
7.4.5 Amélioration de la compréhension du phénomène de la surcroissance microbienne en décrivant les caractéristiques de croissance des échantillons NI au laboratoire	189
7.4.6 Amélioration du protocole de décontamination des échantillons fécaux	189

CHAPITRE 8: CONCLUSIONS GÉNÉRALES	191
BIBLIOGRAPHIE.....	193
ANNEXES	xxii
Annexe 1. Comparaison du score à l'adhésion (Q0) et du score final (Q-final) par ferme et par section du questionnaire.....	xxiii
Annexe 2. Evaluation of a PCR assay on overgrown individual fecal samples cultured for <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (Article communication courte).....	xxv
Annexe 3. Schéma décrivant les résultats possibles des échantillons individuels donnant un signal positif dans un système automatisé d'incubation utilisé dans le processus de culture de <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	xxx
Annexe 4. Schéma décrivant les résultats possibles des échantillons de l'environnement donnant un signal positif dans un système automatisé d'incubation utilisé dans le processus de culture de <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	xxxii
Annexe 5. Bulletins d'information sur la paratuberculose (7 numéros)	xxxiv

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 2 : REVUE DE LITTÉRATURE

Tableau 2.1. Interprétation des résultats aux différentes étapes impliqués dans le processus de culture bactérienne de *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* réalisé au Laboratoire d'épidémiosurveillance animale du Québec.....33

Tableau 2.2. Sensibilité et spécificité de la culture fécale et de l'ELISA sur le sérum et le lait pour le diagnostic de *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* chez les animaux infectés asymptomatiques excréteurs.....39

CHAPITRE 4 : INCIDENCE D'EXCRÉTION FÉCALE DE MYCOBACTERIUM AVIUM SSP. PARATUBERCULOSIS CHEZ LES VACHES LAITIÈRES NÉES AVANT ET APRÈS L'ADHÉSION DES FERMES AU PROGRAMME VOLONTAIRE QUÉBÉCOIS DE PRÉVENTION ET CONTRÔLE

Table 4.1. Number of questions and maximum score by section of the risk assessment questionnaire used to evaluate the risk of within-herd transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy herds enrolled in the Québec Voluntary Paratuberculosis Prevention and Control Program.....90

Table 4.2. Description of calf rearing management practices for the evaluation of the risk of within-herd transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy herds enrolled in the Québec Voluntary Paratuberculosis Prevention and Control Program.....91

Table 4.3. Year of enrolment, number and proportion of individual positive fecal culture results for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in 18 herds enrolled in the Québec Voluntary Paratuberculosis Prevention and Control Program.....93

Table 4.4. Risk assessment score (RAS) of within-herd transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in 18 positive dairy herds enrolled in the Québec Voluntary Paratuberculosis Prevention and Control Program.....94

Table 4.5. Incidence density rate and univariable analysis for potential predictors of time to individual fecal excretion of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (events) in 18 positive dairy herds enrolled in the Québec Voluntary Paratuberculosis Prevention and Control Program.....95

Table 4.6. Incidence density rate at the herd level of individual fecal excretion of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in 18 positive dairy herds enrolled in the Québec Voluntary Paratuberculosis Prevention and Control Program.....98

Table 4.7. Final Cox proportional hazards models of the effect of the cohort (model 1), risk assessment score (RAS; model 2) and calf rearing management practices (model 3) on the time at individual fecal excretion of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in 18 dairy herds enrolled in the Québec Voluntary Paratuberculosis Prevention and Control Program99

CHAPITRE 5 : DÉTECTION DE *MYCOBACTERIUM AVIUM* SSP. *PARATUBERCULOSIS* DANS LES TROUPEAUX LAITIERS EN STABULATION ENTRAVÉE À L'AIDE DE LA CULTURE BACTÉRIENNE DES PRÉLÈVEMENTS DE L'ENVIRONNEMENT ET DES ÉCHANTILLONS POOLÉS CIBLÉS

Table 5.1. Environmental and targeted pooled samples for identifying tie-stall dairy herds infected with MAP132

Table 5.2. Herd characteristics and WHP of MAP (estimated using IFC or serum ELISA) and number of positive environmental and targeted pooled cultures for 2 sampling seasons in 24 tie-stall dairy herds in Quebec133

Table 5.3. Combinations of test results for either a single visit or 2 visits to detect MAP in tie-stall dairy herds in Quebec135

Table 5.4. Distribution of MAP-positive sites on 8 farms tested by environmental and targeted pooled sampling136

CHAPITRE 6 : ÉVALUATION DE LA PCR SUR DES ÉCHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX NON INTERPRÉTABLES CULTIVÉS POUR *MYCOBACTERIUM AVIUM* SSP. *PARATUBERCULOSIS*

Table 6.1. Growth units and days to detection of environmental samples collected from Québec dairy herds cultured for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection at 2 different times158

Table 6.2. Results of a PCR method to detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* when applied before and after the incubation of environmental samples collected from Québec dairy herds in a commercial automated culture system.....159

Table 6.3. Comparative quantification cycle (Cq) values of a PCR method when applied before and after the culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from environmental samples collected from Québec dairy herds160

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 2 : REVUE DE LITTÉRATURE

Figure 2.1. Évolution de l'infection par *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* et stades de la maladie18

Figure 2.2 Protocole de traitement des fèces pour la culture de *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* au Laboratoire d'épidémiosurveillance animale du Québec30

CHAPITRE 4 : INCIDENCE D'EXCRÉTION FÉCALE DE MYCOBACTERIUM AVIUM SSP. PARATUBERCULOSIS CHEZ LES VACHES LAITIÈRES NÉES AVANT ET APRÈS L'ADHÉSION DES FERMES AU PROGRAMME VOLONTAIRE QUÉBÉCOIS DE PRÉVENTION ET CONTRÔLE

Figure 4.1. Left-truncation of time at risk (TAR) for 4 different cows101

Figure 4.2. Evolution of the risk assessment score (RAS; mean and 95% confidence interval) of within-herd transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in 18 dairy herds enrolled in the Québec Voluntary Paratuberculosis Prevention and Control Program (QVPPCP).....103

Figure 4.3. Kaplan-Meier failure plots for time to individual fecal excretion of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by 2 predictors in 18 dairy herds enrolled in the Québec Voluntary Paratuberculosis Prevention and Control Program.....104

CHAPITRE 5 : DÉTECTION DE *MYCOBACTERIUM AVIUM* SSP. *PARATUBERCULOSIS* DANS LES TROUPEAUX LAITIERS EN STABULATION ENTRAVÉE À L'AIDE DE LA CULTURE BACTÉRIENNE DES PRÉLÈVEMENTS DE L'ENVIRONNEMENT ET DES ÉCHANTILLONS POOLÉS CIBLÉS

Figure 5.1. Of 24 herds, identification of those herds positive for MAP at either sampling using 3 detection methods131

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAR: Acido alcoolo-résistant

ADN: Acide désoxyribonucléique

AC: *Adult cows*

AFB: *Acid fast bacilli*

AIC: *Akaike's Information Criterion*

AMB: Amphotéricine B

BIC: *Bayesian Information Criterion*

BCS: *Body condition score*

BHI: *Brain heart infusion*

BH: *Bred heifers*

CA: *Calving Area*

CI: *Confidence Interval*

CPE: Culture de prélèvements de l'environnement

Cq: *Quantification cycle*

CTR: Ceftriaxone

CR : Count ratio

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EC: *Environmental culture*

ES: *Environmental sampling*

FAP: *Fibronectin Attachment Protein*

FC: *Fecal culture*

HR: *Hazard Ratio*

HPC: *Hexadecylpyridinium chloride*

IAP: *International Association for Paratuberculosis*

IC: Intervalle de confiance

IFC: *Individual fecal culture*

IFN- γ : Interféron gamma

IgG: Immunoglobulines G

IR: *Incidence Rate Ratio*

JDDHP: *Johne's Disease Demonstration Herd Project*

LÉAQ: Laboratoire d'épidémiosurveillance animale de Québec

LR: *Likelihood Ratio*

MAC: *Mycobacterium avium* complex

MAP: *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*

MAPAQ: Ministère de l'Agriculture, de Pêcheries et de l'Alimentation

NAL: Acide nalidixique

NI: Non interprétable

OR: *Odds Ratio*

PCR: Réaction en chaîne par polymérase

PTB: Paratuberculose

PVQPCP: Programme volontaire québécois de prévention et contrôle de la paratuberculose

PWH: *Pre-waned heifers*

QVPPCP: *Québec Voluntary Paratuberculosis Prevention and Control Program*

RAS: *Risk Assessment Score*

SE: *Standard error*

TPS: *Targeted Pooled Samples*

TAR: *Time at risk*

UFC: Unité formant colonie

USDA: *United States Department of Agriculture*

VPN: Valeur prédictive négative

VPP: Valeur prédictive positive

WH: *Weaned heifers*

WHP: *Within herd prevalence*

Esta tesis, como todo lo que yo hago, es obviamente PGDD.

Dedicada a mis padres y a Angélica.

REMERCIEMENTS

« Si j'ai vu plus loin, c'est en montant sur les épaules de géants » Isaac Newton (1676).

D'abord et surtout, merci à Dieu de m'avoir permis de vivre cette expérience enrichissante et de m'avoir donné l'opportunité de rencontrer des personnes merveilleuses (ces géants) qui m'ont inspiré tout au long de mon cheminement PhD.

J'ai énormément de gratitude pour mon directeur et mentor, le Dr Gilles Fecteau, de m'avoir accepté comme étudiant et permis de faire partie de ce projet extraordinaire. Je vous remercie pour votre soutien inconditionnel et pour avoir mis à ma disposition toutes les ressources nécessaires au bon développement de mon potentiel. Votre sagesse et votre passion seront pour moi une source d'inspiration.

Je remercie également mon codirecteur, Dr John Morris Fairbrother, pour l'orientation et les conseils; ainsi que les autres membres de mon comité-conseil, les Drs Julie Paré et Daniel Jean, pour leur soutien et leur encadrement dispensés tout au long de mon parcours à l'Université de Montréal.

J'aimerais aussi remercier les autres collaborateurs du groupe de recherche sur la paratuberculose, à savoir les Drs Sébastien Buczinski, Jean-Philippe Roy, Olivia Labrecque, Julie-Hélène Fairbrother, Vincent Wellemans, Geneviève Côté, Maria Puerto, Nathalie Bissonnette, Elizabeth Doré et Saray Rangel. Ce fut un énorme plaisir pour moi d'intégrer cette merveilleuse équipe. Chaque réunion et échange avec vous était une opportunité d'apprentissage. Merci pour votre encadrement et le partage de vos connaissances, votre expertise ainsi que vos qualités humaines.

Je remercie les Drs Julie Arsenault, Allen Roussel et Jocelyn Dubuc pour m'avoir fait l'honneur d'être membres de mon jury de soutenance de thèse.

Je remercie aussi les médecins vétérinaires collaborateurs de nos projets de recherche, notamment le Dr Walter Verhoef pour son engagement tout au long de cette

étude et pour sa patience pendant la formation durant les prélèvements. Également, je remercie les producteurs laitiers participants pour leur collaboration dans l'étude.

Merci également au Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, au Programme de soutien à l'innovation en agroalimentaire, le Programme Innov'Action, à Pfizer-Zoetis et au regroupement de recherche Op+Lait pour leur soutien financier.

Je tiens à remercier les Professeurs des cycles supérieurs de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal pour avoir contribué, orienté et facilité l'apprentissage du contenu des cours.

Merci encore à Christine Blondin, Diane Rodier, Annie Bernier, Annie Lavertu, Geneviève Michon, Isabelle Codo, Eliane Auger, Catherine Brès et David Champigny pour leur aide et orientation lors des démarches à la faculté.

Agradezco a mi familia por el ejemplo y el apoyo que siempre me han brindado. A mi madre Berta de quien aprendí la perseverancia y la disciplina. A mi padre Jesús de quien aprendí la solidaridad y el servicio al prójimo. A mi hermano Daniel quien, además de tener un gran sentido del humor, es para mí un ejemplo de tenacidad. Finalmente, agradezco a mi abuela (y amiga) Angélica, nuestro ángel, en quien vi todas estas cualidades reunidas: “que bello Abril sos vos”.

CHAPITRE 1
INTRODUCTION

INTRODUCTION

La paratuberculose (PTB) est une maladie entérique contagieuse, chronique et incurable des ruminants. Cette maladie occasionne des pertes significatives associées à la diminution de la production laitière, aux réformes précoces et à la perte de valeur de la carcasse à l'abattage (Hendrick, Kelton et al. 2005; Lombard, Garry et al. 2005; Kudahl and Nielsen 2009). L'agent étiologique de la PTB, *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP), a été associée avec la maladie de Crohn chez l'humain, (Hermon-Taylor 2001; Scanu, Bull et al. 2007) mais le lien de causalité n'a pas encore été démontré (Waddell, Rajic et al. 2015). La voie féco-orale est la principale route de transmission de MAP (Manning and Collins 2010) et les jeunes animaux sont les plus susceptibles à l'infection (Windsor and Whittington 2010). Le contact des veaux avec les fèces de vaches adultes est considéré comme le facteur de risque le plus important pour la transmission de MAP (Doré, Paré et al. 2012). Même si l'infection survient à un âge précoce, l'excrétion et les signes cliniques sont observés à un âge plus avancé (Nielsen and Ersboll 2006). Une particularité de la PTB est le fait d'avoir une période d'incubation plus longue que la période latente, permettant l'apparition des animaux excréteurs asymptomatiques. La difficulté de détecter ces animaux ainsi que la capacité de MAP de survivre dans l'environnement posent un défi pour le contrôle de la PTB. Étant donné la période d'incubation très longue de la PTB, un minimum de 4 à 5 ans est nécessaire pour étudier l'évolution de la maladie (Pillars, Grooms et al. 2011). Les études longitudinales prospectives sont idéales pour évaluer les changements dans l'incidence de la maladie après la mise en place de mesures de contrôle sur la ferme. Par contre, ces études sont longues et coûteuses (requièrent beaucoup de ressources économiques et humaines). Par conséquent, peu d'études longitudinales ont été publiées portant sur le suivi de la PTB (≥ 5 ans) après la mise en place de mesures de contrôle (Benedictus, Mitchell et al. 2008; Ferrouillet, Wells et al. 2009; Collins, Eggleston et al. 2010; Pillars, Grooms et al. 2011; Espejo, Godden et al. 2012). Ces études suggèrent une réduction de la prévalence ou de l'incidence après la mise en place d'un programme de contrôle standardisé. Par contre, elles ont été réalisées aux États-Unis, dans de grands troupeaux où les vaches sont

hébergées en stabulation libre. Au Québec, un programme volontaire de prévention et contrôle de la PTB (PVQPCP) a été lancé en 2007.

Parmi les tests utilisés pour le diagnostic *antemortem* de la PTB chez les bovins, la culture bactérienne des fèces est le test le plus sensible et demeure celui de référence (Whittington and Sergeant 2001). Elle peut être réalisée sur des échantillons fécaux individuels ou poolés ou de l'environnement. La culture bactérienne des prélèvements de l'environnement est la technique qui donne le meilleur rapport coût-efficacité pour déterminer la présence de l'infection dans un troupeau (Sweeney, Collins et al. 2012). C'est une stratégie de dépistage sensible (40 à 81%; Lombard, Wagner et al. 2006; Pillars, Grooms et al. 2009; Smith, Schukken et al. 2011) et spécifique (99%; Lavers, McKenna et al. 2013) qui a été évaluée dans plusieurs études principalement dans les grands troupeaux en stabulation libre aux États-Unis et récemment dans l'ouest du Canada (Wolf, Barkema et al. 2014).

Au laboratoire, le processus de culture bactérienne demeure le même, peu importe si les échantillons sont issus d'animaux individuels ou de l'environnement. Il inclut une étape de purification (ou décontamination) afin de réduire la surcroissance d'autres microorganismes (surcroissance microbienne), une longue période d'incubation dans un milieu de culture approprié (solide ou liquide) pour promouvoir la croissance de MAP et finalement, l'identification de MAP avec des méthodes phénotypiques ou génotypiques (Whittington 2010). La surcroissance microbienne complique, retarde et augmente les coûts de la culture de MAP (Whittington 2010) et peut affecter la sensibilité de la méthode. Elle peut inhiber la croissance de MAP et empêcher son identification, par conséquent des échantillons non interprétables (NI) peuvent être rapportés. De plus, la surcroissance microbienne peut affecter la classification adéquate des troupeaux par rapport au statut d'infection à MAP, notamment lorsque des résultats NI sont obtenus à partir des échantillons environnementaux. La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est un test diagnostique complémentaire qui pourrait aider à déterminer le statut des échantillons de l'environnement déclarés NI et contribuer à améliorer la détection des troupeaux infectés par MAP sans devoir effectuer des prélèvements additionnels.

Le contexte de la production laitière au Québec est particulier. Une étude estimait que la prévalence de la PTB à l'échelle du troupeau était plus faible au Québec (5%) qu'au reste du Canada (12-20%; Kelton, Barkema et al. 2016). Cette étude a attribué cette différence aux caractéristiques des troupeaux du Québec (Kelton, Barkema et al. 2016), où la plupart sont des petits troupeaux (57 vaches par ferme en moyenne) et où les vaches sont hébergées en stabulation entravée (92%; Groupe AGÉCO 2013). En considérant le contexte québécois, nous avons émis les hypothèses suivantes : 1) la mise en place de mesures de contrôle des maladies entériques contagieuses du PVQPCP diminue l'excrétion fécale de MAP et ce même dans les petits troupeaux avec une faible prévalence de MAP. Cela se reflète par une réduction de l'incidence de l'excrétion fécale chez les vaches nées après l'adhésion de la ferme au PVQPCP par rapport aux vaches du même troupeau nées avant; 2) la culture de prélèvements de l'environnement est une méthode efficace pour identifier les troupeaux laitiers québécois en stabulation entravée infectés par MAP; et 3) l'utilisation stratégique de la PCR sur des échantillons déclarés NI améliore la stratégie de détection des troupeaux laitiers en stabulation entravée infectés par MAP. Le principal objectif de cette thèse était donc de déterminer l'impact de l'adhésion des fermes laitières en stabulation entravée au PVQPCP et de la mise en place de mesures de contrôle des maladies entériques contagieuses sur l'incidence de l'excrétion fécale individuelle de MAP. Deuxièmement, notre étude vise à améliorer la stratégie de détection des troupeaux laitiers québécois en stabulation entravée infectés par MAP en : a) évaluant la performance d'une technique de culture de prélèvements de l'environnement pour l'identification des troupeaux laitiers québécois en stabulation entravée infectés par MAP et b) évaluant la performance d'une méthode PCR pour la détection de l'ADN de MAP dans les échantillons déclarés comme NI au préalable.

Cette thèse inclut les résultats de 3 études pour atteindre ces objectifs. **La première étude** décrit les changements de densité d'incidence de l'excrétion fécale des vaches nées avant et après les changements de régie associées à l'adhésion des fermes au PVQPCP. L'impact du risque de transmission de MAP (mesuré avec le score au questionnaire d'analyse de risque) et de certaines pratiques de régie sur l'incidence d'excrétion fécale a été également évalué. **La deuxième étude**, quant à elle, évalue la performance (sensibilité et spécificité) d'une technique standardisée de culture de

prélèvements de l'environnement pour l'identification de troupeaux laitiers en stabulation entravée infectés par MAP. Dans cette étude, l'inclusion des échantillons poolés des vaches malades et/ou maigres pour améliorer la stratégie d'échantillonnage est proposée.

La troisième étude évalue la performance d'une méthode PCR pour la détection de l'ADN de MAP dans des échantillons de l'environnement déclarés NI au préalable. Nos résultats nous permettent de constater que la méthode PCR utilisée dans cette étude est une méthode spécifique. L'utilisation de la PCR sur les échantillons NI contribue à l'amélioration du processus de culture de MAP en éliminant le résultat NI et en évitant des délais et coûts supplémentaires liés à la prise des nouveaux échantillons et aux cultures additionnelles.

CHAPITRE 2
REVUE DE LITTÉRATURE

REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Généralités de la paratuberculose

Dans cette section on abordera les concepts et définitions générales de la PTB. D'abord, une définition de la maladie est proposée et par la suite une courte histoire des premiers diagnostics rapportés et de l'expansion de la maladie dans le monde sont présentées. La section continue avec l'importance de la PTB. Une revue des caractéristiques de l'agent causal termine cette partie.

La PTB est une maladie entérique contagieuse, chronique et incurable des ruminants domestiques et sauvages, causée par *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP). Cette maladie est aussi connue sous le nom de maladie de Johne, mais techniquement ce terme définit que le stade clinique de la maladie (Lombard 2011). Les premières descriptions des signes compatibles avec la PTB chez les vaches ont été rapportées entre 1807 et 1829 (Manning and Collins 2010). La première description histopathologique a été effectuée par Dr Johne et Dr Frothingham en 1894, à partir des tissus prélevés d'une vache maigre avec une faible performance (Manning and Collins 2010). Ils ont rapporté une infiltration massive de la paroi intestinale avec des leucocytes et des cellules épithélioïdes, également ils ont observé une grande quantité de bactéries acido-alcooloresistantes chez les animaux infectés. Suite à ces premiers rapports, une prise de conscience de la maladie a été constatée dans le monde et de nouveaux cas ont été rapportés aux États-Unis en 1908; dans les années 1920 en Australie, Afrique et Asie; et en Amérique du Sud dans les années 1950. Il a été suggéré que l'expansion géographique de la maladie a été associée aux processus de colonisation et à la croissance de la production animale (Manning and Collins 2010).

2.1.1 Importance de la paratuberculose

La PTB est importante pour 4 raisons principales : sa distribution mondiale, les pertes économiques associées, le potentiel zoonotique de MAP par son lien avec la

maladie de Crohn chez l'humain, et ses impacts sur les marchés d'exportation. De plus, le contrôle de la PTB est un modèle intéressant du contrôle des maladies entériques contagieuses.

2.1.1.1 Distribution de la paratuberculose

Aujourd'hui, les infections par MAP ainsi que la maladie clinique ont été rapportées dans tous les continents qui ont des populations de ruminants, peu importe le système de production (Barkema, Hesselink et al. 2010). On estime que plus de 50 % des troupeaux aux États-Unis et en Europe sont infectés par MAP (USDA 2008; Nielsen and Toft 2009). Au Québec, MAP a été isolée dans 7 % des troupeaux enrôlés dans le programme volontaire québécois de prévention et contrôle de la PTB (PVQPCP; MAPAQ 2012). Une enquête de séroprévalence menée en 2002 estimait que 12 % des troupeaux québécois avaient au moins 2 vaches séropositives (Côté 2003). Dans le reste du Canada, la prévalence estimée à l'aide de la culture des prélèvements de l'environnement (CPE) était de 12 % dans les provinces maritimes (Kelton, Barkema et al. 2016), de 68 % en Alberta et de 76 % en Saskatchewan (Wolf, Barkema et al. 2014).

2.1.1.2 Pertes économiques associées à la paratuberculose

Les pertes économiques occasionnées par la PTB sont associées à la diminution de la production laitière et du taux de protéine et du gras; à la perte de valeur de la carcasse à l'abattage; aux réformes précoces et la diminution de la fertilité (McKenna, Keefe et al. 2006). Une revue systématique et méta-analyse évaluant 15 études a estimé la perte de lait à 576 kilos par lactation pour une vache positive à la culture fécale (McAloon, Whyte et al. 2016). Dans la même revue, la réduction du taux de gras était d'environ 2 % (6,75 kilos de gras par vache par lactation). Une autre étude a conclu que les vaches positives à la culture fécale avaient une réduction du taux de protéine de 22 kilos par vache par lactation comparativement aux vaches négatives du même troupeau (Hendrick, Kelton et al. 2005). Dans une étude danoise, le poids et la valeur de la carcasse à l'abattage des vaches infectées et saines ont été comparés (Kudahl and Nielsen

2009). Pour les vaches positives à l'ELISA, la réduction du poids et de la valeur de la carcasse à l'abattage était de 10 % et 17 % respectivement, tandis que pour les vaches positives à la culture fécale individuelle, cette réduction était de 15 % et 31 %, respectivement. Pour ce qui est des vaches présentant des signes cliniques de la maladie, une réduction de 20 % du poids et de 30 % de la valeur à l'abattage a été rapportée. Concernant la réforme, il a été suggéré que les vaches positives à la culture fécale ont 3 fois plus de risque d'être réformées que les vaches négatives (Hendrick, Kelton et al. 2005). L'impact de MAP sur la fertilité pourrait être dû à la présence de la bactérie dans l'appareil reproducteur des bovins (épididyme, testicules, semence, fluides utérins et folliculaires; Lambeth, Reddacliff et al. 2004; Givens and Marley 2008; Khol, Kralik et al. 2010) ou à l'absorption inadéquate des nutriments dans les stades avancés de la maladie. Une étude réalisée sur une centaine de vaches gravides sur lesquelles des échantillons sanguins ont été prélevés après le premier diagnostic de gestation suggère que les vaches séropositives à MAP avaient plus de risque de mortalité embryonnaire par rapport aux vaches séronégatives (Garcia-Ispierto and Lopez-Gatius 2016). Dans une autre étude, les animaux positifs à MAP à l'aide du test ELISA avaient une augmentation de 28 jours ouverts par rapport aux animaux négatifs (Johnson-Ifearulundu, Kaneene et al. 2000).

2.1.1.3 Association de MAP avec la maladie de Crohn

Le potentiel zoonotique de MAP s'appuie sur des similitudes cliniques et pathologiques entre la PTB et la maladie de Crohn chez l'humain. Ces deux maladies sont des maladies entériques chroniques et inflammatoires touchant l'iléon (Sartor 2005; Behr 2010). Par analogie, on pourrait penser que MAP cause une maladie intestinale chronique inflammatoire chez l'humain de la même façon qu'elle cause cette infection chez les ruminants (Behr 2010). La littérature met en évidence l'association entre MAP et la maladie de Crohn (Scanu, Bull et al. 2007; Momotani, Ozaki et al. 2012; Momotani, Romona et al. 2012), mais le lien de causalité n'a pas encore été démontré (Waddell, Rajic et al. 2015). D'autres arguments sont en faveur de l'implication de MAP dans la maladie de Crohn. Le MAP est un agent pathogène qui a été isolé à partir de différentes

sources. Par exemple, MAP a été isolé à partir des aliments (viande et produits laitiers), de l'eau pour consommation humaine, de l'environnement et de plusieurs espèces animales. La présence de MAP dans ces sources très diversifiées, met en évidence que l'humain pourrait être exposé par différentes routes (Sartor 2005; Grant 2010; Waddell, Rajić et al. 2016). Également, le MAP est plus fréquemment isolé chez les patients atteints de la maladie de Crohn que chez les non atteints (Sartor 2005). Une étude rapportait l'isolement de MAP à partir du lait des femmes atteintes de la maladie de Crohn (Naser, Schwartz et al. 2000). Certains auteurs jugent comme modéré l'évidence que MAP est la cause de la maladie de Crohn (Sweeney, Collins et al. 2012).

Également, il existe des arguments réfutant le rôle de MAP dans la maladie de Crohn. Selon une étude transversale visant à identifier l'association entre MAP et la maladie de Crohn, il n'y a pas d'évidence de transmission aux personnes en contact avec des ruminants infectés par MAP (Qual, Kaneene et al. 2010). La détection de MAP par PCR et sérologie dans les échantillons humains issus des patients atteints de la maladie de Crohn est très variable selon les laboratoires (Sartor 2005). Certains auteurs considèrent que le rôle de MAP dans le développement ou la progression de la maladie de Crohn chez l'humain n'est pas clair et que les preuves ne sont pas assez fortes pour conclure que MAP pose un risque pour la santé publique (Waddell, Rajic et al. 2016).

2.1.1.4 Impacts de la paratuberculose sur les marchés d'exportation

Même si le lien de causalité entre MAP et la maladie de Crohn n'a pas encore été démontré, le risque zoonotique potentiel de MAP sensibilise les personnes à la présence possible de MAP dans des produits d'origine animale, notamment le lait. C'est le cas de pays comme l'Italie et l'Irlande dans lesquels des motivations particulières sont à l'origine des programmes de prévention et contrôle de la PTB. Par exemple, en Irlande trois des principaux acteurs du secteur du lait de remplacement pour les enfants fournissent environ 15 % de la demande mondiale, représentant 667 millions d'euros en 2008 (Mullowney and Strain 2014). En Italie, le ministère de la santé a mis en place des stratégies nationales pour le contrôle de la PTB afin de protéger les exportations annuelles de fromage parmesan qui s'élèvent à 13 millions d'euros. Cette initiative

résulte de l'exigence de la Chine et de l'Inde (les principaux acheteurs de fromage parmesan, mozzarella et gorgonzola) à avoir des produits laitiers à faible risque d'être contaminés avec MAP (Arrigoni, Ruocco et al. 2014).

2.1.1.5 Modèle intéressant pour le contrôle des maladies entériques contagieuses avec porteurs sains ou difficiles à détecter

Une des retombés importants du contrôle de la PTB est que les mesures de prévention ne sont pas exclusives à la transmission de MAP. Tous les changements des pratiques de régie visant à diminuer la transmission de MAP aux veaux contribueront aussi à la diminution de la transmission de plusieurs maladies entériques contagieuses. Les mesures de contrôle de MAP représentent donc une stratégie intéressante pour le contrôle des maladies contagieuses à transmission féco-orale (par exemple : la diarrhée néonatale et *Salmonella* Dublin; Kelton, Barkema et al. 2014; Wolf, Clement et al. 2014).

2.1.2 Agent causal : *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*

Le genre *Mycobacterium* regroupe des bactéries non mobiles, non formatrices de spores, aérobies et en forme de bâtonnets (Markey, Leonard et al. 2013). Selon les caractéristiques cytochimiques, ces bactéries devraient être classées comme étant Gram positives, mais la paroi cellulaire ne capte pas la coloration à cause de l'abondante présence de lipides, notamment l'acide mycolique (Markey, Leonard et al. 2013). Elles sont donc classées comme bactéries acido-alcool résistantes (AAR), car une fois que la coloration est prise par les cellules, elles ne sont pas facilement décolorées, et ce même en utilisant de l'alcool (Markey, Leonard et al. 2013). Les bactéries du genre *Mycobacterium* sont classées dans 2 groupes : le complexe *M. tuberculosis* et les Mycobactéries non tuberculeuses (Markey, Leonard et al. 2013). Ce dernier groupe a été classé par Runyon en 1959 dans 4 sous-groupes selon la pigmentation, la morphologie des colonies et le taux de croissance : photocromogènes, scotochromogènes, non photocromogènes et à croissance rapide (Runyon 1959). Le complexe *Mycobacterium avium* (MAC), un groupe de Mycobactéries avec des caractéristiques phénotypiques

communes causant des syndromes similaires, est inclus dans le sous-groupe des non photochromogènes (Turenne and Alexander 2010). Des membres du MAC incluent les espèces *Mycobacterium intracellulare* et *Mycobacterium avium* (dont *Mycobacterium avium* ssp. *avium*, *Mycobacterium avium* ssp. *hominussuis*, *Mycobacterium avium* ssp. *silvaticum* et *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*; Turenne and Alexander 2010).

Le MAP est donc une mycobactérie AAR à croissance lente. Il est aussi un agent pathogène intracellulaire obligatoire, car elle ne produit pas la mycobactine, un élément chimique nécessaire pour le transport du fer (Lambrecht and Collins 1993). MAP infecte les cellules immunitaires associées à l'appareil digestif, notamment les macrophages. Une autre caractéristique importante de MAP est sa capacité de survivre à l'extérieur de l'hôte dans l'environnement pour plus d'un an (Whittington, Marshall et al. 2004). Deux études évaluant l'impact de l'exposition de MAP aux rayons ultraviolets ont démontré que l'ombre peut augmenter la survie de MAP jusqu'à 55 semaines (Whittington, Marshall et al. 2004; Eppleston, Begg et al. 2014). Cette résistance permet la mise en évidence de MAP sur des prélèvements issus de l'environnement des fermes à l'aide de la culture bactérienne. Malgré cette résistance à l'extérieur de l'hôte dans l'environnement, MAP ne peut pas s'y multiplier.

Il a été suggéré que MAP peut également survivre à la pasteurisation courte : 72 °C pendant 15 secondes (Gao, Mutharia et al. 2002; Grant 2010). Selon le centre d'information sur la maladie de Johne (*Johne's Information Center*), 3 hypothèses ont été suggérées pour expliquer cette résistance : 1) la formation de gros amas pourrait protéger les cellules de l'intérieur, 2) la présence de cellules de MAP au stade dormant (Whittington, Marshall et al. 2004) qui sont plus résistantes à la chaleur et 3) la présence d'un type de MAP formateur de spores tel qu'il a été suggéré récemment (Lamont, Bannantine et al. 2012). Ces caractéristiques de MAP ont des implications importantes pour le contrôle de la PTB et pour la santé publique.

L'impact de la congélation sur la survie de MAP a été aussi étudié. Une étude concluait que l'entreposage des échantillons pendant 48 heures à 4 °C (conditions d'un laboratoire de grande capacité) et pendant 3 mois à -70 °C (conditions d'un projet de recherche ou d'un programme de contrôle) n'avait pas d'effet nuisible sur la survie de

MAP, par contre l'entreposage pendant 1 semaine à -20 °C (conditions du terrain : entreposage par les producteurs ou médecins vétérinaires) affectait de façon importante la viabilité de MAP (Khare, Adams et al. 2008). Ces informations sont importantes pour le diagnostic de MAP et pour optimiser le processus au laboratoire et pourraient aussi impliquer que MAP survit moins bien dans les climats nordiques à cause des cycles gel-dégel.

2.1.2.1 Souches de MAP

Les souches de MAP peuvent être classées dans 2 groupes selon les caractéristiques de croissance, les préférences d'hôte et la pathogénicité (Stevenson 2010). Ces groupes ont été initialement nommés selon l'espèce dans laquelle les souches ont été isolées pour la première fois (Type S : *sheep* et Type C : *cattle*), mais avec les nouvelles techniques d'identification, il a été conclu que l'espèce d'origine n'était pas une caractéristique fiable, étant donné que MAP peut être isolée d'une vaste gamme d'hôtes (Stevenson 2010). D'autres groupes ont été décrits : le Type III et le Type Bison. Le séquençage complet du génome de MAP confirme la classification des souches en deux grands groupes (Stevenson 2010; Stevenson 2015) : le Type S (incluant le Type III) et le Type C (incluant le Type Bison).

Les souches du Type C sont plus faciles à isoler à partir des échantillons cliniques. Leur croissance est plus rapide (détection de colonies à 4-16 semaines) que celle des souches du Type S (détection de colonies à 16-52 semaines; Stevenson 2010). La survie des bactéries de souches du Type C ne semble pas être affectée par l'environnement, tandis que les bactéries de la souche S sont plus sensibles aux endroits chauds et arides (Eppleston, Begg et al. 2014).

Les souches du Type C sont plus fréquemment isolées chez les bovins, mais elles n'ont pas de préférence d'hôte. Elles peuvent être isolées aussi à partir d'une vaste gamme d'espèces de ruminants et non ruminants (Hutchings, Stevenson et al. 2010; Mackintosh and Griffin 2010). Les souches du Type S sont principalement isolées chez les moutons et les chèvres, mais ces souches ont été aussi isolées chez d'autres espèces. Les souches du Type S peuvent produire des signes cliniques après l'inoculation

expérimentale chez les bovins et les chevreuils. De plus, l'infection naturelle est rapportée chez les bovins, chevreuils (domestiqués et sauvages) et camélidés (Stevenson 2015). Une étude néozélandaise a démontré que le même Type S était présent chez les bovins de boucherie et les moutons qui partageaient les mêmes pâturages (Verdugo, Pleydell et al. 2014).

2.2 Épidémiologie et pathogenèse de la paratuberculose

Cette section décrit l'épidémiologie et la pathogenèse de la maladie en commençant par la transmission de MAP et le risque d'infection selon l'âge. Par la suite, une description des stades d'infection dès l'ingestion jusqu'à la manifestation de la maladie clinique avancée est réalisée. Dans cette section, les différents patrons d'excrétion et les super excréteurs sont également discutés.

2.2.1 Transmission de MAP

La principale route d'infection de MAP est la route féco-orale (Manning and Collins 2010). Le contact des veaux avec les fèces de vaches adultes est considéré comme le facteur de risque le plus important pour la transmission de MAP (Doré, Paré et al. 2012). Les animaux peuvent s'infecter à partir de l'ingestion de colostrum, du lait, de l'eau ou de la nourriture contaminés avec du MAP (Streeter, Hoffsis et al. 1995; Manning and Collins 2010).

La transmission verticale de MAP (*in-utero* et via le colostrum et le lait des vaches infectées) a été aussi décrite (Streeter, Hoffsis et al. 1995; Lombard 2011). Une revue systématique et méta-analyse de 7 études estimait qu'environ 9 % des fœtus des vaches infectées subcliniquement et 39 % des fœtus des vaches infectées cliniquement étaient infectés par MAP (Whittington and Windsor 2009). Les auteurs ont trouvé un risque d'infection fœtale 6 fois plus élevé chez les vaches dans le stade clinique comparé aux vaches dans le stade subclinique (RC=6,05; IC95% : 2,4-15,2). Pour ce qui est des sécrétions mammaires, MAP a été isolé à partir du lait (Sweeney, Whitlock et al. 1992) et

du colostrum des vaches positives à la culture fécale (Streeter, Hoffsis et al. 1995). Une étude a suggéré que la source de colostrum et de lait donnée aux veaux (de plusieurs vaches vs seulement de la mère; d'autres vaches vs lactoreemplaceur) est un facteur de risque pour développer des anticorps contre MAP (Nielsen, Bjerre et al. 2008). Par contre, dans la même étude, les auteurs suggèrent que le rôle de ces pratiques n'est pas aussi important pour la transmission de MAP à l'intérieur du troupeau que le rôle de l'hygiène de l'environnement néonatal.

Les modes de transmission de MAP nous permettent de constater une relation étroite entre le statut d'infection de la mère et celui de leur veau et que la force de cette relation dépend fortement des pratiques de régie de la ferme (Manning and Collins 2010).

2.2.2 Âge des animaux et risque d'infection par MAP

L'infection par MAP chez les bovins dépend de l'âge. Les veaux de moins de 6 mois sont les animaux les plus susceptibles à l'infection (Windsor and Whittington 2010). La susceptibilité pourrait être liée à la prédilection de MAP pour les plaques de Peyer, considérées comme la porte d'entrée de MAP dans l'hôte (Momotani, Whipple et al. 1988; Sweeney, Uzonna et al. 2006). Ce tissu lymphatique présente des changements dans la structure et la fonction liés à l'âge (Griebel and Hein 1996). Chez les jeunes ruminants, la présence d'un grand nombre de plaques de Peyer transitoires dans l'iléon fournit également un grand nombre de cellules M (M pour *microfold cells* en anglais) ce qui pourrait favoriser la translocation de MAP dans la sous-muqueuse (Momotani, Whipple et al. 1988). Ces plaques de Peyer de l'iléon vont plus tard entrer en régression laissant seulement celles du jéjunum. La susceptibilité chez les veaux pourrait être liée également à l'augmentation de la perméabilité de l'intestin dans les premières heures après la naissance (Sweeney 1996) et à la présence d'un système immunitaire en développement.

Même si l'infection survient à un âge précoce, l'excrétion et les signes cliniques sont observés à un âge plus avancé (Nielsen and Ersboll 2006). Une des caractéristiques de la PTB est une longue période latente (infection à excrétion), car normalement les animaux s'infectent à un âge précoce (Windsor and Whittington 2010) et l'excrétion se produit

généralement après l'âge de 2 ans (Nielsen and Ersboll 2006). Cependant, la période d'incubation de la maladie (infection à signes cliniques) est encore plus longue étant donné que les signes cliniques seront évidents à un âge encore plus avancé : >5 ans (Jubb and Galvin 2004). Du point de vue du contrôle des maladies, il est important de comprendre la relation entre la période d'incubation et la période latente (Dohoo, Martin et al. 2009). Lorsque la période latente est plus courte que la période d'incubation, des animaux infectés asymptomatiques excréteurs sont observés. Ces animaux constituent un défi pour le contrôle de la PTB et représentent un fardeau économique à court et à long terme qui n'est pas négligeable (Nielsen and Toft 2008). À court terme, ces animaux sont susceptibles d'avoir une performance productive inadéquate et à long terme ils contribuent à perpétuer l'infection dans les troupeaux s'ils ne sont pas identifiés et réformés. La fenêtre d'opportunité pour l'apparition des animaux infectés asymptomatiques excréteurs pourrait être encore plus grande que ce que l'on pensait étant donné que l'excrétion chez les veaux a été rapportée dans des études expérimentales et de terrain (Bolton, Pillars et al. 2011; Mortier, Barkema et al. 2014; Wolf, Orsel et al. 2015) et que la probabilité d'observer des veaux excréteurs augmente avec la prévalence du troupeau (Weber, Kogut et al. 2010).

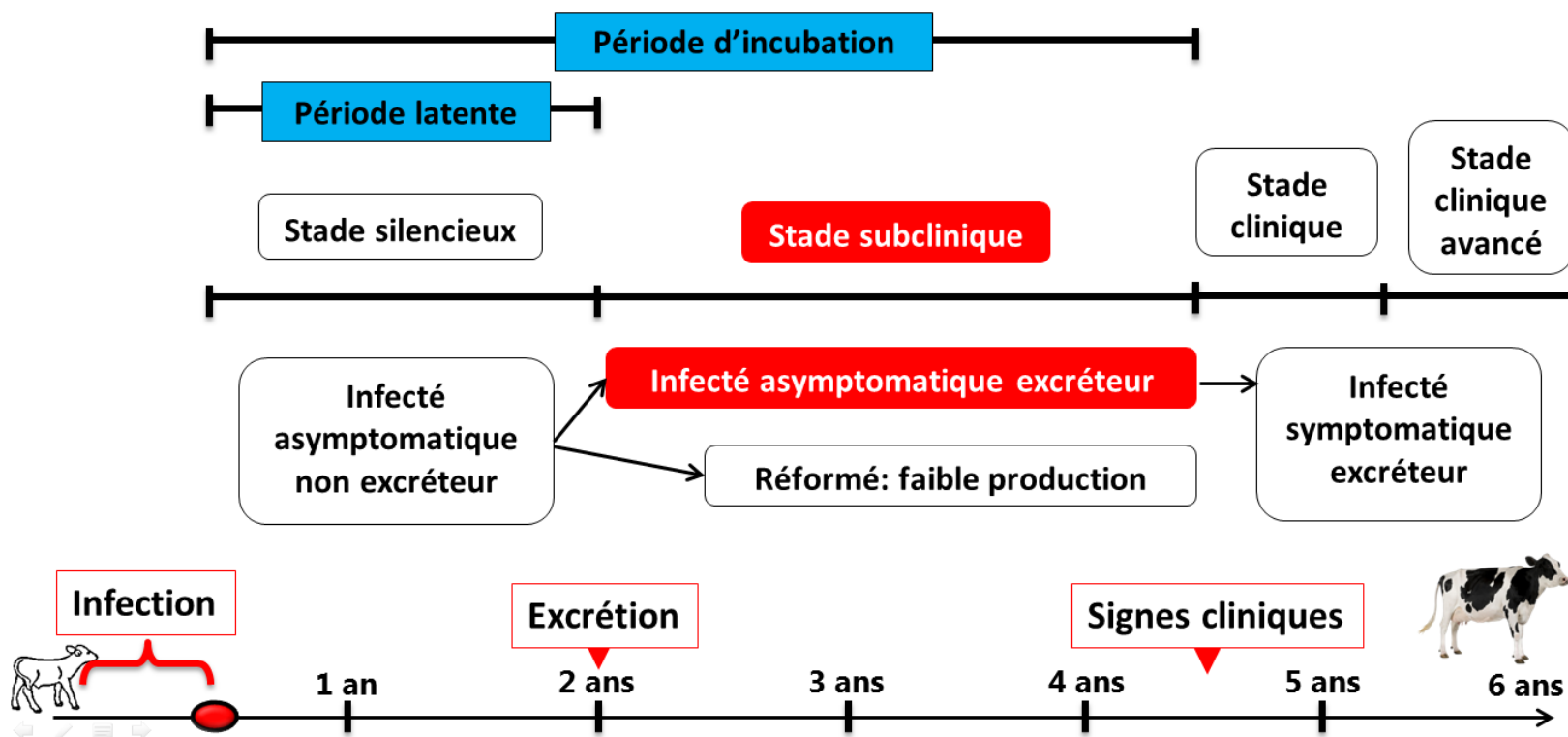
2.2.3 Pathogenèse de la paratuberculose

La maladie est divisée en 4 stades selon la sévérité des signes cliniques, le risque de dissémination de la bactérie dans l'environnement et la facilité à détecter l'infection (Fecteau and Whitlock 2010). Ces stades sont : le stade silencieux, subclinique, clinique et clinique avancé (Figure 2.1). Les animaux évolueront vers différentes étapes de l'infection qui correspondent aux stades de la maladie : non infectés, infectés asymptomatiques non excréteurs (stade silencieux), infectés asymptomatiques excréteurs (stade subclinique) et infectés symptomatiques excréteurs (stades clinique et clinique avancé; Nielsen and Toft 2008). La complexité de la réponse immunitaire contre le MAP et la longue période d'incubation compliquent la division entre ces étapes (Nielsen 2008). En général, la susceptibilité à l'infection diminue avec l'âge tandis que la capacité de détection des tests augmente lorsque l'animal progresse dans les stades de maladie.

Une dose orale de $1,5 \times 10^6$ unités formant colonie (UFC) de MAP est suffisante pour induire l'infection expérimentale des veaux détectable dans différents tissus 3 semaines après l'administration (Sweeney, Uzonna et al. 2006). L'infection des animaux adultes est également possible, notamment dans les troupeaux à forte prévalence. Si un animal adulte s'infecte, il est moins probable que des signes cliniques soient observés étant donné la longue période d'incubation de la maladie. Par contre, il est probable que ces animaux soient réformés du troupeau avant l'apparition des signes cliniques (Sweeney 2011).

En plus de l'âge au moment de l'infection, l'évolution de la maladie dépend aussi de la dose de MAP ingérée. Les animaux ingérant des doses de MAP élevés sont plus susceptibles d'avancer au stade clinique que ceux exposés aux doses plus faibles (Sweeney 2011).

Figure 2.1. Évolution de l'infection par *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* et stades de la maladie



Source : étudiant(e)s du groupe de recherche sur la PTB de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal.

2.2.3.1 Stade silencieux

Le point de départ du stade silencieux est la translocation de MAP dans la sous-muqueuse intestinale. Normalement le stade silencieux dure au minimum 2 ans, mais dans les troupeaux fortement infectés les animaux atteints peuvent évoluer vers les stades subclinique ou clinique après 1 an (Manning and Collins 2010). Dans ce stade, les animaux infectés ne montreront pas de signes cliniques, il n'y aura pas d'effets négatifs sur la performance productive et l'excrétion fécale et les anticorps sériques ne seront pas détectables (Sweeney 2011).

Suite à l'ingestion, MAP continue son chemin dans l'appareil digestif et active la protéine de fixation de la fibronectine (FAP de l'anglais *Fibronectin Attachment Protein*) ce qui résulte en l'opsonisation par la fibronectine (Bannantine and Bermudez 2013). MAP se localise dans l'iléon, qui est considéré comme la principale voie d'entrée dans l'organisme (Sweeney, Uzonna et al. 2006), notamment dans les plaques de Peyer (Momotani, Whipple et al. 1988). MAP se fixe à la surface luminale des cellules M par la fibronectine et par la suite traverse, de la lumière intestinale à la sous-muqueuse intestinale, à l'aide des cellules M et des cellules épithéliales différenciées (Momotani, Whipple et al. 1988). Il a été suggéré que le processus d'invasion de MAP (de la lumière à la sous-muqueuse) peut se produire à l'intérieur de 30 minutes (Khare, Nunes et al. 2009).

Dans la sous-muqueuse, MAP est phagocyté par les macrophages via les récepteurs du complément. Ce mécanisme est une des stratégies importantes de MAP pour franchir les défenses de l'hôte (Arsenault, Maattanen et al. 2014). Une fois dans le macrophage, MAP est capable d'y survivre grâce à sa capacité d'inhiber l'acidification du phagosome et d'éviter la fusion du phagolysosome (Hostetter, Steadham et al. 2003; Brumell and Scidmore 2007). De cette façon, MAP n'est pas exposé aux enzymes lysosomiales ni aux radicaux libres.

Initialement, l'hôte est capable de limiter l'infection, et ce même chez les animaux susceptibles qui vont développer la maladie (Sweeney 2011). La progression de la maladie dépend de la capacité de MAP d'inhiber ou non la fusion phagosome-lysosome. Normalement, cette fusion devrait conduire à la destruction de MAP et la présentation

d'antigènes aux cellules T via le complexe majeur d'histocompatibilité. Au début, MAP est contrôlé par les lymphocytes T auxiliaires type 1 (Nielsen and Toft 2008). Pendant cette réponse cellulaire MAP peut être excrété dans les fèces, mais en dessous des quantités détectables par les méthodes diagnostiques (Nielsen and Toft 2008; Fecteau and Whitlock 2010).

L'effort de l'hôte pour contrôler l'infection se traduit par une réponse inflammatoire provoquée par la présence des antigènes de MAP dans la sous-muqueuse et les nœuds lymphatiques mésentériques (Sweeney 2011). Par conséquent, un recrutement additionnel de macrophages et de lymphocytes se produit (Gonzalez, Geijo et al. 2005). Cela est suivi par une inflammation granulomateuse dans la portion médiale et distale de l'intestin grêle comme réponse tardive de l'hôte pour contrôler et limiter la dissémination de MAP (Coussens, Lamont et al. 2010). Il a été aussi suggéré que MAP profite des lésions granulomateuses pour recruter de nouveaux macrophages au site d'infection et de cette façon pouvoir se disséminer à d'autres portions de l'intestin ainsi qu'à d'autres organes (Davis and Ramakrishnan 2009).

La progression ou contention de l'infection à ce point-ci va dépendre de la capacité des macrophages de l'hôte à éliminer les bactéries phagocytées (Sweeney 2011). Des études ont décrit deux types d'évolution de l'infection : des animaux chez qui l'infection ne progresse pas (infections latentes ou « *non progressors* ») et les animaux chez qui l'infection progresse vers les différents stades (infections évidentes ou « *progressors* »; Vazquez, Garrido et al. 2013; Schukken, Whitlock et al. 2015). Dans les infections latentes, qui sont la présentation la plus commune des infections par MAP (Vazquez, Garrido et al. 2013), la progression de l'infection est contenue grâce à des lésions granulomateuses focales dans lesquelles MAP peut être présent ou non (Vazquez, Garrido et al. 2013). Dans les infections évidentes, les animaux développeront des lésions plus avancées et diffuses dans lesquelles MAP est présent (Vazquez, Garrido et al. 2013; Schukken, Whitlock et al. 2015).

2.2.3.2 Stade subclinique

La rapidité de progression vers le stade subclinique est variable et dépend de plusieurs facteurs tels l'âge à l'exposition initiale, la dose, la fréquence de réexposition dans le temps, la génétique de l'hôte et du microorganisme, les facteurs environnementaux, nutritionnels et de production (Fecteau and Whitlock 2010). Les animaux qui évoluent au stade subclinique ont normalement des concentrations plus élevées de MAP dans les tissus intestinaux. Dans ce stade, MAP est contenu (mais pas tué) dans les macrophages de l'intestin et le tissu lymphoïde associé à la réponse inflammatoire granulomateuse (Sweeney 2011). L'immunité cellulaire prédominante jusqu'à ce moment (Type Th1 et cytokines associées à l'activation des macrophages : IFN- γ), et responsable de contenir l'infection, décline (Stabel 2000). Par la suite, une réponse de type Th2 caractérisé par la production de cytokines IL-4 et IL-10 se met en place (Stabel 2000). Ces changements coïncident avec une excrétion importante de MAP dans les fèces, le début de la production d'anticorps et la progression de l'infection. Cela ne se manifeste pas encore par une perte de poids et de la diarrhée, mais à cause de l'excrétion de MAP dans les fèces, les animaux infectés contaminent l'environnement et sont une source d'infection pour le troupeau (Fecteau and Whitlock 2010). Les macrophages infectés migrent aux vaisseaux lymphatiques locaux en même temps que la maladie progresse, résultant en la dissémination de MAP dans les nœuds lymphatiques régionaux. L'infection peut alors se disséminer au nœud lymphatique mammaire et à la glande mammaire et donc résulter en la contamination du colostrum ou du lait par MAP (Streeter, Hoffsis et al. 1995). La majorité des animaux à ce stade montreront une diminution de la performance et pourraient être réformés pour d'autres raisons que la PTB, par exemple l'infertilité, la mammite, la boiterie ou la diminution de la production laitière (Whitlock and Buergelt 1996; Sweeney 2011). Ces animaux seront rarement reconnus par le médecin vétérinaire ou par le producteur comme étant infectés par MAP (Whitlock and Buergelt 1996). Le stade subclinique est la présentation la plus fréquente de la PTB, mais pas nécessairement la plus connue.

2.2.3.2.1 Patrons d'excrétion fécale et animaux « super excréteurs »

Le risque de disséminer la bactérie est proportionnel à la quantité de MAP excrétée. Trois catégories ont été définies selon le niveau d'excrétion fécale détecté par la culture en milieu solide (Crossley, Zagsmutt-Vergara et al. 2005): faible (1-9 UFC par tube), modérée (10-50 UFC par tube) et forte (>50 UFC par tube). Généralement, la plupart des animaux ne seront jamais des forts excréteurs. Dans les infections naturelles (c'est-à-dire celles survenues dans des conditions de terrain), seulement 7 % des vaches deviendront des fortes excrétrices (Mitchell, Schukken et al. 2015). Parmi celles-ci, 95 % seront réformées ou vont mourir de la maladie dans l'année qui suit le moment où elles sont devenues des fortes excrétrices (Mitchell, Schukken et al. 2015). Par contre, dans les infections expérimentales, la proportion de vaches qui deviendront des fortes excrétrices a été estimée à 85 %, probablement à cause d'une haute quantité de MAP inoculé ou à la route d'administration de la dose de MAP (Mitchell, Schukken et al. 2015). Une fois qu'elles sont arrivées à ce niveau d'excrétion, elles peuvent alterner entre les niveaux faible et élevé (Mitchell, Schukken et al. 2015). L'excrétion intermittente a été aussi décrite et définie comme des vaches qui alternent entre des résultats positifs (excrétion habituellement faible) et négatifs (non-excrétion) à la culture fécale (Nielsen 2008; Mitchell, Schukken et al. 2015). Quatre explications pour ce phénomène ont été suggérées (Mitchell, Schukken et al. 2015): 1) un artefact causé par la sensibilité limitée de la culture fécale; 2) des périodes aléatoires d'augmentation de l'excrétion dans les vaches infectées (par exemple, lors de la croissance des granulomes); 3) une infection récente qui a été contrôlée par l'hôte (comme chez les moutons) ou 4) l'excrétion passive ou « *pass-through* » (animaux non infectés qui excrètent la bactérie).

Parmi les forts excréteurs, on peut trouver les super excréteurs ou « *super shedders* ». Il s'agit d'animaux excrétant plus de 10 000 UFC de MAP par gramme de fèces (Fecteau and Whitlock 2010). La présence des super excréteurs est néfaste pour la ferme si ces derniers ne sont pas identifiés étant donné qu'ils peuvent excréter plus de MAP dans l'environnement que 2 000 excréteurs modérés ou 20 000 faibles excréteurs (Fecteau and Whitlock 2010). On pourrait penser que les super excréteurs sont donc une source importante pour disséminer le MAP dans la ferme (contamination des ustensiles et de l'équipement, dissémination dans les pâturages) et pour perpétuer l'infection dans le

troupeau (transmission verticale : *in-utero*, par le colostrum ou le lait; infection d'autres vaches adultes si l'exposition est fréquente; Fecteau and Whitlock 2010). Les super excréteurs contribuent largement à l'apparition du phénomène d'excrétion passive (Fecteau and Whitlock 2010).

2.2.3.3 Stades clinique et clinique avancé

En général, seulement une petite proportion des vaches infectées par MAP vont progresser au stade clinique (Mitchell, Schukken et al. 2015). Chez ces vaches, la quantité de MAP dans la muqueuse intestinale est très élevée. Également, des changements microscopiques et macroscopiques se produisent tels que la prolifération de lymphocytes réactifs, de macrophages épithéliaux et cellules géantes; l'épaississement de la muqueuse intestinale et la lymphadénopathie de l'intestin grêle (Whitlock and Buergelt 1996; Sweeney 2011). Ces changements conduisent au développement des lésions macroscopiques dans l'intestin et les nœuds lymphatiques mésentériques causées par une inflammation granulomateuse (Fecteau and Whitlock 2010; Sweeney 2011). La bactérie devient détectable dans des organes extra intestinaux à cause de la dissémination de l'infection. Par conséquent, des signes cliniques tels que malabsorption, maldigestion et donc diminution de la production laitière seront observés. Les animaux dans le stade clinique de la maladie subissent une perte de poids progressive, de la diarrhée intermittente malgré un appétit normal et de l'œdème inter mandibulaire (Whitlock and Buergelt 1996; Fecteau and Whitlock 2010). La conséquence est alors la mort, soit suite aux signes cliniques ou la réforme (Fecteau and Whitlock 2010; Smith, Schukken et al. 2011). Chez les animaux au stade clinique, le risque de transmission de MAP *in utero* et par le lait est plus élevé (Sweeney 2011). À cause de la haute concentration de MAP dans leurs fèces, ces animaux constituent aussi une source importante de contamination environnementale (Sweeney 1996). Il est important de comprendre tout ce qui est derrière la perception clinique de la maladie. Il a été suggéré que pour chaque vache au stade clinique avancé qui est née à la ferme, il pourrait y avoir entre 15 et 25 animaux infectés au stade silencieux et entre 6 et 8 animaux au stade subclinique (Whitlock and Buergelt 1996; Fecteau and Whitlock 2010). À part l'opinion des experts, à notre connaissance il

n'existe pas d'études évaluant le ratio d'animaux infectés dans chaque stade de la maladie. Cependant, la faible proportion d'animaux qui devient des forts excréteurs et qui progressent au stade clinique observée dans une étude longitudinale, est en accord avec l'opinion des experts (Mitchell, Schukken et al. 2015).

2.3 Dépister de la paratuberculose

Cette section commence avec la définition d'un test et son utilisation (diagnostic vs dépistage) et d'une stratégie de dépistage. Par la suite, les caractéristiques, avantages et inconvénients des différentes méthodes diagnostiques sont présentés (tests diagnostiques et questionnaire d'analyse de risque). Les tests diagnostiques sont classés dans 2 catégories : les tests directs et indirects. La surcroissance microbienne est abordée dans la section de la culture bactérienne. Finalement, les stratégies de dépistage répondant à un objectif précis sont présentées.

Un test est défini comme un outil ou un processus visant à détecter ou quantifier l'agent causal, les signes cliniques, les lésions ou la réponse immunitaire chez un individu ainsi que le risque d'être infecté, par exemple en utilisant un questionnaire (Dohoo, Martin et al. 2009). Les tests peuvent être utilisés pour le diagnostic ou pour le dépistage selon le stade de la maladie dans lesquels on les applique. Lorsqu'un test est utilisé pour confirmer une maladie, orienter un traitement ou aider dans le pronostic d'un processus clinique, on l'appelle test diagnostique (Dohoo, Martin et al. 2009). Par contre, lorsqu'un test est utilisé chez un individu ou une population apparemment saine pour rechercher de façon systématique une affection (infection, réaction immunitaire ou agent causal) qui avait passée inaperçue auparavant, on l'appelle un test de dépistage (Dohoo, Martin et al. 2009).

Une stratégie de dépistage utilise les tests pour répondre à un objectif du troupeau plus précis et tient compte de facteurs tels que l'impact économique de la maladie, les coûts et la performance (sensibilité et spécificité) des tests (Rothman, Greenland et al. 2008). Également, selon l'objectif, le type d'échantillon doit être choisi adéquatement et

la taille de l'échantillon doit être estimée. Dans un premier temps, on abordera les différents tests diagnostiques disponibles pour la PTB et dans un deuxième temps on présentera les stratégies de dépistage.

2.3.1 Tests diagnostiques pour la paratuberculose

Pour le diagnostic de la PTB on peut utiliser des tests diagnostiques directs pour rechercher l'agent causal ou des tests diagnostiques indirects pour rechercher la réponse immunitaire cellulaire ou humorale (Sweeney, Collins et al. 2012). Également, on peut utiliser l'histopathologie à partir des pièces prélevées par biopsie, nécropsie ou à l'abattoir pour rechercher les lésions caractéristiques de la maladie. Finalement, on peut aussi évaluer, à l'aide d'un questionnaire, le risque d'introduction et de transmission de MAP dans un troupeau. Chaque test comporte ses avantages et ses limites. Les caractéristiques (sensibilité et spécificité) des tests diagnostiques vont varier selon l'étape d'infection de l'animal (pour les tests individuels) ou la prévalence à l'intérieur du troupeau (Nielsen and Toft 2008).

2.3.1.1 Tests directs pour le dépistage *antemortem* de la paratuberculose

2.3.1.1.1 Histopathologie

Cette méthode met en évidence la bactérie au microscope avec une coloration pour identifier des bactéries AAR (Ziehl-Nielsen ou auramine rhodamine) à partir des tissus d'une biopsie de la valvule iléo-caecale, des parties distales de l'iléon ou des nœuds lymphatiques mésentériques (Buergelt, Hall et al. 1978; Gonzalez, Geijo et al. 2005). C'est une technique qui a une spécificité de 100 % et une sensibilité inconnue. Par contre, elle n'est pas assez pratique pour l'utilisation ante-mortem à l'échelle du troupeau, car elle nécessite une intervention chirurgicale (Collins, Gardner et al. 2006).

2.3.1.1.2 Bactérioscopie

Cette méthode consiste à visualiser le MAP sur des frottis de fèces prélevées d'animaux vivants ou d'organes (valvule iléo-cæcale ou nœuds lymphatiques mésentériques) prélevés à la nécropsie à l'aide d'une coloration pour identifier les bactéries AAR. Dans une étude visant à évaluer la performance de cette technique pour la surveillance de la maladie clinique à l'aide d'une analyse de classe latente, la sensibilité et la spécificité ont été estimées à 48 % et 98 %, respectivement (Weber, Verhoeff et al. 2009).

2.3.1.1.3 Culture bactérienne

La culture bactérienne peut être réalisée à partir des prélèvements de fèces (individuelles ou de l'environnement), de tissus ou de lait. La culture bactérienne de fèces est le test de référence *antemortem* pour le diagnostic de la PTB malgré une sensibilité qui varie de 23 % à 74 % (selon le stade d'infection de l'animal) et une spécificité de >99 % en comparaison à l'histopathologie (Collins, Gardner et al. 2006; Nielsen and Toft 2008). Peu importe s'il s'agit d'échantillons individuels ou environnementaux, le processus de culture est le même. La culture bactérienne inclut trois étapes : la décontamination afin de réduire la surcroissance microbienne; une longue période d'incubation dans un milieu de culture sélectif, qui peut être solide ou liquide, afin de promouvoir la croissance de MAP; et l'identification de MAP par des méthodes phénotypiques ou génotypiques (Whittington 2010).

2.3.1.1.3.1 Décontamination des échantillons fécaux

Étant donné la grande quantité de microorganismes entériques présents dans les échantillons fécaux qui poussent plus rapidement que le MAP, une étape de décontamination des échantillons est nécessaire avant de procéder à l'incubation. Cette étape a pour but d'inhiber la prolifération des microorganismes autres que le MAP et d'activer les spores pour que ces microorganismes passent à la forme végétative afin qu'ils puissent être inactivés par les antimicrobiens.

Les premiers protocoles de décontamination pour la culture de MAP étaient basés sur les protocoles utilisés pour la tuberculose et incluait des composants tels que l'acide sulfurique, l'hydroxyde de sodium, le phénol et l'acide oxalique, entre autres (Whittington 2010). En général, les protocoles de décontamination s'étalent sur 3 à 5 jours et comprennent des étapes (sédimentation, centrifugation et l'incubation), des éléments pour inhiber ou tuer les microorganismes autres que le MAP ou leurs spores (désinfectants, antimicrobiens et antibiotiques) ainsi que des éléments pour promouvoir la germination des spores de bacilles et la croissance de MAP. L'incubation vise à promouvoir la germination, c'est-à-dire la conversion des endospores bactériennes, notamment du genre *Bacillus*, en cellules végétatives. La sédimentation et la centrifugation ont été introduites dans les années 1960 et visent à concentrer le MAP afin d'augmenter la sensibilité analytique de la culture bactérienne (Whittington 2010). Parmi les éléments visant à réduire la croissance des microorganismes autres que le MAP, on y trouve le vert malachite, le hexadecylpyridinium chloride (HPC) et les antibiotiques. Le vert malachite, un bactériostatique envers les endospores des bacilles qui contribue aussi à l'amélioration de la visibilité des colonies dans le milieu solide, a été introduit dans les protocoles de décontamination dans les années 1940 (Whipple, Callihan et al. 1991). Le HPC a été introduit en 1982 (Whipple, Callihan et al. 1991). Le HPC est un désinfectant de la catégorie des ammoniums quaternaires utilisé pour réduire la croissance des endospores et des cellules végétatives bactériennes autres que les Mycobactéries ainsi que les cellules fongiques (Harris, Robe-Austerman et al. 2009). Par contre, il a été suggéré que le HPC peut réduire la croissance de MAP à une concentration égale ou plus élevée que 74,4 mg/mL (Johansen, Hugen et al. 2006). Lorsque le HPC est utilisé, l'ajout du jaune d'œuf dans le milieu de culture est requis afin de neutraliser l'effet toxique du HPC (Whittington 2010). Des antibiotiques tels que la pénicilline et le chloramphénicol ont été inclus dans les protocoles dans les années 1950, tandis que l'amphotéricine B l'a été en 1972 (Whipple, Callihan et al. 1991). D'autres antibiotiques communément utilisés sont la vancomycine et l'acide nalidixique. Une étude a suggéré que la viabilité de MAP est affectée au-delà d'une concentration de 100 µg/mL pour chacun des antibiotiques vancomycine, acide nalidixique et amphotéricine B (Pribylova, Kubickova et al. 2012). Parmi les autres éléments pour promouvoir la germination des spores de bacilles et la

croissance de MAP on y trouve l'extrait de levure, le pyruvate de sodium, le « *brain heart infusion* » (BHI), l'acide oléique, l'albumine et la caséine. L'extrait de levure est ajouté comme source de germinants étant donné qu'il contient des molécules organiques qui peuvent déclencher la germination (Foster and Johnstone 1990). Le pyruvate de sodium est un antioxydant qui fournit un environnement adéquat pour la croissance des *Bacillus*, également il a été suggéré que le pyruvate de sodium stimule la croissance de MAP, par exemple : des colonies plus grandes sont observées sur le milieu solide (Whittington 2010). Le BHI contribue à la germination des endospores. L'acide oléique est nécessaire pour le métabolisme des Mycobactéries. L'albumine lie les acides gras libres (toxiques lorsque non liés). La caséine est une source de charbon et d'énergie. Finalement, la catalase détruit les peroxydes toxiques du milieu (Harris, Robe-Austerman et al. 2009).

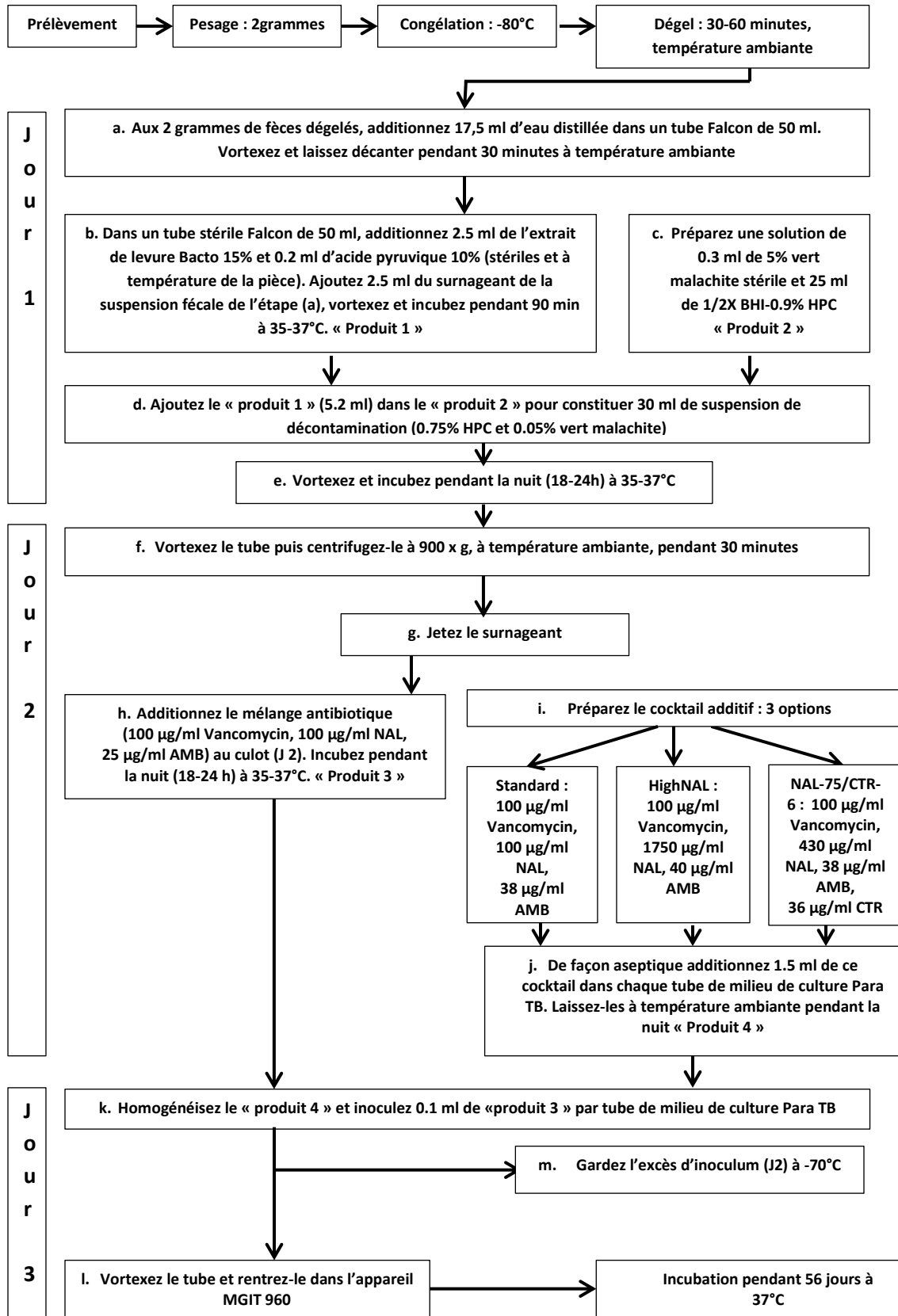
Parmi les étapes communément incluses dans les protocoles de décontamination, on y trouve la sédimentation avec le HPC (Kim, Bech-Nielsen et al. 1989), la sédimentation avec de l'eau et le HPC (Whipple, Callihan et al. 1991) et la double incubation-centrifugation. Cette dernière est l'étape la plus fréquemment utilisée (Whittington 2009).

Les échantillons fécaux sont traités au LÉAQ en suivant les recommandations du manufacturier (Becton, Dickinson, Sparks, Maryland, USA) et du USDA (Harris, Robe-Austerman et al. 2009). Le LÉAQ est un laboratoire accrédité pour la culture de MAP par le USDA. Le processus de décontamination utilisé pour les échantillons fécaux au LÉAQ est basé sur le protocole de Whitlock et Rosenberg (Whitlock and Rosenberg 1990). Il s'étale sur 3 jours et inclut une sédimentation, deux incubations (jour 1 et 2) et une centrifugation (jour 2; Figure 2.2). Le jour 1, environ 2 grammes de fèces sont dilués dans 17,5 mL d'eau stérile et laissés reposer à température ambiante pendant 30 minutes. Par la suite, 2,5 mL du surnageant sont transférés de manière aseptique dans un tube de 50 mL contenant 2,5 mL d'extrait de levure 15 % et 0,2 mL de pyruvate de sodium 10 %. Cette solution est vortexée brièvement et incubée pendant 90 minutes à $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Cette étape vise à promouvoir la germination, c'est-à-dire la conversion des endospores bactériennes, notamment du genre *Bacillus*, en cellules végétatives. Pour chaque échantillon, un total de 0,3 mL de vert de malachite 5 % stérile est ajouté à une solution

de 25 mL de milieu BHI et 0,9 % HPC. Finalement, tout le mélange de 5,2 mL de fèces plus la solution de germination est ajouté à la solution BHI-HPC pour obtenir 30 mL de suspension décontaminé. Cette suspension est vortexée brièvement et incubée pendant la nuit (18 à 24 heures) à 36 ± 1 °C. Le jour 2, la suspension décontaminée est centrifugée pendant 30 minutes à $900 \times g$. Par la suite, le surnageant est décanté et 1 mL de mélange antibiotique contenant 100 µg/mL de vancomycine, 100 µg/mL d'acide nalidixique, et 25 µg/mL d'amphotéricine B est ajouté au sédiment (ou culot). La suspension est incubée pendant la nuit (18 à 24 h) à 36 ± 1 °C. Aussi, de façon parallèle, 1,5 mL de cocktail additif est ajouté à chaque tube de culture MGIT Para TB (Becton, Dickinson). Le cocktail additif contient 0,8 mL de supplément Para TB supplement (albumine bovine, catalase, caséine, acide oléique; Becton, Dickinson), 0,5 mL d'enrichissement de jaune d'œuf, de l'eau stérile, et des antibiotiques (vancomycine 2.5 %, acide nalidixique 2.5 %, et amphotéricine B 1 %). Les tubes sont laissés reposer dans une enceinte de sécurité à température ambiante pendant 18 à 24 heures. Le tube de culture MGIT Para TB contient 7 mL du milieu liquide Middlebrook 7H9 modifié afin de promouvoir la croissance de MAP (Harris, Robe-Austerman et al. 2009).

Le jour 3, la suspension concentrée est brassée et 0,1 mL est inoculé dans les tubes de culture MGIT Para TB, par la suite les tubes sont incubés à 37 °C dans le système automatisé BACTEC 960 pour un maximum de 56 jours. Le milieu liquide est très exigeant en termes de la qualité de l'inoculum, la quantité de suspension à inoculer dans les tubes de culture ne doit donc pas dépasser le 0,1 mL (Harris, Robe-Austerman et al. 2009). La quantité restante de la suspension concentrée peut être entreposée à -70 °C pour d'autres analyses.

Figure 2.2 Protocole de traitement des fèces pour la culture de MAP au Laboratoire d'épidémiologie animale du Québec (adapté par Juan Carlos Arango Sabogal)



2.3.1.1.3.2 Incubation des échantillons dans le système automatisé

Dans le processus de culture bactérienne, une période d'incubation dans un milieu approprié est nécessaire. MAP est une bactérie à croissance lente. Le but de l'incubation est de promouvoir la multiplication de MAP tandis que les autres microorganismes sont inactivés par l'action des antimicrobiens présents dans le milieu de culture. Le temps d'incubation dépend du milieu de culture utilisé. Pour le milieu solide, le temps d'incubation varie de 12 à 20 semaines tandis que pour le milieu liquide il varie de 8 à 12 semaines (Whittington 2010).

Au LÉAQ, les échantillons sont incubés à 37 °C dans le système de détection automatisé BACTEC 960 (Becton, Dickinson) pour un maximum de 56 jours. Un élément fluorescent est incorporé dans le fond de chaque tube de culture. Cet élément est sensible à la présence de l'oxygène dans le milieu. La consommation de l'oxygène par la croissance des microorganismes présents dans le tube active un signal lumineux. Le système évalue les tubes chaque heure afin de détecter une augmentation du signal lumineux (Harris, Robe-Austerman et al. 2009).

2.3.1.1.3.3 Identification de MAP

L'étape finale du processus de culture est l'identification de MAP soit par une reconnaissance des colonies (culture en milieu solide), par coloration pour bacilles AAR ou par PCR. L'identification des colonies se fait normalement après 3 semaines d'incubation (Whittington 2010). La première description des colonies de MAP a été effectuée en 1912 par Twort et Ingram : « *initially they were round, smooth and white, then tended to heap up slightly and become dull light yellow with wrinkling of the surface* ». Le milieu et les suppléments additionnés peuvent changer la morphologie des colonies (Whittington 2010). Parmi les méthodes de coloration utilisées pour la visualisation des bacilles AAR, on y trouve la coloration de Zielh-Neelsen et les colorations par fluorescence, par exemple l'auramine-rhodamine. Une étude, visant à évaluer ces deux méthodes pour la détection des bacilles AAR aspirés à partir des nœuds lymphatiques chez l'humain pour le diagnostic de la Tuberculose, a démontré une meilleure sensibilité de l'auramine-rhodamine par rapport à la coloration de Ziehl-

Neelsen (Annam, Kulkarni et al. 2009). De plus, l'analyse des lames colorées par fluorescence peut être faite à faible grossissement, ce qui permet d'examiner des zones beaucoup plus grandes de la lame sur une courte période de temps (Annam, Kulkarni et al. 2009). Au LÉAQ, les échantillons positifs à l'incubation dans le système automatisé sont examinés afin détecter la présence de Mycobactéries à l'aide de la coloration AAR. La présence de MAP est confirmée par la suite en réalisant une PCR sur les lames positives à la coloration AAR. Au LÉAQ, la coloration AAR est réalisée sur les échantillons incubés en utilisant une trousse commerciale (TB Fluorescent Stain Kit ; Fisher Scientific, Ottawa, Ontario). Le milieu de culture après l'incubation est appliqué sur une lame et fixée avec la chaleur (entre 65 °C et 75 °C) pendant 2 heures. Par la suite, les lames sont colorées avec auramine–rhodamine pendant 15 minutes, lavées avec de l'eau distillée, décolorées avec de l'alcool acide pendant 10 minutes, lavées de nouveau avec de l'eau distillée et contre colorées avec du permanganate du potassium. Finalement, les lames sont lavées et séchées pour être examinées par le personnel technique en utilisant la microscopie fluorescente.

La méthode PCR utilisée au LÉAQ est la méthode TaqMan MAP (Johne's reagents; Applied Biosystems, Foster City, CA). Elle est réalisée en suivant les recommandations du manufacturier. La description de cette méthode sera présentée dans la section PCR.

2.3.1.1.3.4 Interprétation des résultats des étapes impliquées dans le processus de culture

Le résultat final du processus de culture de MAP (Tableau 2.1) implique l'interprétation des résultats aux trois étapes (incubation, coloration AAR et PCR) réalisées en série (Harris, Robe-Austerman et al. 2009). Un échantillon est considéré positif à la culture de MAP si le résultat à chacune des trois étapes s'avère positif. Si l'incubation est négative, aucune des deux étapes suivantes (coloration AAR et PCR) n'est réalisée et l'échantillon est déclaré négatif à la culture de MAP. Si l'incubation et la coloration AAR sont positives, mais la PCR est négative, l'échantillon est déclaré comme contenant des Mycobactéries autres que MAP. Un échantillon est déclaré non

interprétable (NI) si l'incubation est positive et la coloration AAR est négative; dans ce cas, une PCR n'est pas réalisée sur ces échantillons. Lors des échantillons déclarés NI, le résultat positif à l'incubation est produit par la surcroissance microbienne.

Une étude évaluant la sensibilité de 5 méthodes de culture fécale différentes a conclu que la méthode utilisant le protocole de décontamination décrit par Whitlock et Rosenberg (Whitlock and Rosenberg 1990) et le milieu de culture liquide avait la sensibilité la plus élevée de l'étude (89%; Eamens, Whittington et al. 2000). Par contre, cette méthode avait également la plus grande proportion de résultats NI de l'étude (11%; Eamens, Whittington et al. 2000).

Tableau 2.1. Interprétation des résultats aux différentes étapes impliquées dans le processus de culture bactérienne de *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* réalisé au Laboratoire d'épidémiosurveillance animale du Québec.

Résultats aux étapes du processus de culture			Résultat à la culture de MAP
Incubation	Coloration AAR	PCR	
-	Non évalué	Non évalué	-
+	-	Non évalué	Non interprétable
+	+	-	Mycobactéries autre que MAP
+	+	+	+

AAR : acido-alcool résistant.

PCR : réaction en chaîne par polymérase.

MAP : *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*.

- : négatif.

+ : positif.

Reproduit avec la permission de Dre Elizabeth Doré.

2.3.1.1.3.5 Surcroissance microbienne

Un des principaux défis de la culture bactérienne est la surcroissance de microorganismes autres que MAP. Souvent, ce phénomène est appelé contamination, mais le terme nous semble inapproprié. Le mot contamination pourrait laisser croire que la technique de prélèvement ou la manipulation de l'échantillon sont inadéquates. Or, la surcroissance microbienne dans les échantillons fécaux cultivés pour MAP reflète la prolifération de microorganismes présents normalement dans les fèces. Lorsque les cultures sont envahies par des microorganismes autres que MAP, un résultat définitif ne

peut être donné à l'échantillon et il est déclaré NI. Une étude évaluant l'impact de certains facteurs sur l'isolement de MAP et la fréquence de résultats NI incluait des échantillons soumis pendant 10 ans à deux laboratoires. Les auteurs ont trouvé une agrégation des échantillons NI par ferme et par soumission au laboratoire (échantillons de la même ferme soumis au même moment). Ceci suggère que des facteurs environnementaux (par exemple, le type de nourriture donné aux vaches notamment l'ensilage) pourraient favoriser la surcroissance microbienne (Whittington 2009). La surcroissance des microorganismes autres que le MAP peut inhiber la croissance (Katayama, Tanaka et al. 2000), la détection et identification de MAP (Whittington 2010). Ces microorganismes empêchent l'interprétation des résultats et interfèrent avec l'extraction de l'ADN pour la PCR (Whittington 2009; Whittington 2010). Le pourcentage d'échantillons déclarés comme NI n'est pas toujours rapporté dans la littérature malgré le fait qu'il a été suggéré que ce résultat devrait accompagner le pourcentage d'échantillons positifs à MAP (Nielsen, Kolmos et al. 2004; Gardner, Nielsen et al. 2011). Il n'existe pas non plus une définition universelle d'un échantillon NI (Whittington 2010; Gardner, Nielsen et al. 2011). Lorsque le pourcentage d'échantillons NI est mentionné, il est très variable. Par exemple, entre 7 et 44 % pour les échantillons fécaux bovins (Cousins, Evans et al. 1995; Eamens, Whittington et al. 2000). En conclusion, la surcroissance microbienne complique, retarde et augmente les coûts de la culture de MAP et peut affecter la sensibilité de la méthode (Whittington 2010).

2.3.1.1.4 Réaction en chaîne par polymérase

La PCR est une méthode diagnostique alternative à la culture bactérienne pour identifier les agents infectieux (Cai, Caswell et al. 2014). Un avantage de la PCR sur la culture fécale est le délai plus court pour obtenir un résultat (Cai, Caswell et al. 2014). Il a été suggéré que la performance de la PCR pour la détection de MAP est semblable à celle de la culture (Alinovi, Ward et al. 2009). La quantité de MAP peut être estimée en utilisant la PCR en temps réel avec une bonne corrélation avec la culture bactérienne (Aly, Mangold et al. 2010). La PCR peut être réalisée sur des échantillons individuels et poolés. Elle peut être utilisée directement sur les matrices (fèces, lait, tissu, semence) ou

comme méthode confirmatoire à la fin du processus de culture en milieu de culture liquide (Bölske and Herthnek 2010). Par contre, un résultat positif à la PCR n'indique pas nécessairement la présence de MAP viable.

Parmi les gènes cibles utilisés dans les méthodes PCR, trois gènes ont été identifiés comme étant efficaces pour différencier le MAP de *Mycobacterium avium* : IS900, f57 et ISMAP02 (Timms, Gehringer et al. 2011). L'élément IS900 est présent en 15 à 20 copies dans le génome de MAP (Bölske and Herthnek 2010). Il est un gène souhaitable pour augmenter la sensibilité de la méthode (Timms, Gehringer et al. 2011). Par contre, cet élément n'est pas unique à MAP et il est présent dans d'autres espèces de Mycobactéries environnementales (Englund, Bolske et al. 2002). Par conséquent, des résultats faux positifs pourraient être obtenus avec l'utilisation de l'élément IS900 (Englund, Bolske et al. 2002). L'élément f57 est très spécifique de MAP. Il est présent seulement en une copie dans le génome MAP et il ne se trouve pas dans aucune autre espèce de Mycobactéries (Bölske and Herthnek 2010; Timms, Gehringer et al. 2011). L'élément ISMAP02 est présent en six copies dans le génome de MAP (Bölske and Herthnek 2010). Une étude comparant l'utilisation des éléments IS900 et ISMAP02 pour la détection de l'ADN de MAP dans des échantillons fécaux bovins concluait qu'une méthode PCR pour la détection de l'élément ISMAP02 a une sensibilité semblable à celle de la détection de l'élément IS900 (Stabel and Bannantine 2005). Par contre, une méthode PCR pour la détection de l'élément ISMAP02 n'a pas amplifié l'ADN d'aucune des espèces de Mycobactéries génétiquement proches (Stabel and Bannantine 2005).

Pour ce qui est de la méthode PCR utilisée au LÉAQ (TaqMan MAP Johne's reagents; Applied Biosystems, Foster City, CA), l'extraction de l'ADN est réalisée avec une trousse commerciale (MagMax total nucleic isolation kit, Applied Biosystems, Foster City, CA). Également, l'amplification de l'ADN est réalisée en utilisant les réactifs recommandés par le manufacturier. Une valeur du cycle de quantification (Cq) est utilisée pour établir le seuil qui permet de classer les échantillons en positifs ou négatifs. Si le Cq < 37, l'échantillon est déclaré positif. Si le Cq est entre 37 et 40, l'échantillon est déclaré suspect. L'échantillon est déclaré négatif si aucun signal n'est détecté après 40 cycles.

2.3.1.2 Tests indirects pour le dépistage de la paratuberculose

Les tests indirects ciblent la réponse immunitaire de l'hôte. La réponse immunitaire des infections à MAP se caractérise par la production d'interféron gamma [IFN- γ], immunoglobulines G1 (IgG1) et G2 (IgG2) et d'autres cytokines visant à détruire les macrophages activés (Stabel 2010). Les tests indirects se basent sur la détection de ces cytokines et anticorps (IFN- γ , IgG1 et IgG2) en utilisant des antigènes de MAP (Nielsen 2010). Parmi eux, on y trouve l'ELISA (détection d'anticorps) et deux autres méthodes ciblant la détection de la réponse immunitaire à médiation cellulaire : l'intradermoréaction et l'IFN- γ . Lors de l'intradermoréaction, l'hypersensibilité de l'animal aux antigènes des Mycobactéries est mesurée. Une préparation d'antigènes de Mycobactéries est injectée intradermique à l'animal. Trois jours après l'injection, le gonflement cutané est mesuré pour déterminer la réponse immunitaire de l'hôte (Kalis, Collins et al. 2003). L'IFN- γ est un test de laboratoire qui a été développé initialement pour la tuberculose, mais qui est aussi disponible pour le diagnostic de la PTB (Billman-Jacobe, Carrigan et al. 1992; Stabel 1996). Avec ce test, la réponse immunitaire est déterminée en mesurant la libération de l'IFN- γ par les lymphocytes sensibilisés (Stabel 1996). Ces tests sont intéressants pour détecter les infections au stade silencieux, mais les données supportant leur utilisation pour déterminer si l'animal a été exposé à MAP sont limitées (Nielsen 2010). D'autres facteurs limitant l'utilisation de ces tests sont les coûts et la performance variable (Sweeney, Collins et al. 2012).

2.3.1.2.1 Test ELISA

Le test ELISA peut être réalisé pour détecter des anticorps contre MAP en utilisant du sérum ou du lait tant pour le diagnostic individuel que pour le diagnostic à l'échelle du troupeau en utilisant des échantillons poolés de sérum et de lait, ou le lait de réservoir (Nielsen 2010). L'ELISA est le test le plus utilisé, car il est économique et rapide (Sweeney, Collins et al. 2012). Les coûts du test l'ELISA permettent une utilisation plus fréquente (par exemple, dépistage quatre fois par année dans le programme Danois de prévention et contrôle (Nielsen and Krogh 2014)). L'examen du lait comporte un avantage sur l'examen du sérum, car il peut être réalisé sur les

échantillons de routine du contrôle laitier, sans que les animaux subissent de manipulations additionnelles. Le principal inconvénient des tests indirects tels que l'ELISA est qu'un résultat positif indique une exposition à MAP et ne donne pas nécessairement de l'information sur le stade d'infection de l'animal (Nielsen 2010). Également, des études suggèrent que l'exposition des animaux aux Mycobactéries environnementales peut conduire à la production d'anticorps produisant des résultats faussement positifs à l'ELISA MAP sur le sérum (Norby, Fosgate et al. 2007; Osterstock, Fosgate et al. 2007). La sensibilité et la spécificité du test ELISA MAP (réalisé sur le sérum ou le lait) par rapport à la nécropsie est en général de 30% et 99% respectivement (Collins, Gardner et al. 2006). Mais, la performance de l'ELISA est très variable (voir section sur les performances des tests individuels selon le stade d'infection), comme pour les autres tests diagnostiques de la PTB, et dépend du stade d'infection de l'animal (Nielsen and Toft 2008).

2.3.1.3 Questionnaire d'analyse de risque

Le questionnaire d'analyse de risque permet d'estimer le risque pour un troupeau d'être positif à la PTB et c'est un élément très important des programmes de prévention et contrôle (Geraghty, Graham et al. 2014). Le score au questionnaire est utilisé pour estimer le risque d'introduction et de transmission de MAP (Ferrouillet, Wells et al. 2009; Espejo, Godden et al. 2012; Wolf, Barkema et al. 2015) et pour évaluer la mise en place des mesures de contrôle (observance) des producteurs (Ferrouillet, Wells et al. 2009; Collins, Eggleston et al. 2010; Ridge, Heuer et al. 2010; Espejo, Godden et al. 2012; Wolf, Barkema et al. 2015). À notre connaissance, la performance (sensibilité et spécificité) du questionnaire d'analyse de risque pour déterminer le statut du troupeau n'a pas été évaluée. Dans une étude visant à estimer si les changements des pratiques de régie des fermes (reflétés dans le score au questionnaire) produisaient des changements dans la séroprévalence du troupeau ou le taux de réforme des animaux dans le stade clinique, les auteurs mentionnent que les seuils pour catégoriser le niveau de risque ont été attribués de façon arbitraire (Raizman, Wells et al. 2006).

2.3.1.4 Performance des tests individuels selon le stade d'infection de l'animal

Le choix du test pour le dépistage de la PTB chez les individus dépend du stade de l'infection que l'on veut détecter (Nielsen and Toft 2008). La sensibilité des tests utilisés pour le diagnostic ante-mortem de la PTB augmente avec la progression de l'animal dans les stades d'infection. Les animaux « infectés asymptomatiques non excréteurs » ne seront pas détectés par les méthodes directes. Le test ELISA pourrait être utilisé chez ces animaux, mais la sensibilité dépend de l'intensité de la production d'anticorps et varie entre 9 et 22 % (Nielsen and Toft 2008). La capacité de détection des infections avec la culture fécale ou l'ELISA augmente à partir de l'âge de 2 ans (Nielsen and Toft 2006). Les bovins infectés de 2,5 à 5,5 ans ont la probabilité la plus élevée d'être positifs à la culture fécale, tandis que pour l'ELISA, la probabilité la plus élevée d'être positif se situe entre l'âge de 2,5 et 4,5 ans (Nielsen and Ersboll 2006). Les animaux « infectés asymptomatiques excréteurs » sont détectables par les méthodes directes ou par l'ELISA si la réaction humorale est concomitante à l'excrétion. Des études ont estimé la sensibilité et la spécificité de la culture fécale et l'ELISA pour la détection des animaux « infectés asymptomatiques excréteurs » (Tableau 2.2). Les tests ELISA, la culture fécale et la PCR ont chacune une sensibilité > 90 % lorsqu'utilisés pour diagnostiquer l'infection chez un animal avec des signes cliniques compatibles, c'est-à-dire un animal infecté symptomatique excréteur (Sweeney, Collins et al. 2012). Le choix dépend de la rapidité avec laquelle on veut avoir le résultat. Si MAP n'a jamais été diagnostiqué dans la ferme, un test direct est préférable. Les excréteurs passifs seront seulement détectés par des méthodes directes.

Tableau 2.2. Sensibilité et spécificité de la culture fécale et de l'ELISA sur le sérum et le lait pour le diagnostic de *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* chez les animaux infectés asymptomatiques excréteurs.

Méthode diagnostique	Sensibilité	Spécificité	Méthode de référence	Étude
Culture fécale	74%	Non rapportée	PTB subclinique*	(Sockett, Carr et al. 1992)
Culture fécale	53,9%	99,9%	Analyse bayésienne	(van Schaik, Haro et al. 2007)
Culture fécale	32,2%	Non rapportée	Analyse bayésienne	(Scott, Fosgate et al. 2007)
ELISA-sérum	33,7%	95,9%	Analyse bayésienne	(Scott, Fosgate et al. 2007)
ELISA-sérum	27,9-44,5%	85-100%	Culture fécale	(Collins, Wells et al. 2005)
ELISA-sérum	25,9%	98,5%	Analyse bayésienne	(van Schaik, Haro et al. 2007)
ELISA-sérum	12-68%	93,4-99,8%	Culture fécale	(Kalis, Barkema et al. 2002)
ELISA-lait	49-55%	92-96%	Culture fécale	(Klausen, Huda et al. 2003)

*PTB subclinique : la définition de cas inclut l'isolement de MAP à l'aide de la culture en milieu solide ou liquide, à partir des échantillons fécaux ou tissus collectés de vaches sans diarrhée ni perte de poids.

2.3.2 Stratégies de dépistage de la paratuberculose

La stratégie de dépistage peut varier selon l'objectif : déterminer le statut du troupeau, estimer la prévalence de la PTB dans l'élevage, identifier les animaux qui contribuent à la contamination de l'environnement de la ferme afin de contrôler la maladie dans un troupeau fortement infecté, identifier les animaux infectés dans un troupeau positif inscrit dans un programme de contrôle, confirmer le statut d'un animal avec des signes cliniques compatibles (déjà abordé dans la section sur la performance des tests individuels) ou faire un dépistage avant l'introduction des animaux dans un troupeau (Collins, Gardner et al. 2006; Collins 2011; Sweeney, Collins et al. 2012).

2.3.2.1 Déterminer le statut d'un troupeau

Les types d'échantillonnages qui peuvent être utilisés pour déterminer le statut d'infection d'un troupeau incluent : les prélèvements de l'environnement, les échantillons fécaux poolés, l'analyse des échantillons individuels d'un sous-groupe d'animaux et l'analyse des échantillons du lait de réservoir.

2.3.2.1.1 Culture bactérienne des prélèvements de l'environnement

Si le but est de déterminer le statut d'un troupeau, la CPE est la méthode qui donne le meilleur rapport coût-efficacité pour déterminer le statut d'infection des troupeaux qui n'ont jamais été testés pour la PTB (Sweeney, Collins et al. 2012). Cette stratégie profite de la capacité de MAP de survivre dans l'environnement (Whittington, Marshall et al. 2004). Le principe consiste à prélever des échantillons dans les endroits de la ferme où les fèces des vaches adultes s'accumulent. La performance de la CPE a été évaluée dans plusieurs études réalisées notamment dans de grands troupeaux en stabulation libre (Raizman, Wells et al. 2004; Berghaus, Farver et al. 2006; Lombard, Wagner et al. 2006; Pillars, Grooms et al. 2009; Smith, Schukken et al. 2011; Lavers, McKenna et al. 2013; Wolf, Barkema et al. 2014). La sensibilité varie de 40% à 81 % et la spécificité est près de 99 % (Lombard, Wagner et al. 2006; Pillars, Grooms et al. 2009; Smith, Schukken et al. 2011; Lavers, McKenna et al. 2013). Il a été suggéré que la

sensibilité de la CPE dépend du nombre d'échantillons prélevés et de la prévalence à l'intérieur du troupeau (Smith, Schukken et al. 2011). Une étude réalisée aux États-Unis a conclu que le nombre d'échantillons positifs issus de l'environnement augmente avec la prévalence à l'intérieur du troupeau (Pillars, Grooms et al. 2009). La sensibilité de la CPE peut être faible (20-30%) dans les troupeaux à faible prévalence d'infection ($\leq 2\%$) ou atteindre 100 % dans les troupeaux avec une prévalence d'infection modérée ou élevée ($> 8\%$; Lavers, McKenna et al. 2013). Par contre, étant donné que MAP persiste dans l'environnement, il est possible que l'on obtienne des échantillons de l'environnement positifs dans des troupeaux avec une prévalence en diminution (Lavers, McKenna et al. 2013). La CPE est donc une stratégie idéale pour détecter les troupeaux infectés par MAP.

2.3.2.1.2 Échantillons individuels poolés

Des échantillons fécaux poolés peuvent aussi être utilisés pour déterminer le statut des troupeaux avec un coût inférieur au dépistage de tous les animaux du troupeau. Par contre, la méthode implique la manipulation des animaux pour les prélèvements. Dans cette stratégie, tous les animaux du troupeau peuvent être échantillonnés et par la suite des échantillons poolés peuvent être constitués en réunissant les échantillons de 5 à 10 animaux afin de réduire le nombre d'analyses à réaliser au laboratoire. Une étude évaluant la performance des échantillons poolés pour la détection des troupeaux positifs à MAP, a conclu que les chances de détecter le MAP étaient significativement moindres en regroupant 10 animaux par pool (OR=0,42; IC95% : 0,19-0,94) comparativement aux pools composés par 5 animaux (Wells, Whitlock et al. 2002). Selon une étude comparant la performance de la culture fécale individuelle avec les échantillons fécaux poolés (5 animaux par pool), la sensibilité des échantillons fécaux poolés pour la détection des troupeaux infectés par MAP était de 73 % (Kalis, Hesselink et al. 2000). Dans une autre étude, la sensibilité de la culture bactérienne des échantillons poolés par groupe de 10 animaux a été estimée à 51% en utilisant des méthodes bayésiennes (Tavornpanich, Gardner et al. 2004). Une étude évaluant la performance de la stratégie des échantillons fécaux poolés (par groupe de 5 animaux) comparativement à la culture fécale individuelle

a trouvé une très bonne corrélation ($R^2=0,84$) entre la prévalence d'infection déterminée par ces deux méthodes (Wells, Godden et al. 2003). Une augmentation de 1 % dans la proportion de pools positifs était associée à une augmentation de 0,37 % de la prévalence individuelle (Wells, Godden et al. 2003). La corrélation entre la stratégie des échantillons poolés par groupe de 5 animaux et la prévalence à l'intérieur du troupeau a été simulée à l'aide des modèles mathématiques. Dans ces modèles, des données des troupeaux de différente taille et prévalence sont simulées en utilisant différentes méthodes et stratégies de dépistage (Tavornpanich, Wells et al. 2012). Dans cette étude, une corrélation entre l'augmentation du nombre d'échantillons poolés positifs et l'augmentation de la prévalence à l'intérieur du troupeau a été observée. Par exemple, dans un troupeau de 100 vaches dans lequel 20 échantillons poolés étaient analysés, la prévalence serait $\leq 15\%$ si 6 de ces 20 échantillons poolés s'avèrent positifs tandis qu'elle serait $\leq 2\%$ si seulement un échantillon poolé s'avère positif (Tavornpanich, Wells et al. 2012).

2.3.2.1.3 Échantillonner un sous-groupe d'animaux

Un sous-groupe d'animaux du troupeau, choisi de façon aléatoire ou en ciblant les animaux les plus à risque (par exemple les vaches de plus de trois ans ou les vaches maigres), pourraient aussi être prélevés et testés de façon individuelle afin de déterminer le statut du troupeau (Sweeney, Collins et al. 2012).

2.3.2.1.4 Lait de réservoir

Le statut des troupeaux laitiers peut être déterminé aussi en analysant le lait de réservoir pour la présence des anticorps contre MAP ou de l'agent causal lui-même. Le principal avantage de cette stratégie est que le statut du troupeau peut être déterminé en analysant un seul échantillon. Par contre, les résultats sont contradictoires quant à la sensibilité de cette stratégie (Stabel, Wells et al. 2002). La grande variabilité des valeurs obtenues (Okura, Toft et al. 2012) ne permet pas de recommander cette stratégie pour le dépistage des troupeaux pour le moment (Sweeney, Collins et al. 2012).

2.3.2.2 Estimer la prévalence de la paratuberculose dans l'élevage

Cette stratégie n'est pas recommandée du point de vue du contrôle de la PTB (Collins, Gardner et al. 2006). Étant donné que la performance des tests diagnostiques pour la PTB n'est pas parfaite, on estime la prévalence apparente (Dohoo, Martin et al. 2009). Estimer la prévalence est une stratégie coûteuse, car un grand nombre d'animaux doivent être échantillonnés afin d'obtenir des valeurs précises (Collins, Gardner et al. 2006). Pour estimer la taille d'échantillon requise, il faut tenir compte de la prévalence attendue, la précision de la valeur estimée (ou l'erreur acceptable) et le niveau de confiance (Dohoo, Martin et al. 2009). Le fait de déterminer que le troupeau est positif à MAP ou même à risque d'être positif suffit pour justifier la mise en place d'un programme de contrôle ou de surveillance.

2.3.2.3 Identifier les animaux qui contribuent à la contamination de l'environnement de la ferme afin de contrôler la maladie dans un troupeau fortement infecté

Dans un troupeau fortement infecté, l'objectif à court terme est d'identifier les animaux qui contribuent à la contamination de l'environnement de la ferme et donc à la transmission de l'infection dans le troupeau. Le choix de la méthode diagnostique dépend de la vitesse à laquelle le producteur veut diminuer l'incidence, du type d'élevage et de la prévalence de départ dans le troupeau. Les coûts associés sont inversement proportionnels à la rapidité de la diminution. (Sweeney, Collins et al. 2012). Lorsque la prévalence est supérieure à 5 %, les experts recommandent le dépistage en utilisant l'ELISA pour tester le lait ou le sérum (Collins, Gardner et al. 2006; Sweeney, Collins et al. 2012). Les décisions de réforme des animaux à partir de l'ELISA devraient être prises en utilisant la densité optique (le résultat continu) plutôt que le résultat dichotomique (Sweeney, Collins et al. 2012). La probabilité d'être vraiment infecté augmente avec l'augmentation des valeurs de densité optique et dépend de la prévalence à l'intérieur du troupeau (Collins 2002). Par exemple, la probabilité d'être infectée pour une vache avec une densité optique à l'ELISA de 0,05 (interprétation : résultat négatif) est de 1 %, 6 % ou 17 % si la prévalence du troupeau est égale à 1 %, 10 % ou 25 % respectivement. Par

contre, si la densité optique est égale à 0,7, la probabilité d'infection augmente à 57 %, 93 % et 98 % pour des valeurs de prévalence de 1 %, 10 % et 25 % respectivement. Lorsque la densité optique est > 2 , la probabilité d'infection est > 91 % (Collins 2002). La réforme des vaches séropositives devrait être combinée avec le contrôle des facteurs de risque dans l'élevage (gestion du colostrum, ségrégation), car les stratégies de dépistage et réforme des animaux positifs (« *test and cull* ») ne sont pas efficaces pour le contrôle de la maladie si elles sont utilisées seules (Groenendaal, Nielen et al. 2002).

2.3.2.4 Identifier les animaux infectés dans un troupeau positif inscrit dans un programme de contrôle

Cette stratégie fait partie de certains programmes de contrôle (Nielsen and Krogh 2014; Orpin and Sibley 2014). Le dépistage des animaux infectés dans un troupeau positif inscrit dans un programme de contrôle aide à la prise de décisions concernant la gestion du colostrum, la ségrégation des vaches et les réformes (Sweeney, Collins et al. 2012). La stratégie de dépistage à utiliser dépend de la prévalence apparente dans le troupeau et du type d'élevage (Collins, Gardner et al. 2006; Collins 2011). Dans un troupeau laitier commercial avec une prévalence apparente > 5 %, l'utilisation de l'ELISA sur le lait ou le sérum pour le dépistage est recommandée (Collins, Gardner et al. 2006). Par contre, si la prévalence apparente est < 5 %, une méthode diagnostique directe (PCR ou culture fécale) réalisée sur des échantillons individuels ou poolés est l'option la plus efficace étant donné la faible valeur prédictive positive de l'ELISA dans les troupeaux à faible prévalence (Sweeney, Collins et al. 2012). Si un pool s'avère positif, l'étape suivante serait d'identifier parmi les animaux qui ont contribué au pool, celui ou ceux infecté(s) pour les réformer. Réformer les animaux suite à un résultat positif à l'ELISA dans un contexte de faible prévalence peut amener à la réforme inutile de la majorité des animaux positifs au test à cause de la faible valeur prédictive positive du test dans ces conditions.

Pour les élevages élités (élevant des animaux de haute génétique), il est recommandé d'utiliser une méthode directe sur des échantillons fécaux individuels ou

poolés pour le dépistage, peu importe la prévalence apparente à l'intérieur du troupeau (Collins, Gardner et al. 2006).

2.3.2.5 Dépister les animaux avant leur introduction dans un troupeau

L'achat d'animaux de remplacement est un facteur de risque important associé au statut positif à MAP et à l'augmentation de la prévalence (Sorge, Lissemore et al. 2012; Kunzler, Torgerson et al. 2014). Si l'introduction de nouveaux animaux est nécessaire, il faut tenir compte du statut du troupeau d'origine (Sweeney, Collins et al. 2012). Les animaux doivent provenir d'un troupeau avec un niveau de risque égal ou inférieur à celui du troupeau acheteur. Si le statut du troupeau d'origine n'est pas connu, les animaux achetés doivent être examinés avec un test direct et avec l'ELISA sur le sérum avant la vente et faire un suivi annuel (au maximum) après l'arrivée des animaux au troupeau (Sweeney, Collins et al. 2012). Également, un dépistage de suivi des animaux achetés devrait être effectué au moins un an après la transaction (Sweeney, Collins et al. 2012).

2.4 Contrôler la paratuberculose

Cette section débute avec une description des facteurs de risque pour la PTB. Par la suite, une revue des études portant sur le contrôle des infections à MAP est effectuée pour terminer avec un résumé des programmes de prévention et contrôle dans le monde.

La prévention et le contrôle de la PTB s'appuient sur la réduction du risque d'introduction (ou réintroduction dans les troupeaux déjà infectés) et de transmission de MAP à l'intérieur du troupeau (Garry 2011). Pour la réduction du risque d'introduction, une attention spéciale devrait être portée à l'achat d'animaux, à l'épandage de fumier provenant des fermes positives à MAP ou avec un statut inconnu, aux mesures de biosécurité des visiteurs et au partage d'équipement agricole (Sweeney, Collins et al. 2012). Le contrôle de ces mesures va contribuer à éviter la dissémination de MAP entre les troupeaux. Pour la réduction du risque de transmission à l'intérieur du troupeau, il faut considérer que la PTB est une maladie entérique contagieuse, à transmission féco-orale et

que les veaux sont plus susceptibles que les animaux plus âgés (Manning and Collins 2010; Windsor and Whittington 2010). Également, il faut tenir en compte que le statut de la mère est associé à celui du veau et que cette association dépend fortement des pratiques de régie (Manning and Collins 2010). Ainsi, les mesures pour réduire le risque de contamination autour de la période néonatale contribueront à diminuer la transmission de MAP à l'intérieur du troupeau (Doré, Paré et al. 2012).

Depuis l'apparition de la maladie au début des années 1900, des alertes précoces ont été émises pour établir des mesures pour le contrôle de la PTB. Ces alertes mentionnaient l'introduction de la maladie via l'importation d'animaux, l'importance de connaître le statut d'infection des troupeaux sources et suggéraient une association entre la PTB et les races des « *Channel Islands* : Jersey, Guernsey » (Manning and Collins 2010). Bien que ces facteurs de risque soient encore pertinents pour le contrôle, d'autres facteurs de risque (qui seront mentionnés dans les sections suivantes) devraient être aussi considérés.

2.4.1 Facteurs de risque pour la paratuberculose

Toutes les pratiques qui permettent l'exposition directe ou indirecte des animaux susceptibles aux fèces des vaches infectées sont considérées des facteurs de risque pour la PTB (McKenna, Keefe et al. 2006). Les facteurs de risque peuvent être classés en facteurs de risque d'introduction et de transmission à l'intérieur du troupeau.

2.4.1.1 Facteurs de risque d'introduction de MAP

Une revue systématique évaluant les facteurs de risque d'introduction de MAP dans un troupeau a conclu que le principal facteur était l'achat d'animaux (Rangel, Paré et al. 2015). Ce facteur est un des facteurs les plus fréquemment rapportés dans la littérature comme étant associés aux infections par MAP dans les troupeaux (Sorge, Lissemore et al. 2012; Kunzler, Torgerson et al. 2014). Une étude de cas-témoins visant à évaluer les facteurs de risque associés à un statut de troupeau positif (déterminé par au moins un cas clinique de PTB confirmé par sérologie, coloration de Ziehl-Neelsen, PCR ou culture dans les 5 dernières années), a conclu que les troupeaux qui achetaient en

moyenne deux animaux ou plus par année avaient plus de chances d'être positifs (OR=7,3; IC 95 % : 5,4-28,3) que les troupeaux qui achetaient au maximum un animal par année (Kunzler, Torgerson et al. 2014). Dans une autre étude visant à évaluer les facteurs de risque associés à un statut positif de troupeau, mais cette fois déterminé en utilisant l'ELISA sur des échantillons de lait individuels, les troupeaux qui avaient achetés des animaux (génisses, taures, vaches ou taureaux) dans les 20 dernières années avaient plus de chances d'avoir au moins une vache positive à l'ELISA-lait (OR=2,7; IC 95 % : 1,3-7,1) que les troupeaux n'ayant pas acheté des animaux (Sorge, Lissemore et al. 2012).

D'autres facteurs d'introduction de MAP dans un troupeau que les achats d'animaux incluent l'épandage de fumier, le partage d'équipement agricole entre fermes et l'absence de mesures de biosécurité pour les visiteurs (Johnson-Ifearegulu and Kaneene 1999). L'épandage de fumier provenant de fermes positives ou avec un statut incertain à MAP a été identifié comme étant significativement associé à la présence de deux vaches ou plus positives à l'ELISA-sérum (OR=5,8; IC 95 % : 1,5-22,8) dans une étude cas-témoins (Johnson-Ifearegulu and Kaneene 1999). Le partage d'équipement agricole entre fermes et l'absence de mesures de biosécurité pour les visiteurs (les bottes et les vêtements contaminés avec des fèces peuvent agir comme véhicule pour introduire la bactérie) ont été suggérés comme facteurs de risque favorisant l'introduction de MAP dans un troupeau dans le « *Consensus Statement* » du *American College of Veterinary Internal Medicine* (Sweeney, Collins et al. 2012).

2.4.1.2 Facteurs de risque de transmission de MAP

Les facteurs de risque de transmission concernent toutes les voies de transmission de MAP des vaches infectées aux veaux. Les mesures préventives visent à éviter que les veaux ingèrent du colostrum ou du lait provenant des vaches infectées (Streeter, Hoffsis et al. 1995) ou de l'aliment contaminé avec les fèces des animaux infectés (Manning and Collins 2010).

2.4.1.2.1 Facteurs de risque au vêlage

Le contact des veaux avec les fèces des adultes a été identifié dans une revue systématique comme le facteur de risque le plus important pour la transmission de MAP (Doré, Paré et al. 2012). L'absence d'une aire de vêlage spécifique et isolée du troupeau pour les vaches en préparation a été associée au statut positif de troupeau (OR=1,7; IC 95 % : 1-2,8; Vilar, Santos et al. 2015) déterminé par l'ELISA réalisé sur des échantillons de sérum individuels (une vache séropositive si moins de 24 vaches dans le troupeau et 2 vaches ou plus pour les troupeaux avec plus de 24 vaches). (Pieper, Sorge et al. 2015; Vilar, Santos et al. 2015); L'utilisation d'aires de vêlage à usage multiple (OR=1,3; $P=0,004$) et l'aire de vêlage souillée (OR=1,3; $P=0,015$) ont été associées avec la présence d'au moins une vache dans le stade clinique dans la dernière année (Berghaus, Lombard et al. 2005). Dans une étude réalisée au Danemark, les vaches provenant d'un troupeau utilisant une quantité inadéquate de litière avaient plus de chances d'être positives à l'ELISA sur le lait (OR=3; intervalle de crédibilité 95 %: 1,2-8,1) que les vaches provenant d'un troupeau dans lequel la quantité de litière dans l'aire de vêlage était adéquate (Nielsen and Toft 2007). La contamination des trayons des vaches en préparation au vêlage a été significativement associée au statut positif du troupeau (déterminé par PCR réalisée sur le lait de réservoir), dans une étude iranienne (OR=6,4; IC 95 % : 1,3-31,5; Ansari-Lari, Haghkhah et al. 2009).

2.4.1.2.2 Facteurs de risque associés à l'alimentation

L'isolement de MAP à partir du colostrum et du lait de vaches positives à la culture fécale suggère que l'alimentation peut être un facteur de risque (Streeter, Hoffsis et al. 1995). Donner du colostrum d'une seule vache à plusieurs veaux a été associé à la probabilité d'être positive à l'ELISA sur le sérum (OR=1,1; IC 95 % : 1,09-1,12) dans une étude longitudinale de 5 ans réalisée dans 7 troupeaux américains (Pillars, Grooms et al. 2011). L'impact de la source de colostrum ou de lait offert aux veaux sur le développement futur des anticorps contre MAP a été évalué dans une étude (Nielsen, Bjerre et al. 2008). Les auteurs ont conclu qu'offrir du colostrum de plusieurs vaches au lieu du colostrum de la mère seulement (OR=1,2; IC 95 % : 1,1-1,4) et laisser les veaux

téter d'autres vaches (OR=2,0; IC 95 % :1,4-2,9) augmentaient les chances d'être positif à l'ELISA sur le lait (Nielsen, Bjerre et al. 2008). Les facteurs mentionnés ici haut, ainsi que la contamination des instruments (chaudières et biberons) par des fèces ont été inclus parmi les recommandations des experts consignés dans le « *Consensus Statement* » du *American College of Veterinary Internal Medicine* (Sweeney, Collins et al. 2012). Les vaches peuvent également s'infecter à l'âge adulte si la fréquence et la dose d'exposition à MAP sont élevées (Nielsen and Ersboll 2006; Weber, Kogut et al. 2010). La contamination des pâturages et de l'eau représente un risque significatif pour l'infection des animaux adultes, mais les animaux doivent être exposés à des doses élevées (Weber, Kogut et al. 2010).

2.4.1.2.3 Facteurs de risque lors de l'élevage des veaux

D'autres facteurs de risque sont liés à l'élevage des veaux. Dans une étude visant à évaluer les facteurs de risque associés à la présence des infections à MAP dans 33 troupeaux, les auteurs ont conclu que l'exposition des veaux de moins de 6 mois aux vaches adultes et leurs fèces était associée au statut positif du troupeau déterminé par au moins un animal positif à la culture fécale (échantillonnage de tout le troupeau); (OR=30; IC 95 % :1,2-808); (Obasanjo, Grohn et al. 1997). L'exposition des veaux aux vaches autres que leur mère a été associée aussi à la probabilité (d'une vache) d'être positive à l'ELISA sur le sérum (OR=1,09; IC 95 % : 1,06-1,13); (Pillars, Grooms et al. 2011). L'hébergement des veaux en groupes d'animaux de différents âges est aussi un facteur de risque. Une étude canadienne a conclu que l'hébergement des génisses avant sevrage pendant l'hiver était significativement associé avec un plus grand nombre de vaches séropositives (CR=2,0; IC 95 % :1,3-2,81; Tiwari, VanLeeuwen et al. 2009). Ce facteur de risque prend plus d'importance étant donné que l'excrétion chez les veaux a été rapportée récemment (Bolton, Pillars et al. 2011; Mortier, Barkema et al. 2014; Wolf, Orsel et al. 2015), surtout dans les troupeaux fortement contaminés (Weber, Kogut et al. 2010).

2.4.2 Revue des publications portant sur le contrôle de la paratuberculose

Les études analysant les mesures de contrôle de la PTB peuvent se classer en modèles mathématiques et études épidémiologiques.

2.4.2.1 Modèles mathématiques

Les modèles mathématiques estiment l'impact de la mise en place des mesures de contrôle sur la prévalence de la PTB en simulant différents scénarios. Le principal avantage de ces modèles est le coût réduit comparé aux études épidémiologiques. Les modèles mathématiques suggèrent qu'il est possible de contrôler la PTB avec la mise en place des bonnes pratiques de régie, notamment celles ciblant les voies d'infection (Marce, Ezanno et al. 2010). Les modèles mathématiques suggèrent aussi que la prévalence à l'intérieur du troupeau augmenterait sans la mise en place de mesures de contrôle (Groenendaal, Nielen et al. 2002; Pouillot, Dufour et al. 2004; Mitchell, Whitlock et al. 2008). Dans un de ces modèles la prévalence augmentait de 20 % à 50 % de façon constante dans un horizon de 20 ans en absence de mesures de contrôle (Groenendaal, Nielen et al. 2002). Ce même modèle concluait que le contrôle de la PTB est effectif seulement si les pratiques de régie concernant les veaux sont améliorées de façon drastique (Groenendaal, Nielen et al. 2002). Dans une autre étude visant à modéliser la transmission à l'intérieur d'un troupeau suite à l'achat d'une génisse infectée, l'incidence cumulée de cas cliniques de PTB par an augmentait de façon constante jusqu'à 0,13 dans les petits troupeaux de 20 vaches (Pouillot, Dufour et al. 2004). Dans les troupeaux de 40 à 100 vaches, l'incidence cumulée augmentait rapidement jusqu'à 0,22 cas par an dans les premières 6 à 10 années. Après cette période, l'incidence cumulée ne dépassait pas cette valeur dans ces troupeaux, peu importe leur taille (Pouillot, Dufour et al. 2004).

2.4.2.2 Études de cohorte

Les études de cohorte sont idéales pour évaluer les changements de la prévalence ou de l'incidence après la mise en place de mesures de contrôle (Schukken, Whitlock et

al. 2015). Étant donné la longue période d'incubation des infections par MAP, un suivi de 4 à 5 ans est nécessaire pour étudier l'évolution de la PTB (Pillars, Grooms et al. 2011). Dans ces études, un questionnaire d'analyse de risque est administré afin d'avoir une estimation du risque d'introduction et de transmission de MAP (Ferrouillet, Wells et al. 2009; Espejo, Godden et al. 2012; Wolf, Barkema et al. 2015).

Dans la littérature, nous n'avons recensé que 5 études de cohorte dans lesquelles un suivi de 5 ans ou plus a été réalisé (Benedictus, Mitchell et al. 2008; Ferrouillet, Wells et al. 2009; Collins, Eggleston et al. 2010; Pillars, Grooms et al. 2011; Espejo, Godden et al. 2012). La conclusion générale de ces études est qu'après la mise en place d'un programme de contrôle standardisé, on observe une réduction de la prévalence (environ 50 %) ou du risque de séroconversion et d'excrétion fécale de MAP (environ 30 à 40 %).

2.4.3 Revue des programmes de contrôle dans le monde

La distribution mondiale de la PTB pourrait être une conséquence de la nature subclinique de l'infection et de la faible sensibilité des tests diagnostiques en début de l'infection. L'expansion de la PTB serait également produit par la transmission possible entre les pays à cause des facteurs comme les échanges d'animaux, le développement des systèmes de production et les ententes de libre-échange (Manning and Collins 2010; Kennedy 2011). L'association entre MAP et la maladie de Crohn chez l'humain a augmenté l'intérêt des chercheurs, des associations de producteurs et des organismes gouvernementaux de santé animale pour la PTB et c'était une des motivations de la création de l'Association internationale sur la PTB (IAP pour le sigle en anglais) en 1989. Le but de l'IAP est de promouvoir l'avancement scientifique des études sur la PTB et des maladies associées (*International Association for Paratuberculosis*).

Les programmes de contrôle structurés ont été lancés principalement dans les années 2000. Par contre, dans certains pays comme l'Australie, le programme de contrôle existe depuis plus de 20 ans (Citer and Sergeant 2014). Un des éléments déclencheurs pour le développement des programmes dans le monde est l'augmentation de la prévalence de la PTB (Geraghty, Graham et al. 2014). Cependant, d'autres pays comme l'Italie et l'Irlande ont des motivations particulières liées à la protection des marchés

d'exportation. En Italie, les exportations annuelles de fromage parmesan s'élèvent à 13 millions d'euros et environ 15 % de la demande mondiale en lait de remplacement pour les enfants provient de l'Irlande. Ces 2 cas démontrent que les consommateurs sont sensibles à la présence de MAP dans le lait et au risque zoonotique potentiel que cela représente (Arrigoni, Ruocco et al. 2014; Mullaney and Strain 2014). Les sections suivantes sont un résumé des perceptions présentées par les leaders des programmes de prévention et contrôle de la PTB dans le monde dans le 4^e forum sur la PTB (*International Association for Paratuberculosis* 2014).

2.4.3.1 Initiatives à l'origine des programmes de prévention et contrôle de la paratuberculose

Dans la plupart des pays, les programmes ont débuté grâce à des initiatives impliquant les associations de producteurs (par exemple en Belgique : Chaîne belge de production laitière (Mintiens 2014), au Danemark : *Danish Cattle Association* (Nielsen and Krogh 2014)), les transformateurs du lait, les organisations de santé animale (par exemple en Irlande : *Animal Health and Welfare* (Mullaney and Strain 2014) et en France : les groupes de défense sanitaire; Fourichon and Guatteo 2014), les médecins vétérinaires et les agences gouvernementales (par exemple en Italie le ministère de la Santé (Arrigoni, Ruocco et al. 2014) et au Québec : le MAPAQ (MAPAQ 2012)). La gestion des programmes implique également l'action conjointe des partenaires avec la collaboration des groupes de recherche universitaires.

2.4.3.2 Participation dans les programmes de prévention et contrôle de la paratuberculose

La participation des producteurs dans les programmes de prévention et contrôle est variable d'un pays à l'autre et même à travers les régions dans un même pays. Elle dépend fortement de l'implication et de la motivation des responsables des programmes et des médecins vétérinaires (Kelton, Barkema et al. 2014). Pour ce qui est de la participation des producteurs dans les programmes volontaires, les programmes canadien

et belge ont des taux de participation parmi les plus élevés (35 % au Canada et en Belgique; 22 % au Québec : MAPAQ 2012) dépassés seulement par le sud de l’Australie (95 %; Rogers, Nosworthy et al. 2012) et suivis par le Danemark (27 %; Nielsen and Krogh 2014), l’Irlande (10 %; Mullaney and Strain 2014), les États-Unis (9 %; *International Association for Paratuberculosis* 2012) et la France (4 %; Fourichon and Guatteo 2014). La participation élevée dans le sud de l’Australie pourrait être expliquée par l’approche coopérative (industrie et gouvernement) d’une nouvelle initiative de programme de contrôle qui contrastait avec les mesures de contrôle sévères mises en place avant 2005, par exemple la quarantaine des troupeaux infectés ou suspects et l’abattage des animaux positifs (Rogers, Nosworthy et al. 2012). La participation au programme est volontaire dans la plupart des pays avec quelques exceptions : Autriche (Khol and Baumgartner 2014), Allemagne (Campe, Köhler et al. 2014), Italie (Arrigoni, Ruocco et al. 2014), Norvège (Østerås 2014), Pays-Bas (Weber, van Schaik et al. 2014) et République-Tchèque (Kralik and Slana 2014).

2.4.3.3 Objectifs des programmes de prévention et contrôle de la paratuberculose

Parmi les objectifs les plus fréquemment énoncés par les leaders des programmes de prévention et contrôle de la PTB dans le monde, on trouve (USDA-APHIS-VS 2010; Kennedy 2011; Geraghty, Graham et al. 2014; *International Association for Paratuberculosis* 2014) :

- La sensibilisation et l’éducation des producteurs.
- La diminution de la prévalence et de l’incidence de cas cliniques.
- La diminution de la contamination des fermes et des produits alimentaires par MAP pour améliorer la qualité (innocuité) des produits d’origine animale.
- La protection des troupeaux et des régions exempts afin de diminuer l’impact sur le commerce.

2.4.3.4 Éléments clés des programmes de prévention et contrôle de la paratuberculose

La plupart des programmes sont fondés sur 4 éléments clés : 1) l'éducation des producteurs, 2) le questionnaire d'analyse de risque d'introduction ou transmission, 3) l'amélioration des pratiques de régie et 4) le dépistage des troupeaux visant l'obtention d'un statut (USDA-APHIS-VS 2010; Kennedy 2011; Geraghty, Graham et al. 2014; *International Association for Paratuberculosis* 2014). Les experts participant au forum s'entendant sur le fait que l'éducation et la sensibilisation des producteurs et médecins vétérinaires sont essentielles pour le succès des programmes. L'importance des vétérinaires a été observée aussi dans une étude britannique visant à comparer les attitudes nuisant l'amélioration de la biosécurité dans les fermes bovines et ovines au Royaume-Uni à l'aide de la théorie de l'action raisonnée, un modèle provenant de la psychologie sociale (Gunn, Heffernan et al. 2008). Dans cette étude, les médecins vétérinaires ont été identifiés par les producteurs comme la première source de conseil et la référence la plus importante pour ce qui concerne la biosécurité sur les fermes, suivi par le gouvernement et les autres producteurs (Gunn, Heffernan et al. 2008). Aux États-Unis, le volet éducation était la porte d'entrée des producteurs au programme (USDA-APHIS-VS 2010). À travers des sessions individuelles ou de groupe et même des formations en ligne, les producteurs sont informés sur l'épidémiologie de la maladie, les stratégies de contrôle et de dépistage et sur les éléments qui définissent le programme de contrôle, notamment sur les options de participation (USDA-APHIS-VS 2010). Présentement, ce volet n'est plus en vigueur (Dr. Allen Roussel, communication personnelle). Au Canada, des initiatives intéressantes utilisant la communication et la formation continue comme outils dans le contrôle de la maladie ont été développées (Kelton, Barkema et al. 2014).

Certains programmes possèdent des particularités; par exemple, le programme australien inclut un « score laitier » et un plan en 3 étapes pour les veaux (Condrom and McNeil 2014). Le premier vise à assurer le commerce de sujets à faible risque en donnant un statut aux animaux afin d'augmenter la confiance des producteurs lors des achats des sujets de remplacement. Le second vise à réduire le risque de contamination des jeunes sujets grâce à la mise en place de 3 recommandations de base : 1) séparer le veau de la

mère dans les 12 heures après le vêlage, 2) éviter le contact des veaux avec le fumier des animaux adultes et 3) ne pas faire brouter les génisses dans des pâturages où il y a eu des animaux adultes dans les 12 derniers mois. Ce plan en 3 étapes pour les veaux est perçu par les producteurs comme un chemin économique et sécuritaire pour réduire le risque de PTB dans les fermes. Ce plan permet également de réduire la prévalence d'autres maladies entériques contagieuses comme la diarrhée néonatale.

Les éléments clés varient dans certains pays. En République-Tchèque la notification des cas, l'implantation des mesures et la restriction de commerce des troupeaux positifs sont les éléments clés du programme (Kralik and Slana 2014). En Allemagne, l'achat d'animaux à faible risque fait partie des piliers du programme avec les mesures d'hygiène, le dépistage et les réformes (Campe, Köhler et al. 2014). La réforme des animaux positifs sans un plan de gestion et contrôle n'est pas rentable ni efficace. Cela a été suggéré dans une étude visant à estimer l'impact économique des pratiques de régie recommandées dans le programme danois de prévention et contrôle (stratégies basées sur le risque de transmission) en comparaison aux pratiques non basées sur le risque de transmission (Kudahl, Nielsen et al. 2008). La stratégie de dépistage et réforme des animaux positifs à l'ELISA (sans réduction de la transmission à l'intérieur du troupeau) a été simulée pour différents niveaux de prévalence initiale (5 %, 25 % et 50 %) dans un horizon de 10 ans. Pour les troupeaux avec une prévalence au départ de 5 %, la prévalence finale était 8-15 %. Pour les troupeaux avec une prévalence au départ de 25 %, la prévalence finale était 26-39 %. Par contre, pour les troupeaux avec une prévalence au départ de 50 %, une diminution de la prévalence a été estimée (37-49 %) en utilisant seulement le dépistage et la réforme des animaux positifs (Kudahl, Nielsen et al. 2008). La simulation réalisée dans cette étude suggère que dans tous les cas (prévalence du départ égale à 5 %, 25 % ou 50 %), la combinaison des stratégies basées sur le risque de transmission et le dépistage et réforme des animaux positifs contribue à une diminution de la prévalence jusqu'à zéro (Kudahl, Nielsen et al. 2008). Par contre, la vitesse pour atteindre ce niveau varie selon la prévalence de départ du troupeau (5 % : 4 ans; 25 % : 9 ans; 50 % : 10 ans); (Kudahl, Nielsen et al. 2008). Les stratégies basées sur le risque de transmission de MAP avaient aussi un impact positif sur la production laitière individuelle qui était évident à partir de l'année 3 suite à la mise en place des bonnes

pratiques de régie (Kudahl, Nielsen et al. 2008). Également, un impact positif des stratégies basées sur le risque sur le revenu annuel net par vache a été estimé (Kudahl, Nielsen et al. 2008). Cet impact positif était évident à partir de la deuxième année suite à la mise en place des bonnes pratiques de régie (Kudahl and Nielsen 2009). Les résultats de cette étude sont en accord avec les observations faites dans les programmes de contrôle et prévention dans le monde : raison pour laquelle le questionnaire d'analyse de risque et les bonnes pratiques de régie sont aujourd'hui des éléments essentiels de tous les programmes de contrôle structurés (Geraghty, Graham et al. 2014; Kelton, Barkema et al. 2014).

2.4.3.5 Stratégies de dépistage utilisées dans les programmes de prévention et contrôle de la paratuberculose

Les stratégies de dépistage sont variables selon le pays. En général, les tests les plus utilisés sont l'ELISA (sur le lait ou le sérum), la PCR (sur les fèces), et la culture bactérienne des prélèvements soit de l'environnement ou des fèces provenant d'animaux individuels. La fréquence des tests varie d'annuelle (Belgique, Italie; Arrigoni, Ruocco et al. 2014; Mintiens 2014), biannuelle (Allemagne; Campe, Köhler et al. 2014) ou 4 fois par année (Danemark; Nielsen and Krogh 2014). Le diagnostic chez les animaux positifs à la sérologie est confirmé par la culture fécale aux Pays-Bas, en Allemagne et aux États-Unis (USDA-APHIS-VS 2010; *International Association for Paratuberculosis* 2012; Campe, Köhler et al. 2014; Weber, van Schaik et al. 2014) ou par PCR en Belgique (Mintiens 2014). Au Royaume-Uni, la stratégie de dépistage cible les vaches avec la probabilité la plus élevée d'être positives, par exemple les vaches âgées, avec un comptage de cellules somatiques élevé et diminution de la production laitière (Orpin and Sibley 2014).

2.4.3.6 Défis les plus fréquemment rencontrés dans les programmes de prévention et contrôle de la paratuberculose

Certains défis universels dans les programmes de prévention et contrôle ont été identifiés par les leaders (*International Association for Paratuberculosis* 2014) :

- Augmenter la participation des producteurs notamment pour les troupeaux à faible prévalence et maintenir l'intérêt pour le programme au fil du temps.
- Démontrer la valeur des programmes dans les troupeaux potentiellement infectés, mais sans évidence clinique ou perte économique mesurable.
- Améliorer la compréhension de l'épidémiologie de la maladie notamment quant à l'interprétation des résultats aux tests, à la possibilité de résultats variables dans le temps et au risque d'introduction de MAP lors des achats, malgré un test individuel négatif.

2.4.3.7 Leçons retenues dans les programmes de prévention et contrôle de la paratuberculose

Plusieurs leçons ont été tirées par les leaders des programmes de prévention et contrôle de la PTB à travers le monde suite à l'évolution des programmes (*International Association for Paratuberculosis* 2014):

- Les pratiques de régie ciblées pour le contrôle des maladies entériques contagieuses sont efficaces.
- La stratégie de contrôle doit être en accord avec les ressources disponibles et satisfaire les objectifs du producteur ou de l'industrie.
- La stratégie de dépistage et réforme des animaux positifs seule ne contrôle pas la maladie. Il est crucial d'interpréter et de communiquer adéquatement la signification d'un résultat positif à un test.
- Le dépistage régulier et sur plusieurs années augmente la confiance envers le statut individuel et de troupeau (Kalis, Collins et al. 2004; Lavers, Dohoo et al. 2015).

- La formation et l'implication des médecins vétérinaires sont essentielles pour la réussite des programmes (Ritter, Kwong et al. 2015).
- La collaboration entre les médecins vétérinaires et les producteurs est la clé du succès. Il est possible d'obtenir et maintenir un statut à faible risque après avoir été diagnostiqué comme infecté en respectant quelques recommandations simples.

CHAPITRE 3
HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

En considérant le contexte québécois, nous avons émis les hypothèses suivantes :

- 1) La mise en place de mesures de contrôle des maladies entériques contagieuses du PVQPCP diminue l'excrétion fécale de MAP et ce même dans les petits troupeaux avec une faible prévalence de MAP. Cela se reflète par une réduction de l'incidence de l'excrétion fécale chez les vaches nées après l'adhésion de la ferme au PVQPCP par rapport aux vaches du même troupeau nées avant.
- 2) La CPE est une méthode efficace pour identifier les troupeaux laitiers québécois en stabulation entravée infectés par MAP.
- 3) L'utilisation stratégique de la PCR sur des échantillons déclarés NI améliore la stratégie de détection des troupeaux laitiers en stabulation entravée infectés par MAP.

Les objectifs de cette thèse sont :

1. Déterminer l'impact de l'adhésion des fermes laitières en stabulation entravée dans le PVQPCP et de la mise en place de mesures de contrôle des maladies entériques contagieuses sur l'incidence de l'excrétion fécale individuelle de MAP.
2. Améliorer la stratégie d'identification des troupeaux laitiers québécois en stabulation entravée infectés par MAP en :
 - a. Évaluant la performance d'une technique de culture de prélèvements de l'environnement pour l'identification des troupeaux laitiers québécois en stabulation entravée infectés par MAP.
 - b. Évaluant la performance d'une méthode PCR pour la détection de l'ADN de MAP dans les échantillons déclarés comme NI au préalable.

CHAPITRE 4

INCIDENCE D'EXCRÉTION FÉCALE DE *MYCOBACTERIUM* *AVIUM* SSP. *PARATUBERCULOSIS* CHEZ LES VACHES LAITIÈRES AVANT ET APRÈS L'ADHÉSION DES FERMES AU PROGRAMME VOLONTAIRE QUÉBÉCOIS DE PRÉVENTION ET CONTRÔLE DE LA PARATUBERCULOSE

INCIDENCE OF FECAL EXCRETION OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSP. *PARATUBERCULOSIS* IN DAIRY COWS BEFORE AND AFTER THE ENROLMENT IN THE QUÉBEC VOLUNTARY PROGRAM

Détails du rôle du candidat: Je suis le premier auteur de l'article. J'ai réalisé quatre des cinq prélèvements du projet (2012 à 2015); avec un autre membre de l'équipe de recherche (VW), j'étais responsable de la collecte des échantillons et de l'information à la ferme ainsi que de la livraison des échantillons au LÉAQ. J'ai construit la base de données du projet en mettant ensemble de l'information provenant de différentes sources : les résultats du LÉAQ, les dossiers de santé animale (DSA), le contrôle laitier et les questionnaires d'analyse de risque du MAPAQ (questionnaire initial) et ceux complétés par les médecins vétérinaires. J'ai validé et nettoyé la base de données. Sous la supervision du groupe de recherche, j'ai fait l'analyse et l'interprétation des données. J'ai rédigé la première version de l'article et j'adressé les commentaires des collaborateurs du groupe de recherche et des réviseurs du journal.

Article publié dans Preventive Veterinary Medicine Journal en décembre 2017.

J. C. Arango-Sabogal^a, J. Paré^b, O. Labrecque^c, G. Côté^d, J.P. Roy^a, S. Buczinski^a, V. Wellemans^a, G. Fecteau^{a*}

a. Département de sciences cliniques, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 8H5, Canada

b. Agence canadienne d'inspection des aliments, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada

c. Laboratoire d'épidémiosurveillance animale du Québec, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 7X9, Canada

d. Direction générale des laboratoires et de la santé animale, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, Québec, G1P 4S8, Canada

Corresponding author at Département de sciences cliniques, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 8H5, Canada; telephone: (450) 773-8521 ext: 8337; fax: (450) 778-8102; email: gilles.fecteau@umontreal.ca

Abstract

Paratuberculosis is a chronic and contagious enteric disease of ruminants caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). This disease of worldwide distribution is responsible for significant economic losses and the bacteria itself has been linked to human Crohn's disease. Paratuberculosis control programs focus on reducing MAP transmission by implementing better management practices that target infection routes. In Québec, a Voluntary Paratuberculosis Prevention and Control Program (QVPPCP) was launched in 2007. The objectives of this prospective cohort study were threefold. The first was to describe the changes in the incidence of fecal excretion of MAP in cows born before and after farm enrolment in the QVPPCP. The second was to estimate the impact of the risk of within-herd transmission of MAP (measured by the risk assessment score (RAS)) on the incidence of fecal excretion of MAP. And the third was to evaluate the impact of calf rearing practices on the incidence of fecal excretion of MAP. Eighteen MAP-positive herds were visited annually from 2011 to 2015. At each visit, individual fecal samples from all adult cows were collected. MAP was cultured using liquid media and an automated system. A risk assessment questionnaire was completed upon enrolment in the QVPPCP and at each visit. The RAS of the farm was attributed to each cow according to its birthdate. Cox proportional hazards models were used to estimate the hazard ratios (HR) for the exposure variables. Herd clustering was taken into account using robust standard errors. A total of 2158 cows were included (cohort born before $n=919$; cohort born after $n=1239$). The incidence and hazard of fecal excretion were significantly lower for the cohort-after than the cohort-before (incidence rate ratio=0.38; 95% CI: 0.18-0.78 and HR=0.48; 95% CI: 0.23-0.98). The HR of fecal excretion for cows exposed to a high RAS was 2.20 times (95% CI: 1.21-3.99) that of cows exposed to a low RAS. Poor calving cow hygiene (HR=3.41; 95% CI: 1.40-8.31) and contact between pre-weaned heifers and adult cows or their feces were significantly associated with an increased hazard of fecal excretion of MAP (HR=2.66; 95% CI: 1.08-6.56). Our results suggest that enrolment in the QVPPCP reduces the risk of MAP fecal excretion. They support the hypothesis that contact between calves and adult cows or their feces increases MAP transmission. The incidence results also suggest that MAP prevalence could be reduced to low levels regardless of initial MAP prevalence.

Highlights

- Positive impact of enrolment in the Québec voluntary program on MAP incidence.
- Lower hazard of MAP fecal excretion in cows exposed to the Québec voluntary program.
- A high score of MAP transmission was associated with a high hazard of fecal excretion.
- The role of calves' exposure to adult cows or their feces in MAP transmission was supported.

Keywords

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*, fecal excretion, dairy cattle, prevention, control program, Cox proportional hazards model.

4.1 Introduction

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) is the causative agent of paratuberculosis, a ruminant disease distributed worldwide (Lombard, 2011). Paratuberculosis has been associated with economic losses related to reduced milk production (Lombard et al., 2005), increased replacement costs (Hendrick et al., 2005), and decreased slaughtered carcass weight (Kudahl and Nielsen, 2009). It has been suggested that the zoonotic potential of MAP (given its association with human Crohn's disease) should not be ignored (Waddell et al., 2008), even though the causal link has not been established (Waddell et al., 2008; Waddell et al., 2015).

The primary route of MAP transmission is the fecal-oral route (Manning and Collins, 2010). Contact of calves with adult feces is the greatest risk factor associated with transmission of MAP (Doré et al., 2012). Paratuberculosis has a long latent period (from infection to excretion), with animals usually getting infected at a young age (Windsor and Whittington, 2010) and not excreting MAP in feces until after 2 years of age (Nielsen and Ersboll, 2006). Moreover, the incubation period (from infection to clinical signs) is even longer, with clinical signs often being observed after 5 years of age (Jubb and Galvin, 2004). A latent period shorter than the incubation period leaves a window of opportunity for an asymptomatic shedder to perpetuate the disease in the herd. Given that excretion in young animals has been recently reported (Bolton et al., 2011; Mortier et al., 2014; Wolf et al., 2015b), this window might be even wider in high prevalence herds as the probability of observing fecal excretion in young animals increases as herd prevalence increases (Weber et al., 2010).

Observational studies have incriminated the purchase of animals as an important factor associated with MAP herd status and prevalence (Sorge et al., 2012; Kunzler et al., 2014). Epidemiological models and field studies have suggested that MAP can be controlled by the implementation of good management practices. A review of 8 epidemiological models of within-herd transmission of MAP in dairy cattle suggests that actions targeting infection routes (avoiding fecal-oral transmission by improving calving area hygiene or by adequate colostrum/milk feeding management) are the only effective strategies to decrease MAP prevalence (Marce et al., 2010). Several epidemiological

models also suggest that within-herd prevalence increases in the absence of control measures (Groenendaal et al., 2002; Pouillot et al., 2004; Mitchell et al., 2008). One stochastic model suggests that the test-and-cull strategy by itself would have little or no effect on prevalence (Groenendaal et al., 2002).

Prospective longitudinal studies are essential to understand the epidemiology of insidious diseases like paratuberculosis (Schukken et al., 2015) and would be suitable to evaluate the changes in disease prevalence or incidence after implementation of better management practices. Given the long incubation period of MAP infection, a minimum of 4 to 5 years of follow-up is required to study the evolution of the disease (Pillars et al., 2011). In most longitudinal studies, a risk assessment questionnaire is administered to determine a score which is used as an indicator of the risk of introduction and/or within-herd transmission of MAP, a lower score indicates a lower risk (Ferrouillet et al., 2009; Espejo et al., 2012; Wolf et al., 2015a). The risk score has also been used to monitor owner compliance over the years (Ferrouillet et al., 2009; Collins et al., 2010; Ridge et al., 2010; Sorge et al., 2011b; Espejo et al., 2012; Wolf et al., 2015a). According to some studies, management practices are more likely to be implemented in farms with positive tests results (Sorge et al., 2011b; Wolf et al., 2015a) and owner compliance and motivation toward the program can be negatively affected by the number of years of participation in control programs or by consecutive negative test results (Wolf et al., 2015a). In one study, less than 20% of Australian herds implemented the entire 3-point calf rearing plan of the Victorian Bovine Johne's Disease Test and Control program. The authors considered these results disappointing given that all participants had infected herds, were legally required to participate in the program, and had even received participation subsidies and constant advice from veterinary staff (Ridge et al., 2010).

Cohort studies are expensive and labor and time consuming. To the best of our knowledge, there are only 5 prospective cohort studies with a follow-up period of ≥ 5 years that evaluate the impact of the implementation of a standardized control program or strict management practices on MAP prevalence or incidence (Benedictus et al., 2008; Ferrouillet et al., 2009; Collins et al., 2010; Pillars et al., 2011; Espejo et al., 2012). In these studies, a reduction in apparent prevalence or incidence of paratuberculosis after the implementation of a standardized control program was observed. However, they were all

conducted in the United States, mostly in large free-stall herds with medium to high MAP within-herd prevalence. In Canada, differences in paratuberculosis prevalence have been observed across provinces. In Québec, in 2011, MAP was found in the environment of 7% of the herds enrolled in the Québec Voluntary Paratuberculosis Prevention and Control Program (QVPPCP; MAPAQ, 2012). The QVPPCP was launched in 2007. As part of the Canadian National Dairy Study conducted in 2015, 375 farms were visited across the 10 Canadian provinces for environmental and bulk tank milk sampling for paratuberculosis (Kelton et al., 2016). In Québec, the Voluntary Paratuberculosis Prevention and Control Program (QVPPCP) was launched in 2007. Upon enrollment in the QVPPCP, producers complete a risk assessment questionnaire to identify the risk of introduction and transmission of MAP. The veterinarian then recommends better management practices according to the critical points identified during the risk assessment questionnaire. No sampling is performed in the first year of enrollment. In the second and subsequent years, the program focuses on: 1) following up on the implementation of the better practices recommended by the veterinarian during the last visit and 2) herd-level testing using environmental sampling. In Québec, where the climate is dissimilar from the US, most of the dairy herds are smaller (average herd size is 64 cows per farm) and housed mostly in tie-stall barns (92% of the herds) compared to Western Canada where the average herd size is 150 cows and >80% of herds are housed in free-stall barns (Groupe AGÉCO, 2013). We hypothesized that the changes in management practices may reduce the transmission of MAP and, in the long-term, reduce the incidence of fecal excretion of MAP even in small, low prevalence tie-stall herds. Thus, the objectives of this prospective cohort study were to: 1) describe changes of the incidence density rate of individual fecal excretion of MAP in 2 cohorts of cows – cows born before and after farm enrolment in the QVPPCP; 2) determine the impact of the risk score of within-herd transmission of MAP (measured by a risk assessment questionnaire) on the incidence of individual fecal excretion of MAP; and 3) evaluate the impact of calf rearing management practices on the incidence of individual fecal excretion of MAP.

4.2 Material and Methods

4.2.1 Study design

A prospective field cohort study was conducted in Québec dairy herds from October 5, 2011 to November 24, 2015.

4.2.2 Selection of animals and herds

Sampling frame: Québec dairy herds were the target population. The source population was composed of the dairy herds enrolled in the QVPPCP.

The study sample was chosen using a cluster sampling strategy with the herd as the primary sampling unit and the adult cow as the unit of interest. No paired-matching of cows was performed at any level. An adult cow was defined as a cow of at least 24 months of age which had given birth at least once.

Herd selection: Any herds enrolled in the QVPPCP and that tested positive to individual fecal or environmental MAP culture or histopathology within 24 months of the beginning of the study were candidates for inclusion in the study. Additional selection criteria were tie-stall configuration, regular herd health visits, and access to electronic health records or dairy herd improvement data. Eighteen positive herds from 6 geographical Québec regions (Bas-Saint-Laurent, Centre-du-Québec, Chaudière-Appalaches, Estrie, Capitale-Nationale and Montérégie) corresponding to the center, east and south of Québec were included in the study.

Sample size: Initial sample size estimation was performed assuming a closed population and a risk-based study, as suggested previously (Dohoo et al., 2009). The sample size was estimated to detect a reduction of at least 3% of the within-herd fecal excretion prevalence with a confidence of 95% and a power of 80% using the following equation (Dohoo et al., 2009):

$$n = \frac{[Z\alpha\sqrt{(2pq)} - Z\beta\sqrt{p_1q_1 + p_2q_2}]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

In the equation, n is the minimal number of animals required, $Z\alpha$ is the value obtained from the standard normal distribution for 95% confidence (1.96), $Z\beta$ is the value

obtained from standard normal distribution for a power of 80% (-0.84), p_1 is the estimated prevalence (5%), p_2 is the desired prevalence (2%), q_1 is $(1-p_1)$, q_2 is $(1-p_2)$, p is $(p_1+p_2)/2$, and q is $1-p$. The minimum number of cows by cohort was estimated to be 588 cows.

4.2.3 Cohorts

It was assumed that producers implement the management practices recommended by veterinarians within 6 months after the date of enrolment. This assumption was based on a previous study (Collins et al., 2010). Thus, for the present study, adding 6 months to the date of enrolment in the QVPPCP was considered as the date that defined the two cohorts within each herd – cows born before and cows born after the implementation of the changes associated with enrolment in the QVPPCP – hereafter named “cohort-before” and “cohort-after” respectively.

4.2.4 Sample collection

Herds were visited annually (during the fall season) from 2011 to 2015. At each visit, the entire adult herd was sampled regardless of the distribution of cows within the cohorts. An individual fecal sample of about 20g was collected from all adult cows using a single-use veterinary glove without lubricant. Sample collectors were unaware of which cows belonged to any of the cohorts. Upon reception and within 24h of collection, the fecal samples were stored at -80°C until the analyses were performed. Samples were analyzed at the Québec Animal Disease Surveillance Laboratory (LEAQ) in Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, which is a laboratory accredited for MAP culture by the United States Department of Agriculture (USDA).

4.2.5 MAP culture

Isolation of MAP was achieved using liquid media (MGIT Para TB culture media) and an automated system (BACTEC 960 system; Becton, Dickinson and Company). Decontamination of individual fecal samples was performed as previously described (Arango-Sabogal et al., 2016a) and following the recommendations of the manufacturer (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) and the USDA (Harris et al., 2009). After decontamination, 3 tests were performed in series: 1) incubation in the

automated system, 2) acid fast bacilli (AFB) staining, and 3) confirmatory polymerase chain reaction (PCR) assay. A sample was considered MAP positive if all 3 tests were positive, otherwise they were declared negative (Arango-Sabogal et al., 2016b; Rangel et al., *In press*).

4.2.6 Risk Assessment Questionnaire

A risk assessment questionnaire was completed for each farm by a trained veterinarian (performing Johne's disease risk assessment) at the time of enrolment in the QVPPCP and at each visit during the study period.

The questionnaire evaluates the management practices potentially connected with introduction or dissemination of MAP in a herd. It is divided into sections according to the age of the animals or the production areas in the farms (purchases, calving area, pre-weaned heifers, weaned heifers, bred heifers, and adult cows). The risk assessment questionnaire used in the QVPPCP is a qualitative questionnaire which for the present study was transformed into a quantitative format in order to obtain a risk assessment score of within-herd transmission of MAP (hereafter referred to as RAS). Only the sections of the questionnaire that targeted management practices associated with within-herd transmission were considered to determine the RAS for the present study given that participant herds were known to be MAP positive. Sixteen questions (Table 4.1), for a maximum total score of 80 points, are used to evaluate the risk of MAP transmission within the herd.

The RAS was applied to a different population of herds available from the databases of the research group and for which herd MAP status and management practices were known. Using the positive likelihood ratios (+LR) for MAP positive herds, a cut-off (37 points) was established to dichotomize the risk of transmission into two categories (low risk and high risk). In the present study, the same cut-off was used to classify herds. Herds were included in the low risk group if their RAS was ≤ 37 points (meaning a +LR ≤ 1) and in the high risk group if their RAS was > 37 (meaning a +LR > 1). Given that MAP transmission is more likely to occur in young animals, each cow was assigned the RAS from the farm at the time the cow was born, as previously recommended (Bolton et al., 2011; Pillars et al., 2011). Thus, the RAS at enrolment (RAS

0) was attributed to cows from the cohort-before. The cows from the cohort-after were assigned the RAS corresponding to their birthdate (RAS 1, 2, 3 or 4). Thus, RAS1 was attributed to cows born between the enrolment and the date of completion of RAS1; RAS2 was attributed to cows born between the date of completion of RAS1 and the date of completion of RAS2; and RAS3 was attributed to the cows born between the date of completion of RAS2 and the date of completion of RAS3. RAS4 was not attributed to any of the cows as none of them was born after the date of completion of RAS3.

For the present study, the risk associated with cattle introduction was evaluated annually by the attending veterinarian using the following criteria: number of purchased animals, number of source herds, and knowledge of the source herd MAP status. An overall assessment of the risk of introduction was then provided from low to high. Next, a global risk associated with cattle introduction for the entire study period was compiled for each herd using available attending veterinarian assessments. Herds were considered to have a global high risk (of introducing MAP) if the attending veterinarian assessment was high in at least 50% of the questionnaires. Otherwise, the herds were classified as low-medium risk.

4.2.7 Statistical analysis

The unit of interest was the cow. Cows were assumed to be fecal culture negative before their first test. Only cows born and raised on the farms were considered for the analysis; purchased cows were excluded.

4.2.7.1 Explanatory variables

For the first objective, the exposure of interest was being born before or after the enrolment of the farm in the QVPPCP (variable cohort). The breed of cow (Holstein and other breeds) was another explanatory variable considered in the analysis. For the second objective, the exposure of interest was the RAS, dichotomized as low and high risk. Another explanatory variable considered was the risk associated with cattle introduction (low-medium and high). For the third objective, the exposures of interest were all calf rearing management practices concerning the calving area, pre-weaned heifers, and weaned heifers (Table 4.2). The question about calving cow hygiene (CA4) was evaluated according to the guidelines of the Canadian Bovine Mastitis Research Network

(Canadian Bovine Mastitis Research Network, 2014). The risk associated with cattle introduction was also considered in this model.

4.2.7.2 Outcome variable

The outcome of interest was the individual fecal excretion of MAP (measured by the individual fecal culture result: positive or negative). The occurrence of an event was also described in terms of hazard or hazard ratio (HR). An event was defined as the first positive individual fecal culture result. The HRs and 95% confidence intervals (95% CI) were estimated. Statistical significance was set at $P < 0.05$. For the variable cohort, an HR different from 1 was interpreted as a decrease (< 1) or an increase (> 1) in hazard of individual fecal excretion of MAP for the cohort-after compared with the cohort-before. For the other main explanatory variables (RAS and calf rearing practices), an HR different from 1 was interpreted as a decrease (< 1) or an increase (> 1) in hazard of individual fecal excretion of MAP for the cows exposed to a high risk (relative to the explanatory variable) compared to cows exposed to a low risk.

4.2.7.3 Time at risk

Given that cows were sampled after the age of 2 years, they were assumed to be at risk of fecal excretion after that age. Thus, the time at risk (TAR) was defined as the period (in years) elapsed from the age of 2 years until the event or censor.

4.2.7.4 Censoring

Due to the study design, the 2 cohorts did not have similar follow-up periods (e.g. the cohort-before had a longer follow-up period than the cohort-after). In order to account for this difference, a right-censoring and a left-truncation of the follow-up period for the cohort-before was performed.

4.2.7.4.1 Right-censoring

Observations were right-censored if cows were either culled or dead, lost to follow-up, or if they did not experience the event at the end of the study period. However, given that the cohort-after was followed for a maximum of 5.3 years, cows from the cohort-before were right-censored at that TAR.

4.2.7.4.2 Left-truncation

Cows from the cohort-before had between 2 and 13 years of age at their first test; while cows from the cohort-after had between 2 and 4 years of age at their first test. If no additional test was performed for the cows from the cohort-after that entered the study at the age of 4 years (e.g. they were positive or censored at that test), their TAR would be 2 years. Thus, to equilibrate the TAR of the cows from the cohort-before that entered the study at an age greater than 4 years, an additional left-truncation of the TAR was performed. Left-truncation consisted of starting the TAR for those cows from the cohort-before (older than 4 years at their first test) at the age at their first test minus 2 years (Figure 1).

4.2.7.5 Incidence density rate

The incidence density rate of individual fecal excretion of MAP over the study period was estimated for the entire population and by group of animals according to each category of main explanatory variables (cohort, RAS and calf rearing practices) in the univariable analysis. The rate was estimated by dividing the number of events observed during the study period by the total TAR, and then multiplying by 100 to obtain the number of events per 100 cows-year. The incidence rate ratio and the 95% CI were then calculated to compare the relative rates between the categories of predictors.

4.2.7.6 Univariable analysis

Initially, a simple Cox proportional hazards model was used to evaluate the unconditional associations between each explanatory variable (cohort, RAS and calf rearing practices) and the outcome. The HRs and Kaplan-Meier survival curves for the effect of all explanatory variables on the individual fecal excretion of MAP were calculated. Selection of potential explanatory variables to be included in the multivariable Cox proportional hazards models was based on their significance at $P < 0.2$ and their biological plausibility (e.g. association between predictors and fecal excretion according to what has been published or what is generally accepted). Correlated explanatory variables were identified using the X^2 test ($P < 0.05$).

4.2.7.7 Cox proportional hazards model

Three Cox proportional hazards models were proposed to estimate the HR at any point in the follow-up period for each exposure variable (cohort, RAS and calf rearing practices). The final multivariable models were built using a manual forward selection procedure. Explanatory variables were kept in the models based on epidemiologic considerations (e.g. exposure of interest: cohort – RAS or calf rearing practices according to the model; or biological plausibility; or potential confounder) and statistical considerations (model comparisons using the likelihood ratio statistic test ($P < 0.05$)). Risk associated with cattle introduction was considered *a priori* a potential confounder and was forced in the final models for the RAS and calf rearing management practices. Biologically plausible interactions were studied between significant variables from the multivariable models.

The X^2 test suggested an association between the variables Herd and Breed ($X^2=1531.1$; $P < 0.001$). Breed was not included in further analysis and Herd was kept to address clustering. Other predictors that were not further considered in the models after the univariable analysis were: source of colostrum fed to newborn calves (CA6), inversely associated with hazard of individual fecal excretion, and risk of fecal contamination of food/water fed to weaned heifers (WH2), not statistically significant. No significant interactions between the predictors of the final models were observed.

Final Cox proportional hazards models were as follows:

$$h(t) = h_0(t) \times e^{B_1x_1 + \dots + B_nx_n}$$

In the equation, $h(t)$ is the expected hazard at time t , $h_0(t)$ is the baseline hazard and represents the hazard when all of the predictors ($X_1 \dots X_n$) are equal to zero. Final model 1 included only one predictor: the cohort (before and after). Final model 2 included two predictors: RAS and risk associated with cattle introduction. Model 3 included six predictors: CA1, CA2, CA3, CA4, PWH2 and risk associated with cattle introduction.

4.2.7.8 Clustering

Data clustering by herd was taken into account using robust standard errors under the assumption that all cows in the herd were exposed to the same herd management practices at the same point in time. The estimate obtained with this approach represents the average across the population of clusters (i.e. the effect of being born before or after the enrolment of the farm in the QVPPCP on the incidence of MAP fecal excretion across all herds)..

4.2.7.9 Assumptions of the Cox proportional hazards models

The proportional hazard assumption for the final models was checked using the plot of $-\log(-\log)$ survival curves and by comparing the Kaplan-Meier and Cox survival functions. The overall model fit was evaluated using the Cox-Snell residuals. All analyses were conducted in Stata® Statistical Software (Release 14. College Station, TX: StataCorp LP).

4.3 Results

4.3.1 Herds

Participant farms ($n=18$) were enrolled in the QVPPCP between 2007 and 2012 (Table 4.3). Farms were visited annually from the fall 2011 to the fall 2015.

4.3.2 Cows

A total of 2856 cows were sampled during the study period. Among them, 698 cows were excluded from the analysis (date of birth was not available for 73 cows and 625 cows were not born and raised on the farms). Among the cows included in the analysis ($n=2158$), 919 cows (42.6%) were born before and 1239 (57.4%) were born after the implementation of the changes associated with enrolment in the QVPPCP.

At the end of the study, the number of samplings by cow was variable: 824 cows (38.2%) were sampled once, 692 cows (32.1%) were sampled twice, 382 cows (17.7%) were sampled 3 times, 188 cows (8.7%) were sampled 4 times, and 72 cows (3.3%) were sampled every year (5 times).

4.3.3 Breed

Only 1 breed was present in 15 herds (Holstein in 12 herds, Jersey in 2 herds, and Canadian in 1 herd). In 3 herds, more than 1 breed were present (Holstein and Jersey in 2 herds; and several breeds including Holstein, Ayrshire, Jersey and crossbred cows in 1 herd) (Table 4.4). At the individual level, Holstein was the most common breed ($n=1765$; 81.8%), followed by Jersey ($n=298$; 13.8%), and other breeds such as Canadian ($n=58$; 2.7%); Ayrshire ($n=27$; 1.25%); Brown Swiss ($n=1$; 0.05%); and crossbred cows (Jersey-Holstein, Brown Swiss-Holstein, Canadian-Holstein, and Belgian Blue-Holstein) ($n=9$; 0.4%). For the purpose of this study, cows were grouped into 2 categories: Holstein ($n=1765$) and other breed ($n=393$).

4.3.4 Prevalence

The proportion of fecal culture positive results by herd for the cows born and raised on the farms is detailed in Table 4.3. The prevalence of individual fecal excretion varied from 0.6% to 2.0% (2.0% in 2011, 0.6% in 2010, 1.2% in 2013, 0.7% in 2014, and

1.3% in 2015). While the mean within-herd prevalence varied from 0.9% to 2.9% (2.9% in 2011, 0.9% in 2012, 1.9% in 2013, 1.0% in 2014, and 2.0 in 2015).

4.3.5 Risk assessment score

On average, the RAS at enrolment (mean RAS₀=37.5; 95% CI: 31.2-43.8) was higher than the RAS for the subsequent visits of the study (Figure 2) (mean RAS₁=22.8; 95% CI: 17.7-27.9; mean RAS₂=23.6; 95% CI: 18.3-28.9; mean RAS₃=23.9; 95% CI: 17.9-30.0; mean RAS₄=20.2; 95% CI: 14.1-26.3). The evolution of the RAS by farm during the study is presented in Table 4.4.

4.3.6 Incidence density rate of individual fecal excretion

A total of 44 events (2.0%) of fecal excretion were observed during the study (cohort-before=33; cohort-after=11). The total TAR for the entire population was 4489.7 cows-year (cohort-before=2405.0 cows-year; cohort-after=2084.7 cows-year). The incidence density rate during the study and for each group of animals (according to the categories of the explanatory variables) and the incidence rate ratio (IR) are presented in Table 4.5. The incidence density rate was significantly lower for the cohort-after compared to the cohort-before (IR=0.38; 95% CI: 0.18-0.78; $P=0.004$). The incidence density rate was significantly higher among cows of other breeds compared to Holstein cows (IR=4.07; 95% CI: 2.14-7.69; $P<0.001$), and significantly higher for cows exposed to a high RAS compared to cows exposed to a low RAS (IR=2.32; 95% CI: 1.23-4.40; $P=0.006$). The incidence density rate was also significantly higher for the high risk category of all the specific management practices, except for exposure of newborn calves to the feces of neighbouring cows (CA1), source of colostrum fed to newborn calves (CA6), contact between weaned heifers and adult cows or their feces (WH1), and fecal contamination of food/water fed to weaned heifers (WH2). No statistically significant difference was observed in the incidence density rate of individual fecal excretion by category of risk associated with cattle introduction (IR=1.23; 95%CI: 0.65-2.39; $P=0.5$). The incidence density rate by cohort at the herd level is presented in Table 4.6.

4.3.7 Survival analysis

The univariable analysis of the explanatory variables is presented in Table 4.5. Kaplan-Meier failure curves for the cohort and RAS variables are shown in Figure 3. The final Cox proportional hazards models for the effect of cohort, RAS and calf rearing management practices on the individual fecal excretion of MAP are presented in Table 4.7. At any given time during the follow-up period the hazard of individual fecal excretion was significantly lower (HR=0.48; 95% CI: 0.23-0.98; $P=0.044$) for cows born after the enrolment of the farm in the QVPPCP. The hazard of individual fecal excretion was 2.20 times higher (95% CI: 1.21-3.99; $P=0.009$) for cows exposed to a high than to a low RAS of MAP transmission. In the best fit of the model to evaluate the time until fecal excretion based on specific management practices, only poor calving cow hygiene (CA4) (HR=3.41; 95% CI: 1.40-8.31; $P=0.007$) and contact between pre-weaned heifers and adult cows or their feces (PWH2) (HR=2.66; 95% CI: 1.08-6.56; $P=0.034$) were significantly associated with individual fecal excretion of MAP.

4.4 Discussion

The lower incidence rate and hazard of individual fecal excretion of MAP in cows exposed to the QVPPCP observed in our study suggest a positive impact for a farm to enroll in such a program. The direction and magnitude of our results are in agreement with previous studies in which the analyses were longitudinal (Benedictus et al., 2008; Ferrouillet et al., 2009; Espejo et al., 2012) or cross-sectional (Collins et al., 2010; Pillars et al., 2011). Benedictus et al., 2008, followed 1 Guernsey herd for 20 years and observed a reduction in MAP fecal prevalence after participation in a control program from 60% to 20% within 15 years (Benedictus et al., 2008). Six dairy herds enrolled for 5 years in the US National Johne's Disease Demonstration Herd Project were studied and a reduction in the hazard of seroconversion and fecal excretion in cows exposed to the program was observed (HR ranging from 0.63 to 0.67; Ferrouillet et al., 2009). The results of this study were later confirmed in a second study which included 2 additional herds and 10 years of observations (Espejo et al., 2012). In 2010, Collins et al., estimated the within-herd apparent prevalence after the full implementation of a control program composed of 7 specific calf rearing management practices. The authors observed a significant reduction of MAP seroprevalence (50% reduction) after the implementation of the program. Finally, in Pillars' study, 7 herds enrolled in the Michigan Johne's Disease Control Demonstration Project were studied and a protective effect associated with exposure to the program was measured (OR ranging from 0.06 to 0.57; Pillars et al., 2011). The present study has the unique feature of being conducted on small tie-stall herds with low MAP prevalence, which differentiates it from previous studies.

Using a risk assessment questionnaire and establishing a herd management plan are common elements of both the QVPPCP and the US Voluntary Bovine Johne's Disease Control Program (USVBJDCP) (USDA-APHIS-VS, 2010; Geraghty et al., 2014). In the USVBJDCP, these 2 elements are covered in the "management level" of the program, which producers can take after completing the "education level." The "education level" provides producers with general information about Johne's disease, management strategies for the different sections of the farm, and testing options (USDA-APHIS-VS, 2010). An education level is not a requirement for participation of producers

in the QVPPCP. In fact, the education component of the QVPPCP is offered mostly to veterinarians. Research groups educate producers through the dissemination of their research results in conferences and articles targeting producers.

Within the risk assessment and herd management plan there are 2 other elements that are common to both programs: identification of animals and updating and verifying risk assessment after enrolment. In the USVBJDCP, it is recommended that animals be individually identified using official ear tags (USDA-APHIS-VS, 2010) while in Québec identification is performed using the Agri-Traçabilité Québec (ATQ) system, an identification system implemented to create traceability in the bovine, ovine and swine industries (Agri-Traçabilité Québec (ATQ), 2015). In this reliable identification system, each animal has a unique identification number.

Even if no individual testing is performed as a part of the QVPPCP, veterinarians can test cows in a given herd to confirm clinical signs. As in the USVBJDCP, positive animals identified in herds enrolled in the QVPPCP cannot be sold to other farms; they should be sold to the slaughterhouse. A reliable animal identification system (e.g. ATQ) contributes to reducing the between-herd dissemination of MAP.

Verification of the risk assessment and the management plan is performed every 12 to 18 months in Québec and at least every 3 years in the US. However, implementation of the herd management plan is voluntary in the QVPPCP as opposed to the USVBJDCP, where risk assessment and the herd management plan have to be completed to the satisfaction of the coordinator of the Johne's disease program (USDA-APHIS-VS, 2010).

As previously reported (Espejo et al., 2012), it is likely that the lower incidence and hazard of individual fecal excretion of MAP observed in the present study is a consequence of the reduction of the risk of within-herd transmission of MAP for animals at farms born after QVPPCP enrolment. The statistically significant reduction of the mean RAS during the study period compared to the mean RAS at enrolment suggests that enrolment in the QVPPCP encouraged the owner's willingness to implement corrective measures. In other longitudinal studies, the owners adhered to the recommended practices of the control program as they were part of a demonstration project (Ferrouillet et al.,

2009; Collins et al., 2010; Pillars et al., 2011; Espejo et al., 2012). In our study, the owners voluntarily enrolled in the QVPPCP. Upon enrolment and at each visit, the veterinarians suggested improvements in the management practices related to the critical points identified by the RAS. However, implementing these practices or not remained a personal decision of the owners. It has been suggested that management practices recommended in a control program should be adapted to the circumstances of each farm to increase compliance (Rossiter and Burhans, 1996). The reduction in the RAS observed over the study period suggests that recommended measures were at least partially implemented by the owners or the attending veterinarian perceived that there was some improvement. Previous studies analyzed retrospectively (Raizman et al., 2006; Wells et al., 2008) and prospectively (Sorge et al., 2011b) the RAS of farms and observed a reduction of the score after the implementation of management practices.

The reduction in the RAS should reflect a reduction in the risk of within-herd transmission of MAP. One might expect a significantly lower individual fecal excretion in cows that were exposed to a lower risk of MAP transmission when they were calves, as we observed in the present study. These findings are in agreement with a previous study that suggested that the reduction of the risk of seroconversion and fecal excretion in the cows exposed to the JDDHP was more important for herds that also achieved a low RAS at the end of the study (Ferrouillet et al., 2009). However, given that our study was observational in nature we cannot conclude on causal relationships.

The RAS does not precisely identify one specific management practice as more important than the others. The RAS is composed of several questions concerning different age and management groups within the farm. Good calf rearing practices are considered crucial for MAP control. In fact, it has been found to be one of the most common elements across control programs all over the world (Geraghty et al., 2014). Given that the sections of the questionnaire concerning the calving area, the pre-weaned heifers and the weaned heifers accounted for about 83% of the total RAS (66 out of 80 points), these sections were studied in more detail in the present study.

A higher risk of transmission associated with poor calving cow hygiene and a high risk of contact between pre-weaned heifers and adult cows or their feces were

significantly associated with a higher hazard of individual fecal excretion. Those results were expected since the most important risk factor for MAP transmission is the contact of calves with adult cow feces (Doré et al., 2012). These 2 questions (CA4, PWH2) evaluate the possible direct and indirect contact of calves with adult cow feces. The presence of feces on the udders, hind legs, flanks or hips of calving cows is a potential risk for infection for newborn calves if the dam is infected. Three important management practices of the calving area section included in the final model were not significantly associated with the hazard of individual fecal excretion of MAP in our study (risk of exposure of newborn calves to feces of neighbouring cows [CA1]; risk of exposure of newborn calves to the feces of sick cows [CA2]; and risk of exposure of newborn calves to a wet and dirty environment [CA3]). This appears to be counterintuitive. However, these questions (Table 4.2), evaluate the risk of contact between calves and feces from other dams, not strictly their mother. More precisely, they evaluate whether cows are tied up immediately adjacent to the calving cow (CA1) and if sick cows are close to the calving cows (CA2), all risks not necessarily associated with the dam. It is also expected that in small herds multiple births at the same time would be infrequent. The third question (CA3) assesses the direct contact of calves with fecal material. However, MAP transmission remains possible even after improving these criteria (low humidity, good bedding, no manure and use of the bridge over the gutter), particularly if the dam's hygiene remains poor (e.g. manure on udders). It has been suggested that there is a close association between the infection status of the dam and the status of its calf and that the strength of this association can be moderated or amplified by the management practices of the farm (Manning and Collins, 2010).

Our results confirm the relevance of contact of calves with adult cow feces in the transmission of MAP and give insight into the management practices that should be prioritized to reduce the individual fecal excretion of MAP in tie-stall herds enrolled in the QVPPCP.

Cattle introduction is an important risk factor for the introduction of MAP into a herd (Rangel et al., 2015). It has also been associated with a positive herd status (Sorge et al., 2012; Kunzler et al., 2014). When purchased animals originate from multiple source herds the risk is even more pronounced (Pieper et al., 2015). Given the relevance of this

practice for MAP control, the variable was forced in the final Cox models even if not statistically significant in the univariable analysis. Thus, the HRs obtained in the models represent the effect of the variables of interest after adjusting for the risk associated with cattle introduction, except in the model assessing the impact of the cohort given that purchases were not included. It is expected that the hazard of individual fecal excretion of MAP in a herd with a high risk associated with cattle introduction would be higher than the hazard in a low-medium risk herd. However, in our study sample, this predictor was not statistically significant. To evaluate the effect of cattle introduction practices on individual fecal excretion, a different study design and a different model would be required. The exposure of interest of this study would be cattle introduction and the interaction of this variable with the risk of within-herd transmission of MAP should be further explored. One might hypothesize that the magnitude of the impact of cattle introduction depends on the risk of within-herd transmission of the farm. For example, the introduction of an infected animal into a farm might be amplified in a herd with poor management practices while the effect could be of lesser magnitude in a herd with a low risk of transmission.

Breed has been suggested to be associated with paratuberculosis. One study suggested that more clinical cases were reported in farms where Channel Island breeds (Jersey and Guernsey) were predominant compared to farms where Holstein was the predominant breed (Çetinkaya et al., 1997). Channel Island breeds were also more likely to test positive to milk-ELISA than other breeds in a Canadian study (Sorge et al., 2011a). In the present study, the incidence density rate and hazard of individual fecal excretion of MAP were significantly higher for other breeds compared to Holstein in the univariable analysis which made this variable a potential predictor to be included in the multivariable model. However, breed and herd were found to be associated in the pairwise analysis. This association may be explained by the fact that even if breed was measured at the individual level, in nearly all of the herds only 1 breed was represented. Because of this lack of variation, breed was not further investigated.

Because of the nature of this field study, a strict comparison of exposed and non-exposed animals at the same time within the same herd was neither feasible nor possible. When producers decide to implement (or not) a management practice, it is applied to the

entire herd and not only to some individuals. A strict comparison of exposure would require that changes associated with the enrolment in the QVPPCP would be implemented only in a subset of the herd, ideally randomly assigned. This strategy would be ethically unacceptable and unrealistic. In order to make causal inferences, the ideal scenario would be to compare each cow with its hypothetical counterfactual individual (Dohoo et al., 2009). In our study, this would involve comparing each exposed cow (born after the enrolment of the herd in the QVPPCP) with itself if it was not exposed. It is clear that this is not possible as counterfactual individuals is a theoretical concept (Dohoo et al., 2009). To overcome this difficulty, we compared within each herd the cows born before with the cows born after enrolment in the QVPPCP. Due to this particularity of our study, two biases may occur regarding the cohorts: a survival bias (as the exposure and the disease may affect whether or not a cow remains in the herd) and a follow-up bias given that TAR of both cohorts may be different (Dohoo et al., 2009). Consequently, the incidence density rate might be underestimated in 2 ways: 1) MAP positive cows are missing in the numerator of the incidence calculation since these events were not observed during the study; and 2) the denominator includes all the TAR of the oldest cows from the cohort-before. There is no way to correct for an imperfect study design. However, the missing (non-observed) events described above could be further studied using different scenarios of false positive and false negative percentages. This could provide insight into the possible effects of bias associated with the current study design. At the first visit, several cows from the cohort-before were already culled for different reasons. One may think that among these culled cows some were excreting cows (events). These animals would not be included in the study population while the TAR of the negative cows present in the herd would be included given our assumption of beginning the TAR at the age of 2 years. This assumption led to differences in the follow-up period of the 2 cohorts (e.g., the cohort-before had a higher TAR than the cohort-after). These old cows from the cohort-before were not likely infected. Consequently, the oldest cows from the cohort-before that remain in the herd may not be the optimal group to represent the study population. For this reason, a right-censoring and a left-truncation were performed. The right-censoring was performed taking into account the maximum follow-up period for the cohort-after. For the cohort-before, the left-truncation of the

TAR was done at the age of the first test of the cows minus 2 years (Figure 1). The time for left-truncation was decided based on the age at the first test of the oldest cows from the cohort-after entering the study (4 years). Given that some cows from the cohort-before were tested for the first time at an age greater than 4 years, we decided to start the TAR of these cows 2 years prior to the first test in order to equilibrate both cohorts. Other authors had also performed data adjustments in order to equilibrate 2 cohorts. In 2009, Ferrouillet et al. excluded all the cows born more than 2 years prior to the beginning of the program since many had already left the herd. In the same study, all the cows were also right-censored at the maximum follow-up time of the youngest cohort (45 months of follow-up time; Ferrouillet et al., 2009). Even after the adjustment performed in the present study, our estimates remain very conservative for 2 reasons. First, the incidence of fecal excretion of MAP might have been underestimated given the sensitivity of fecal culture. Second, the MAP excreting cows culled before the beginning of the study underestimate the incidence of individual fecal excretion in the cohort-before. If these lost events had been observed during the study and then considered in the incidence estimate, it is likely that a greater difference between cohorts would have been observed.

The large increase in the cumulative failure probability observed in the Kaplan-Meier failure curve at year 2 for the cohort “before” (Figure 2) may be a consequence of the left-truncation of the TAR performed in the present study. In the follow up at year 2, 12 failures were observed. These 12 cows, who entered the study at an age greater than 4 years, were positive at their first test in the study. After the left-truncation of the cohort “before,” the TAR for these cows was 2 years. Including these cows in the year 2 follow up increased the cumulative failure probability curve at that time for the cohort “before.” If no left truncation was performed, these events would be observed at different times, increasing the cumulative failure probability curve as well. The large increase in the cumulative failure probability of the cohort “after” observed at the end of the Kaplan-Meier failure curve (follow up time=4.9 years) is most likely produced by the low number of animals of the cohort “after” with a follow up period >4.9 years (n=13) and by the only failure observed after that time (n=1).

In the QVPPCP, no individual fecal testing of cows is performed. Thus, the producers are not aware of the fecal status of individual cows. Upon enrollment in the

QVPPCP, producers completed a risk assessment questionnaire to identify the risk of MAP transmission. The veterinarian then recommends better management practices according to the critical points identified during the risk assessment questionnaire. No sampling is performed in the first year of enrollment. In the second and subsequent years, the program focuses on: 1) following up on the implementation of the better practices recommended by the veterinarian during the last visit and 2) herd-level testing using environmental sampling. During the present study, the individual fecal culture status of cows was provided to the owners and veterinarians when these results were available (about 6 months after sampling). It is important to consider that the herds participating in our study were enrolled in the QVPPCP between 2007 and 2012 while the study sampling was performed from Fall 2011 to Fall 2015. The characteristics of the QVPPCP, the enrolment period in the QVPPCP of the herds of our study, and our study's sampling period, support the hypothesis that the lower incidence and hazard of individual fecal excretion of MAP observed in our study is a consequence of the reduction of the risk of within-herd transmission of MAP for animals born after QVPPCP enrolment rather than a consequence of culling individual fecal culture positive cows. Culling of cows based on the individual fecal culture results of our study would reduce the environmental MAP load on farms. Given the long latent period of paratuberculosis, it is likely that the impact of an environmental MAP load reduction on fecal excretion would be measurable beyond our study period when calves exposed to this less contaminated environment become adults.

Given that attending veterinarians were aware of the herd test results of the year prior to the questionnaire. Thus, one might hypothesize that the perception of improvement (or not) of the management practices may have been different for veterinarians attending high prevalence herds than for those attending low to moderate prevalence herds. However, as the reduction of the RAS was observed in most of participant herds, we considered that this recall bias was less likely to have occurred.

The choice of the RAS threshold used in the present study to classify the herds into low and high risk may affect both the sensitivity and the specificity of this tool, which would have an impact on our estimates. Despite that, we further explored the

impact of specific questions of the questionnaire (which are not affected by global score and chosen cut-off) on fecal excretion of MAP and the estimates go in the same direction.

One of the inclusion criteria for participation of herds in the present study was the availability of electronic health records. The precision of data was important in our study (e.g. the date of birth of the cows) in order to correctly classify the cows into 2 cohorts. In some herds, records were obtained using the DSA (animal herd records) system while in other herds data were obtained through the Dairy Herd Improvement (DHI) program. Some herds had both. Having electronic records (either DSA or DHI) is a common practice in Québec dairy herds. Of the 5500 Québec dairy producers, about 30% (>1500) use the DSA and about 80% (4503 herds) are enrolled in the DHI program.

The herds included in the study may differ from other Québec dairy herds enrolled in the QVPPCP since they agreed to participate in research projects. Given the longitudinal nature of this study, participant herds were conveniently selected based on, among other criteria, their willingness to collaborate. This limits the external validity of our results since the herds were not randomly selected. However, the herds of the present study are typical of Québec dairy herds in terms of herd size and stall configuration.

4.5 Conclusions

Our results suggest a positive impact of the enrolment of the farms in the QVPPCP, with: 1) a significantly lower incidence and hazard of individual fecal excretion of MAP in cows exposed to the program and, 2) a reduction of the risk of within-herd transmission of MAP. This study confirms the importance of calving cows' hygiene and of limiting contact between calves and adult cows or their feces to reduce MAP transmission. Changes in management practices reduce the fecal excretion of MAP even in small tie-stall herds with low MAP prevalence. The incidence results of some herds suggest that MAP prevalence could be reduced to low levels regardless of initial MAP prevalence.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the veterinarians for their contribution in completing the risk assessment questionnaires and transferring herd health data, and the producers for their participation in this longitudinal study. Thanks to Dr Walter Verhoef for his availability and patience during sampling training for this study.

Funding: This work was supported by le Programme de soutien à l'innovation en agroalimentaire du Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec [811134, 2011-2012].

Table 4.1. Number of questions and maximum score by section of the risk assessment questionnaire used to evaluate the risk of within-herd transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy herds enrolled in the Québec Voluntary Paratuberculosis Prevention and Control Program.

Section	Number of questions by section	Maximum total score
Calving area (CA)	6	30
Pre-weaned heifers (PWH)	3	21
Weaned heifers (WH)	3	15
Bred heifers (BH)	2	10
Adult cows (AC)	2	4
Total	16	80

Table 4.2. Description of calf rearing management practices for the evaluation of the risk of within-herd transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy herds enrolled in the Québec Voluntary Paratuberculosis Prevention and Control Program.

Questions by section	Code	Categories
Calving area		
Risk of exposure of newborn calves to feces of neighboring cows	CA1	Low: empty stall on each side of the calving cow High: no empty stall on each side of the calving cow
Risk of exposure of newborn calves to the feces of sick cows	CA2	Low: calving cows are never attached next to sick cows High: calving cows are attached next to sick cows
Risk of exposure of newborn calves to a wet and dirty environment	CA3	Low: low humidity, abundant bedding, low presence of manure and use of a bridge over the gutter at calving High: no control of at least one of the points mentioned above
Risk associated with calving cow cleanliness ^a	CA4	Low risk ^a High risk ^a
Cow-calf separation	CA5	Low: < 1 hour after calving High: > 1 hour after calving
Source of colostrum fed to newborn calves	CA6	Low: commercial or from one 1 st lactation cow High: ≥ 2 nd lactation cow or from 1 MAP suspected cow or pooled
Pre-weaned heifers (PWH)		
Source of milk fed to PWH	PWH1	Low: milk replacer or pasteurized or from a cow not suspected of MAP High: from one MAP suspected cow or pooled
Risk of contact between PWH and adult cows or their feces ^b	PWH2	Low: no direct contact or at most low indirect contact High: rare direct contact or occasional indirect contact

Risk of fecal contamination of milk/food/water fed to PWH	PWH3	Low: adequate cleanliness of bottles and buckets High: inadequate cleanliness of bottle and buckets
Weaned heifers (WH)		
Risk of contact between WH and adult cows or their feces ^b	WH1	Low: no direct contact or at most indirect contact High: at least rare direct contact or at least occasional indirect contact
Risk of fecal contamination of food/water fed to WH	WH2	Low: adequate cleanliness of buckets, leftovers from adult cows are not offered to WH, equipment used for feeding is not used for cleaning High: at least one of the above criteria is present
Risk of exposure of WH to manure spread on the fields ^c	WH3	Low risk ^c High risk ^c

^a Calving cow cleanliness score evaluates the percentage of cows with a score ≥ 3 according to the clean assessment score of the Canadian Bovine Mastitis Research Network. Cut-offs: udder (back and sides) < 10% of cows; hind legs < 15% of the cows; flanks and hips < 20% of the cows. Low risk: all the 3 cut-offs are respected; high risk: at least 1 of the cut-offs is not respected (Canadian Bovine Mastitis Research Network, 2014).

^b Evaluates the risk of direct contact (being close to adults, runoff or manure splashing) and indirect contact (through boots or instruments).

^c Low risk: manure is never spread on the fields either grazed by WH or harvested for hay to be offered in the same season; high risk: manure is spread on the fields grazed by WH or harvested for hay to be offered in the same season; the farmer buys hay from other producers.

Table 4.3. Year of enrolment, number and proportion of individual positive fecal culture results for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in 18 herds enrolled in the Québec Voluntary Paratuberculosis Prevention and Control Program (QVPPCP).

Herd	Year of enrolment in the QVPPCP	Breed	Year of Sampling									
			2011		2012		2013		2014		2015	
			N	+FC (%)	N	+FC (%)	N	+FC (%)	N	+FC (%)	N	+FC (%)
A	2007	H	45	1 (2.2)	39	1 (2.6)	40	0 (0)	47	0 (0)	47	0 (0)
B	2007	H	152	1 (0.7)	152	0 (0)	153	0 (0)	150	1 (0.7)	148	2 (1.4)
C	2008	H	192	0 (0)	211	0 (0)	204	0 (0)	201	0 (0)	182	0 (0)
D	2008	H	43	2 (4.7)	46	1 (2.2)	34	1 (2.9)	31	0 (0)	27	0 (0)
E	2008	H	28	0 (0)	28	0 (0)	31	0 (0)	29	0 (0)	30	1 (3.3)
F	2008	H	71	3 (4.2)	72	1 (1.4)	64	1 (1.6)	63	0 (0)	66	0 (0)
G	2008	H	27	0 (0)	25	0 (0)	27	1 (3.7)	25	0 (0)	24	0 (0)
H	2008	H	42	0 (0)	39	0 (0)	42	0 (0)	36	0 (0)	42	0 (0)
I	2008	J	47	0 (0)	50	0 (0)	53	3 (5.7)	55	0 (0)	NS	-
J	2008	H	13	1 (7.7)	23	1 (4.3)	22	1 (4.5)	30	0 (0)	30	2 (6.7)
K	2010	O	32	8 (25.0)	32	2 (6.3)	27	2 (7.4)	28	2 (7.1)	25	3 (12.0)
L	2010	H-J	86	2 (2.4)	93	0 (0)	91	1 (1.1)	105	1 (1.0)	76	2 (2.6)
M	2011	C	NS	-	27	0 (0)	31	0 (0)	36	0 (0)	41	0 (0)
N	2012	J	NS	-	33	0 (0)	37	1 (2.7)	39	2 (5.1)	36	0 (0)
O	2010	H	35	0 (0)	18	0 (0)	17	0 (0)	NS	-	NS	-
P	2010	H	28	0 (0)	29	0 (0)	36	0 (0)	NS	-	NS	-
Q	2008	H-J	20	0 (0)	13	0 (0)	NS	-	NS	-	NS	-
R	2009	H	53	0 (0)	60	0 (0)	NS	-	NS	-	NS	-
Total	-		914	18 (2.0)	990	6 (0.6)	909	11 (1.2)	875	6 (0.7)	774	10 (1.3)

N: number of cows born and raised on the farms. +FC: number of positive fecal culture results. NS: Not sampled either because the farm did not continue in the study or entered late in the study. Breed: H=Holstein; J=Jersey; H-J=Holstein and Jersey; O=Several breeds including Holstein, Jersey, Ayrshire, Brown Swiss and Crossbred cows.

Table 4.4. Risk assessment score (RAS) of within-herd transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in 18 positive dairy herds enrolled in the Québec Voluntary Paratuberculosis Prevention and Control Program.

Herd	RAS0	RAS1	RAS2	RAS3	RAS4
A	43	38	37	40	37
B	38	13	38	28	24
C	20	9	9	12	6
D	34	34	31	31	24
E	34	16	38	28	29
F	26	10	7	14	13
G	49	19	16	-	28
H	42	25	24	13	13
I	20	29	15	-	-
J	44	23	24	-	19
K	69	23	23	19	14
L	58	24	20	22	15
M	30	9	24	23	-
N	27	32	25	33	-
O	43	37	23	-	-
P	39	20	-	-	-
Q	32	34	-	-	-
R	27	16	-	-	-

The empty cells correspond to delayed entries of farms (farm M and N) or questionnaires that were not completed.

Table 4.5. Incidence density rate and univariable analysis for potential predictors of time to individual fecal excretion of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (events) in 18 positive dairy herds enrolled in the Québec Voluntary Paratuberculosis Prevention and Control Program.

Group	Number of events	Time at risk (cows-year)	Incidence	IR	95% CI	Simple Cox model	
						HR	P-value
Entire population	44	4489.7	0.98	-	-	-	-
Cohort^a							
Before	33	2405.0	1.37	1.0	-	-	-
After	11	2084.7	0.53	0.38	0.17-0.78	0.50	0.044
Breed^a							
Holstein	23	3667.2	0.63	1.0	-	-	-
Other	21	822.5	2.55	4.07	2.14-7.69	4.04	<0.001
Risk assessment score^b							
Low	22	3138.6	0.70	1.0	-	-	-
High	22	1351.1	1.63	2.32	1.23-4.40	2.14	0.012
Calving area							
CA1 ^c							
Low	3	774.4	0.39	1.0	-	-	-
High	41	3715.3	1.10	2.85	0.91-14.38	3.21	0.052
CA2 ^c							
Low	24	3606.1	0.67	1.0	-	-	-
High	20	883.6	2.26	3.40	1.78-6.42	3.80	<0.001
CA3 ^c							
Low	15	2505.8	0.60	1.0	-	-	-
High	29	1983.9	1.46	2.44	1.27-4.90	2.26	0.011
CA4 ^c							
Low	16	3212.7	0.50	1.0	-	-	-
High	28	1277.0	2.19	4.40	2.30-8.71	4.82	<0.001
CA5 ^c							
< 1 hour after calving	15	2590.8	0.58	1.0	-	-	-

> 1 hour after calving	29	1898.9	1.53	2.64	1.37-5.29	2.72	0.002
CA6 ^c							
Commercial or from one 1 st lactation cow	6	312.9	1.92	1.0	-	-	-
≥ 2 nd lactation cow or from 1 MAP suspected cow or pooled	38	4176.8	0.91	0.47	0.20-1.37	0.38	0.031
Pre-weaned heifers (PWH)							
PWH1 ^c							
Milk replacer/pasteurized milk/1 non-suspected cow	17	2595.5	0.65	1.0	-	-	-
From 1 suspected cow/pooled	27	1894.2	1.43	2.18	1.14-4.26	1.90	0.038
PWH2 ^c							
Low	7	1738.8	0.40	1.0	-	-	-
High	37	2750.9	1.35	3.34	1.47-8.88	2.92	0.010
PWH3 ^c							
Low	16	2501.7	0.64	1.0	-	-	-
High	28	1988.0	1.41	2.20	1.15-4.36	2.13	0.016
Weaned heifers (WH)							
WH1 ^c							
Low	26	3187.9	0.82	1.0	-	-	-
High	18	1301.8	1.38	1.69	0.88-3.21	1.70	0.084
WH2 ^c							
Low	38	3793.2	1.0	1.0	-	-	-
High	6	696.5	0.86	0.85	0.29-2.05	0.89	0.792
WH3 ^c							
Low	17	2975.6	0.57	1.0	-	-	-
High	27	1514.1	1.78	3.12	1.64-6.10	3.26	<0.001
Risk associated with cattle introduction^{b,c}							
Low-medium	18	2069.0	0.87	1.0	-	-	-
High	26	2420.7	1.07	1.23	0.65-2.39	1.65	0.226

Incidence: cases per 100 cows-year.

IR: incidence rate ratio (compared to the first category).

CI: 95% Confidence interval of the ratio.

HR: hazard ratio.

^a Variables included in the Cox model to evaluate the effect of the cohort.

^b Variables included in the Cox model to evaluate the effect of the risk score of within-herd transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

^c Variables included in the Cox model to evaluate the effect of calf rearing management practices.

Table 4.6. Incidence density rate at the herd level of individual fecal excretion of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in 18 positive dairy herds enrolled in the Québec Voluntary Paratuberculosis Prevention and Control Program.*

Herd	Number of cows (and time at risk) by cohort during the study		Incidence density rate of fecal excretion by cohort: cases per 100 cows-year (95% CI)	
	Before	After	Before	After
K	41 (108.7)	21 (20.8)	11.0 (6.3-19.4)	19.2 (7.2-51.1)
J	10 (32.6)	50 (76.1)	3.1 (0.4-21.8)	3.9 (1.3-12.2)
F	47 (122.5)	120 (220.3)	2.5 (0.8-7.6)	0
N	64 (125.5)	8 (2.0)	2.4 (0.8-7.4)	0
D	32 (97.0)	44 (95.8)	2.1 (0.5-8.3)	0
G	20 (53.1)	45 (71.7)	1.9 (0.3-13.4)	0
L	152 (330.1)	85 (83.9)	1.8 (0.8-4.1)	0
I	50 (176.7)	41 (53.9)	1.7 (0.6-5.3)	0
A	27 (85.9)	78 (147.8)	1.2 (0.2-8.3)	0
B	91 (264.7)	248 (488.0)	0.38 (0.1-2.7)	0.6 (0.2-1.9)
E	20 (47.8)	54 (99.3)	0	1.0 (0.1-7.2)
C	132 (400.9)	332 (584.1)	0	0
H	30 (94.8)	56 (101.6)	0	0
M	38 (112.7)	17 (18.2)	0	0
O	40 (89.6)	4 (2.5)	0	0
P	51 (115.6)	11 (7.1)	0	0
Q	19 (33.6)	4 (3.5)	0	0
R	55 (113.12)	21 (7.9)	0	0
Total	919 (2405.0)	1239 (2084.7)	1.37 (0.98-1.93)	0.53 (0.29-0.95)

*Data presented include only cows born and raised on the farms. CI: confidence interval.

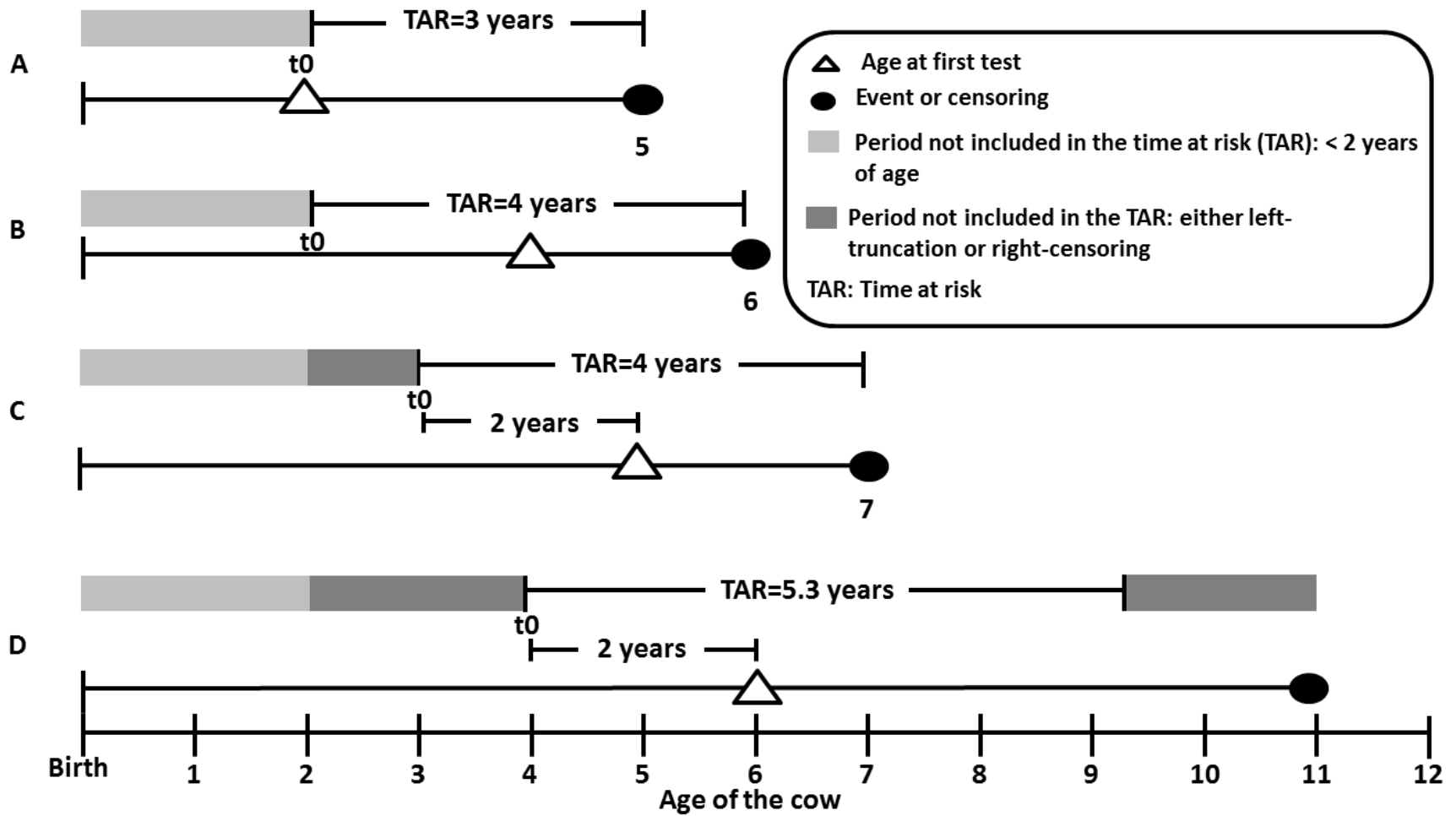
Table 4.7. Final Cox proportional hazards models of the effect of the cohort (model 1), risk assessment score (RAS) (model 2) and calf rearing management practices (model 3) on the time at individual fecal excretion of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in 18 dairy herds enrolled in the Québec Voluntary Paratuberculosis Prevention and Control Program.

Model/Variables	Category	Coefficient	SE	z	HR	95% Confidence Interval		P
						Lower	Upper	
Model 1								
Cohort	Before	Referent	-	-	Referent	-	-	-
	After	-0.74	0.37*	-2.01	0.48	0.23	0.98	0.044
Model 2								
RAS	Low	Referent	-	-	Referent	-	-	-
	High	0.79	0.30	2.60	2.20	1.21	3.99	0.009
Risk associated with cattle introduction	Low-medium	Referent	-	-	Referent	-	-	-
	High	0.27	0.31	0.87	1.31	0.71	2.39	0.384
Model 3								
Risk of exposure of newborn calves to feces of neighbouring cows (CA1)	Low	Referent	-	-	Referent	-	-	-
	High	0.61	0.68	0.89	1.83	0.48	6.98	0.375
Risk of exposure of newborn calves to the feces of sick cows (CA2)	Low	Referent	-	-	Referent	-	-	-
	High	0.40	0.37	1.09	1.50	0.72	3.10	0.275
Risk of exposure of newborn calves to a wet and dirty environment (CA3)	Low	Referent	-	-	Referent	-	-	-
	High	-0.42	0.45	-0.92	0.65	0.27	1.60	0.360
Risk associated with calving cow cleanliness (CA4)	Low	Referent	-	-	Referent	-	-	-
	High	1.23	0.45	2.70	3.41	1.40	8.31	0.007
Risk of contact between pre-weaned calves and	Low	Referent	-	-	Referent	-	-	-

adult cows or their feces (PWH2)	High	0.98	0.46	2.12	2.66	1.08	6.56	0.034
Risk associated with cattle introduction	Low-medium	Referent	-	-	Referent	-	-	-
	High	0.42	0.50	0.84	1.52	0.57	4.02	0.399

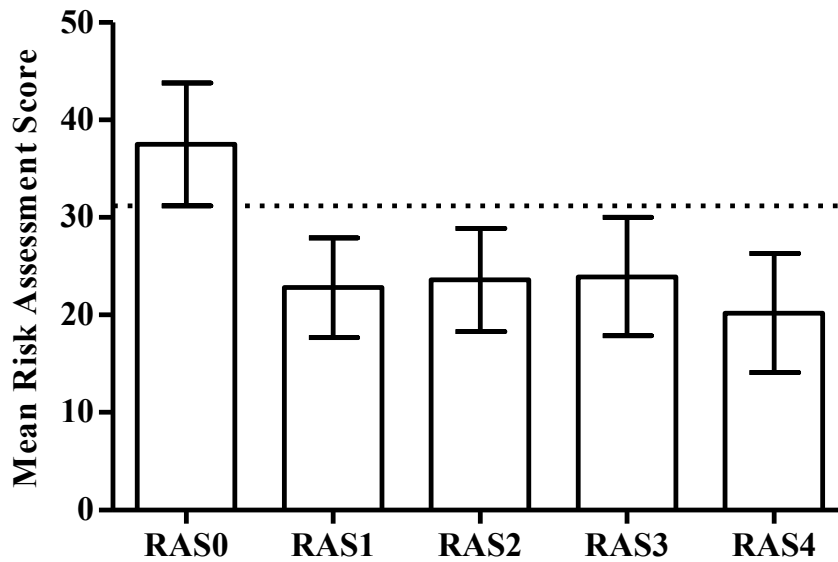
*Standard errors adjusted for 18 clusters in herd.

Figure 4.1. Left-truncation of time at risk (TAR) for 4 different cows.



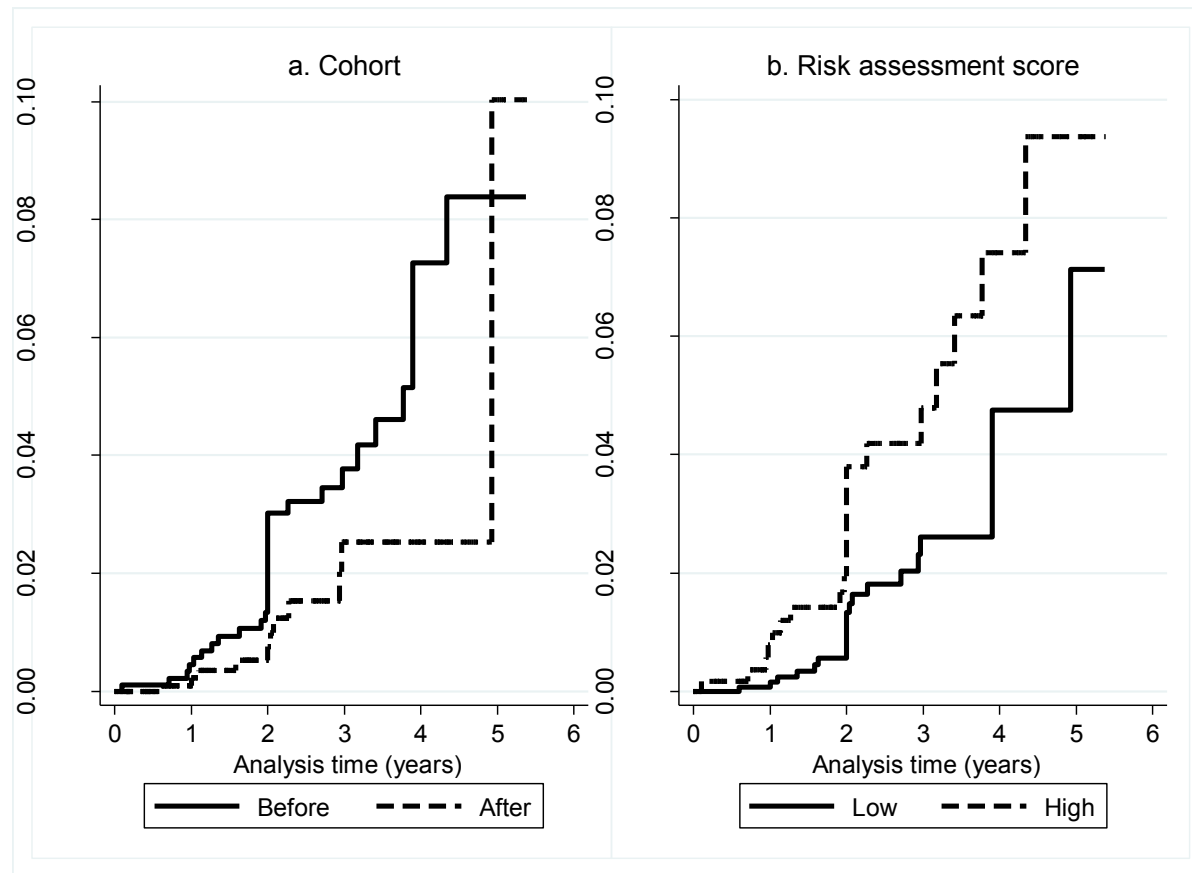
A: Cow which had its first sampling at the age of 2 years and the event or censoring at the age of 5 years. This cow can be either from the cohort-before or after. For this study, the period from birth to 2 years was considered as a period of low risk of individual fecal excretion. The beginning of the time at risk (t_0) for this cow starts at the age of 2 years, thus the TAR would be 3 years: 5 years (Age at the event or censoring) – 2 years (t_0). **B:** Cow which had its first sampling at the age of 4 years and the event or censoring at the age of 6 years. This cow can be either from the cohort-before or after. The t_0 for this cow starts at the age of 2 years, thus the TAR would be 4 years: 6 years (Age at the event or censoring) – 2 years (t_0). **C:** Cow which had its first sampling at the age of 5 years and the event or censoring at the age of 7 years. This cow can be only from the cohort-before as the oldest cow included in the cohort-after was 4 years old at its first sampling. The t_0 for this cow starts at the age of 3 years. The t_0 for the oldest cows from the cohort-before is calculated as follows: the age at first sampling (5 years) minus 2 years. Thus the TAR for this cow would be 4 years: 7 years (Age at the event or censoring) – 3 years (t_0). **D:** Cow which had its first sampling at the age of 6 years and the event or censoring at the age of 11 years. For reasons mentioned above, this cow can also be only from the cohort-before. The t_0 for this cow starts at the age of 4 years. The t_0 is calculated as follows: the age at first sampling (6 years) minus 2 years. Thus the TAR for this cow should be 7 years: 11 years (Age at the event or censoring) – 4 years (t_0); however, as the maximum TAR for the cohort-after is 5.3, this cow's TAR is right censored at that TAR.

Figure 4.2. Evolution of the risk assessment score (RAS) (mean and 95% confidence interval) of within-herd transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in 18 dairy herds enrolled in the Québec Voluntary Paratuberculosis Prevention and Control Program (QVPPCP).



RAS0: RAS from the first questionnaire, completed at enrolment in the QVPPCP. The dash line indicates the lower limit of the 95% confidence interval for the mean RAS0.

Figure 4.3. Kaplan-Meier failure plots for time to individual fecal excretion of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by 2 predictors in 18 dairy herds enrolled in the Québec Voluntary Paratuberculosis Prevention and Control Program.



a) Cohort: before and after. b) Risk assessment score: low and high.

4.6 References

1. Agri-Traçabilité Québec (ATQ), 2015. (2015) <https://www.agri-tracabilite.qc.ca/en/> (Accessed 2017-09-01).
2. Arango-Sabogal, J.C., Côté, G., Paré, J., Labrecque, O., Roy, J.P., Buczinski, S., Doré, E., Fairbrother, J.H., Bissonnette, N., Wellemans, V., Fecteau, G., 2016a. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in tie-stall dairy herds using a standardized environmental sampling technique and targeted pooled samples. *Can. J. Vet. Res.* 80, 175-182.
3. Arango-Sabogal, J.C., Labrecque, O., Pare, J., Fairbrother, J.H., Roy, J.P., Wellemans, V., Fecteau, G., 2016b. Evaluation of a PCR assay on overgrown environmental samples cultured for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, <https://doi.org/10.1177/1040638716662302>.
4. Benedictus, A., Mitchell, R.M., Linde-Widmann, M., 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. *Prev. Vet. Med.* 83, 215-227, <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2007.07.008>.
5. Bolton, M.W., Pillars, R.B., Kaneene, J.B., Mauer, W.A., Grooms, D.L., 2011. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in naturally exposed dairy heifers and associated risk factors. *J. Dairy Sci.* 94, 4669-4675, <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4158>.
6. Canadian Bovine Mastitis Research Network, 2014. Cow Cleanliness Assessment (October 2014) [http://www.medvet.umontreal.ca/rcrmb/dynamiques/PDF_AN/Toolbox/Factsheets/EN_cleanliness\(WEB_oct2014\).pdf](http://www.medvet.umontreal.ca/rcrmb/dynamiques/PDF_AN/Toolbox/Factsheets/EN_cleanliness(WEB_oct2014).pdf) (Accessed May 5th 2017).
7. Çetinkaya, B., Erdogan, H.M., Morgan, K.L., 1997. Relationships between the presence of Johne's disease and farm and management factors in dairy cattle in England. *Prev. Vet. Med.* 32, 253-266, [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-5877\(97\)00028-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-5877(97)00028-7).
8. 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. *J. Dairy Sci.* 93, 1638-1643, <http://doi.org/10.3168/jds.2009-2664>.
9. Dohoo, I.R., Martin, S.W., Stryhn, H., 2009. *Veterinary Epidemiologic Research*. VER, Inc. Charlottetown, P.E.I.
10. Doré, E., Paré, J., Côté, G., Buczinski, S., Labrecque, O., Roy, J.P., Fecteau, G., 2012. Risk factors associated with transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to calves within dairy herd: a systematic review. *J. Vet. Intern. Med.* 26, 32-45, <http://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.00854.x>.
11. Espejo, L.A., Godden, S., Hartmann, W.L., Wells, S.J., 2012. Reduction in incidence of Johne's disease associated with implementation of a disease control program in Minnesota demonstration herds. *J. Dairy Sci.* 95, 4141-4152, <http://doi.org/10.3168/jds.2011-4550>.
12. Ferrouillet, C., Wells, S.J., Hartmann, W.L., Godden, S.M., Carrier, J., 2009. Decrease of Johne's disease prevalence and incidence in six Minnesota, USA, dairy cattle herds on a long-term management program. *Prev. Vet. Med.* 88, 128-137, <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.08.001>.

13. Geraghty, T., Graham, D.A., Mullaney, P., More, S.J., 2014. A review of bovine Johne's disease control activities in 6 endemically infected countries. *Prev. Vet. Med.* 116, 1-11, <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.06.003>.
14. Groenendaal, H., Nielen, M., Jalvingh, A.W., Horst, S.H., Galligan, D.T., Hesselink, J.W., 2002. A simulation of Johne's disease control. *Prev. Vet. Med.* 54, 225-245, [http://doi.org/10.1016/S0167-5877\(02\)00027-2](http://doi.org/10.1016/S0167-5877(02)00027-2).
15. Groupe AGÉCO, 2013. Nombre moyen de vaches laitières par ferme et par province au 1er janvier, Canada (June 27 2013) <http://groupeageco.ca/fsl/> (Accessed May 18th 2016).
16. Harris, B., Robe-Austerman, S., Dykema, P., Fett, K., Stuber, T., Stokes, K., 2009. Laboratory methods for isolation and identification of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (Johne's Disease). USDA National Veterinary Services Laboratories Ames, IA.
17. 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. Ass.* 227, 1302-1308, <http://doi.org/10.2460/javma.2005.227.1302>.
18. Jubb, T.F., Galvin, J.W., 2004. Effect of a test and control program for bovine Johne's disease in Victorian dairy herds 1992 - 2002. *Aust Vet J* 82, 228-232, <http://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2004.tb12685.x>.
19. Kelton, D.F., Barkema, H.W., Bauman, C., Pickel, C., 2016. Regional Differences in Johne's Disease Prevalence Based on Environmental Culture and Bulk Milk Testing. In, 13th International Colloquium on Paratuberculosis, Nantes, France, 114.
20. Kudahl, A.B., Nielsen, S.S., 2009. Effect of paratuberculosis on slaughter weight and slaughter value of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92, 4340-4346, <http://doi.org/10.3168/jds.2009-2039>.
21. Kunzler, R., Torgerson, P., Keller, S., Wittenbrink, M., Stephan, R., Knubben-Schweizer, G., Berchtold, B., Meylan, M., 2014. Observed management practices in relation to the risk of infection with paratuberculosis and to the spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Swiss dairy and beef herds. *BMC Vet Res* 10, 132, <http://doi.org/10.1186/1746-6148-10-132>.
22. Lombard, J.E., 2011. Epidemiology and economics of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 27, 525-535, v, <http://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.07.012>.
23. 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, <http://doi.org/10.2460/javma.2005.227.1975>.
24. Manning, E.J.B., Collins, M.T., 2010. Epidemiology of paratuberculosis. In: Behr, M.A., Collins, D. (Eds.), *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK, 22-28, <http://dx.doi.org/10.1079/9781845936136.0022>.
25. Marce, C., Ezanno, P., Weber, M.F., Seegers, H., Pfeiffer, D.U., Fourichon, C., 2010. Invited review: modeling within-herd transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle: a review. *J. Dairy Sci.* 93, 4455-4470, <http://doi.org/10.3168/jds.2010-3139>.
26. Mitchell, R.M., Whitlock, R.H., Stehman, S.M., Benedictus, A., Chapagain, P.P., Grohn, Y.T., Schukken, Y.H., 2008. Simulation modeling to evaluate the persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) on commercial dairy farms in the

- United States. *Prev. Vet. Med.* 83, 360-380, <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2007.09.006>.
27. Nielsen, S.S., Ersboll, A.K., 2006. Age at occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in naturally infected dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89, 4557-4566, [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72505-X](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72505-X).
 28. Pieper, L., Sorge, U.S., DeVries, T.J., Godkin, A., Lissemore, K., Kelton, D.F., 2015. Evaluation of the Johne's disease risk assessment and management plan on dairy farms in Ontario, Canada. *J. Dairy Sci.* 98, 6792-6800, <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8813>.
 29. Pillars, R.B., Grooms, D.L., Gardiner, J.C., Kaneene, J.B., 2011. Association between risk-assessment scores and individual-cow Johne's disease-test status over time on seven Michigan, USA dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 98, 10-18, <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.10.001>.
 30. Pouillot, R., Dufour, B., Durand, B., 2004. A deterministic and stochastic simulation model for intra-herd paratuberculosis transmission. *Vet. Res.* 35, 53-68, <http://doi.org/10.1051/vetres:2003046>.
 31. Raizman, E.A., Wells, S.J., Godden, S.M., Fetrow, J., Friendshuh, K., Michael Oakes, J., 2006. Characterization of Minnesota dairy herds participating in a Johne's disease control program and evaluation of the program risk assessment tool. *Prev. Vet. Med.* 75, 22-33, <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2006.01.012>.
 32. Rangel, S., Arango-Sabogal, J.C., Labrecque, O., Paré, J., Fairbrother, J.H., Buczinski, S., Roy, J.P., Côté, G., Wellemans, V., Fecteau, G., 2017. Evaluation of a PCR assay on overgrown individual fecal samples cultured for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, <https://doi.org/10.1177/1040638717724837>.
 33. Rangel, S.J., Pare, J., Dore, E., Arango, J.C., Cote, G., Buczinski, S., Labrecque, O., Fairbrother, J.H., Roy, J.P., Wellemans, V., Fecteau, G., 2015. A systematic review of risk factors associated with the introduction of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP) into dairy herds. *Can. Vet. J.* 56, 169-177.
 34. 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, <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.05.001>.
 35. Rossiter, C.A., Burhans, W.S., 1996. Farm-specific approach to paratuberculosis (Johne's disease) control. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12, 383-415, [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30413-8](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30413-8).
 36. Sorge, U.S., Lissemore, K., Godkin, A., Hendrick, S., Wells, S., Kelton, D., 2011a. Associations between paratuberculosis milk ELISA result, milk production, and breed in Canadian dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94, 754-761, <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3404>.
 37. Sorge, U.S., Lissemore, K., Godkin, A., Jansen, J., Hendrick, S., Wells, S., Kelton, D.F., 2011b. Changes in management practices and apparent prevalence on Canadian dairy farms participating in a voluntary risk assessment-based Johne's disease control program. *J. Dairy Sci.* 94, 5227-5237, <http://doi.org/10.3168/jds.2010-3869>.
 38. Sorge, U.S., Lissemore, K., Godkin, A., Jansen, J., Hendrick, S., Wells, S., Kelton, D.F., 2012. Risk factors for herds to test positive for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*-antibodies with a commercial milk enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in Ontario and western Canada. *Can. Vet. J.* 53, 963-970,

39. USDA-APHIS-VS, 2010. Uniform Program Standards for the Voluntary Bovine Johne's Disease Control Program (2010-09-01) https://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_diseases/johnes/downloads/johnes-ups.pdf (Accessed 2017-09-01).
40. 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* ssp. *paratuberculosis*: a systematic review. *Can. J. Public Health.* 99, 145-155,
41. Waddell, L.A., Rajic, A., Stark, K.D., Mc, E.S., 2015. The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: a systematic review and meta-analyses of the evidence. *Epidemiol. Infect.* 143, 3135-3157, <http://dx.doi.org/10.1017/s095026881500076x>.
42. Wells, S.J., Hartmann, W.L., Anderson, P.L., 2008. Evaluation of progress made by dairy and beef herds enrolled in the Minnesota Johne's Disease Control Program. *J Am Vet Med Assoc* 233, 1920-1926, <http://doi.org/10.2460/javma.233.12.1920>.
43. Windsor, P.A., Whittington, R.J., 2010. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Vet. J.* 184, 37-44, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.01.007>.
44. Wolf, R., Barkema, H.W., De Buck, J., Orsel, K., 2015. Factors affecting management changes on farms participating in a Johne's disease control program. *J. Dairy Sci.* 98, 7784-7796, <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9610>.

CHAPITRE 5

**DÉTECTION DE *MYCOBACTERIUM AVIUM* SSP. *PARATUBERCULOSIS*
DANS LES TROUPEAUX LAITIERS EN STABULATION ENTRAVÉE À
L'AIDE DE LA CULTURE BACTÉRIENNE DES PRÉLÈVEMENTS DE
L'ENVIRONNEMENT ET DES ÉCHANTILLONS POOLÉS CIBLÉS**

**DETECTION OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSPECIES
PARATUBERCULOSIS IN TIE-STALL DAIRY HERDS USING A
STANDARDIZED ENVIRONMENTAL SAMPLING TECHNIQUE AND
TARGETED POOLED SAMPLES**

Détails du rôle du candidat: Je suis le premier auteur de l'article. J'ai mis à jour la revue de littérature des articles portant sur la CPE. J'ai nettoyé et validé la base de données. Sous la supervision du groupe de recherche, j'ai fait l'analyse et l'interprétation des données. J'ai rédigé la première version de l'article et j'adressé les commentaires des collaborateurs du groupe de recherche et des réviseurs du journal.

Article publié dans la revue canadienne de recherche vétérinaire en juillet 2016.

Juan C. Arango-Sabogal, Geneviève Côté, Julie Paré, Olivia Labrecque, Jean-Philippe Roy,
Sébastien Buczinski, Elizabeth Doré, Julie H. Fairbrother, Nathalie Bissonnette, Vincent
Wellemans, Gilles Fecteau

Département de sciences cliniques, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal,
Saint-Hyacinthe, Québec J2S 8H5 (Arango-Sabogal, Roy, Buczinski, Doré, Wellemans,
Fecteau); Direction générale des laboratoires d'expertise, Ministère de l'Agriculture, des
Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, Québec G1P 4S8 (Côté); Agence canadienne
d'inspection des aliments, Saint-Hyacinthe, Québec J2S 7C6 (Paré); Laboratoire
d'épidémiologie animale du Québec, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de
l'Alimentation du Québec, Saint-Hyacinthe, Québec J2S 7X9 (Labrecque, Fairbrother); Dairy
and Swine Research and Development Center, Agriculture and Agri-Food Canada, Sherbrooke,
Québec J1M 0C8 (Bissonnette).

Address all correspondence to Gilles Fecteau; telephone: (450) 773-8521 ext 8337; fax: (450)
778-8102; e-mail: gilles.fecteau@umontreal.ca

Received July 23, 2015. Accepted March 24, 2016.

Abstract

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* (MAP) is the etiologic agent of Johne's disease, a chronic contagious enteritis of ruminants that causes major economic losses. Several studies, most involving large free-stall herds, have found environmental sampling to be a suitable method for detecting MAP-infected herds. In Eastern Canada, where small tie-stall herds are predominant, certain conditions and management practices may influence the survival and transmission of MAP and recovery from the disease. Our objective was to estimate the performance of a standardized environmental and targeted pooled sampling technique for the detection of MAP-infected tie-stall dairy herds. Twenty-four farms (19 MAP-infected and 5 non-infected) were enrolled, but only 20 were visited twice in the same year, to collect 7 environmental samples and 2 pooled samples (sick cows and cows with poor body condition). Concurrent individual sampling of all adult cows in the herds was also carried out. Isolation of MAP was achieved using the MGIT Para TB culture media and the BACTEC 960 detection system. Overall, MAP was isolated in 7% of the environmental cultures. The sensitivity of the environmental culture was 44% [95% confidence interval (CI): 20% to 70%] when combining results from 2 different herd visits and 32% (95% CI: 13% to 57%) when results from only 1 random herd visit were used. The best sampling strategy was to combine samples from the manure pit, gutter, sick cows, and cows with poor body condition. The standardized environmental sampling technique and the targeted pooled samples presented in this study is an alternative sampling strategy to costly individual cultures for detecting MAP-infected tie-stall dairies. Repeated samplings may improve the detection of MAP-infected herds.

Résumé

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* (MAP) est l'agent étiologique de la maladie de Johne, une entérite chronique contagieuse des ruminants et responsable d'importantes pertes économiques. Plusieurs études, la plupart réalisées dans des grands troupeaux en stabulation libre, ont démontré que la technique de culture de prélèvements de l'environnement est appropriée pour la détection des troupeaux infectés par MAP. Dans l'est du Canada où prédominent les petits troupeaux en stabulation entravée, certaines conditions et pratiques de régie pourraient avoir un impact sur la survie, la transmission et l'isolement de MAP. Notre objectif était d'estimer la performance d'une technique standardisée de culture de prélèvements de l'environnement combinée à des échantillons groupés ciblés pour la détection des troupeaux laitiers en stabulation entravée infectés par MAP. Vingt-quatre troupeaux (19 infectés et 5 non infectés) ont été enrôlés, mais seulement 20 troupeaux ont été visités 2 fois dans la même année pour y prélever 7 échantillons de l'environnement et 2 échantillons groupés (vaches malades et vaches maigres). Des échantillons individuels de toutes les vaches dans le troupeau ont été également prélevés. L'isolement de MAP a été réalisé en utilisant le milieu de culture MGIT ParaTB et le système de détection BACTEC 960. Globalement, MAP a été isolée dans 7% des cultures de l'environnement. La sensibilité de la technique était de 44% (IC 95%: 20% à 70%) en combinant le résultat des 2 visites et de 32% (IC 95%: 13% à 57%) en utilisant aléatoirement le résultat d'une seule visite. La meilleure stratégie d'échantillonnage était la combinaison des échantillons de la fosse, de l'écurie, du groupe de vaches malades et du groupe de vaches maigres. La technique standardisée de prélèvements de l'environnement combinée aux échantillons groupés ciblés présentée dans cette étude est une alternative économique à la culture individuelle pour détecter des troupeaux laitiers infectés par MAP. La répétition des prélèvements pourrait contribuer à améliorer la détection des troupeaux infectés par MAP.

(Traduit par les auteurs)

5.1 Introduction

Johne's disease is an incurable, chronic, and contagious enteritis of ruminants caused by *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP). The disease causes significant economic losses related to reduced milk production, premature culling, increased replacement costs, and decreased slaughtered carcass weight (1–3). This intracellular bacterium, which invades the immune cells of the gastrointestinal tract, has also been linked to Crohn's disease in humans (4–6). Recent studies have led to increased concern about the zoonotic potential of MAP (7–9). Fecal-oral contamination is the main route of MAP transmission (10) and contact between calves and the feces of adult cows is the most important risk factor (11). Young calves are the most susceptible to MAP infection (12). They are prone to becoming infected by ingesting colostrum or milk from infected animals (13) or contaminated water or food (10). As excretion and clinical signs are observed at an older age (14), shedder cows are the main infectious source of environmental contamination. The ability of MAP to survive in the environment for up to 11 mo contributes to the perpetuation of infection in dairy herds (15,16).

Environmental sampling is one of the testing procedures recommended for control programs to assess MAP status in dairy herds (17). The evidence suggests that environmental sampling is a cost-effective method for determining infection status in previously untested dairy herds (18). The technique is simple, less expensive than individual tests, and does not require handling of individual animals. Some studies have compared the performance of environmental culture (EC) with that of individual fecal culture (IFC) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using individual milk and serum samples for detecting MAP-infected herds (19–22). Other studies have evaluated the correlation between EC and within-herd prevalence (WHP) based on IFC (23–25). In 1 study conducted on California dairy farms, no significant difference was observed among the 3 testing methods (EC, IFC, and ELISA) in terms of the proportions of herds correctly identified as infected (19). Another study found a highly significant relationship between EC and IFC (20). The sensitivity of EC for detecting MAP infection at the herd level has been estimated at between 40% and 81% (21,23,24). Specificity has been estimated to be close to 99% (25).

Environmental sampling has been evaluated mostly in large free-stall dairy herds in the United States (19–21,23) and recently in Western and Atlantic Canada (22,25). Eastern Canada

(the region east of Manitoba) is home to about 50% of Canada's dairy herds, most of which are small tie-stall herds. In the province of Quebec, the average herd size is 57 cows per farm and 92% of the herds are housed in tie-stall barns (26). Because of specific management practices and conditions in this part of the country, this area provides an interesting regional data set for evaluating the environmental sampling technique. Manure management practices in tie-stall barns differ from those in the large free-stall facilities typical in the United States and Western Canada. These characteristics, combined with Eastern Canada's humid continental climate, may influence the survival, transmission, and recovery of MAP in various environmental sampling areas.

The purpose of this study was to estimate the performance of a standardized environmental and targeted pooled sampling technique for identifying MAP-infected tie-stall dairy herds. Secondary objectives were to describe the distribution of MAP in the environment of tie-stall dairy herds in Quebec and to find the best sampling strategy for detecting MAP-infected tie-stall dairy herds.

5.2 Materials and methods

5.2.1 Study design and sample size

A cross-sectional study was designed to evaluate a standardized environmental and targeted pooled sampling method in tie-stall dairy herds. The source and target populations were, respectively, the dairy herds enrolled in the Quebec Voluntary Paratuberculosis Prevention and Control Program (QVPPCP) and Quebec dairies. A convenience sample of 24 tie-stall dairy herds was purposively selected based on historical MAP status. That sample included 19 MAP-infected herds (see case definition in next paragraph) and 5 non-infected herds. Additional inclusion criteria were the owner's willingness to participate, tie-stall configuration, regular veterinary herd health visits, access to electronic records, and no drastic changes in the farm system.

5.2.2 Case definition

A herd was considered infected for the purpose of our analysis if MAP was cultured from at least 1 sample (IFC or EC) during the 24 mo before the study began or during the study period itself. The specificity of the bacteriologic culture was assumed to be 100% (17). A herd was considered negative if it had 2 negative results with EC (sampled in a 12- to 18-mo interval) and no clinical animals (persistent diarrhea and loss of body weight and normal appetite) during the 24 mo before the study began.

5.2.3 Sample collection

Initially, 20 herds were visited in summer 2011 (June 20 to August 23). These herds were visited again in fall 2011 (October 3 to November 24) and 4 additional herds were enrolled, for a total of 24 herds. The samples were analyzed at the Laboratoire d'épidémiologie animale du Québec in Saint-Hyacinthe, Quebec. Upon reception and within 24 h of collection, the fecal samples were stored at -80°C until they were analyzed.

5.2.3.1 Environmental samples - A set of 7 environmental samples and 2 pooled samples was collected from sick cows and cows with poor body condition by 2 members of the research group during each herd visit using a standardized technique (Table 5.1). The sampling area was documented with photographs and videos in order to standardize the procedure throughout the study and record the precise sampling sites for each farm.

The 7 environmental samples came from 4 sites on each farm: 3 locations (gutter, manure pit, and heifers' area) were sampled twice and the 4th location (the boots of the farm owner or the sampler) was sampled once. A composite sample of about 20 g of manure from each site was made for the 4 locations.

Additionally, 2 pooled samples were collected from 3 to 5 cows purposively chosen from 2 categories: sick cows and cows with body condition scores (BCSs) lower than 3. For the sick cow group, the owner selected cows that were affected by any disease, but had never been diagnosed as positive for paratuberculosis. For the group with poor body condition, the sampler chose cows with a BCS lower than 3 (using a scale of 1 to 5). An individual fecal sample of about 20 g was taken from the rectum of each selected cow, using a single-use veterinary glove without lubricant. At the farm, equivalent amounts of feces were gathered from each individual sample into their respective pools and homogenized as described previously (27). Briefly, the feces were mixed with a wooden tongue depressor by means of 10 vertical stirs from the bottom to the top, followed by 10 clockwise stirs, and 10 counter-clockwise stirs. Duplicates from each pool were stored in 2 plastic containers for transport to the laboratory.

5.2.3.2 Individual fecal and blood samples - From each herd, all cows older than 24 mo that had calved at least once were tested during each visit. An individual fecal sample of about 20 g was taken using a single-use veterinary glove without lubricant. Also, a single blood sample per cow was collected from the coccygeal vein in an 8-mL Vacutainer Tube without anticoagulant (Becton, Dickinson, Mississauga, Ontario). Blood samples were centrifuged and aliquots of serum were stored at -20°C until ELISA analysis.

5.2.4 MAP culture

Environmental and individual fecal samples were processed following the manufacturer's recommendations (Becton, Dickinson, Sparks, Maryland, USA) and the US Department of Agriculture (USDA) (28). The MAP was isolated using the MGIT Para TB culture media and the BACTEC 960 detection system (Becton, Dickinson) at the Laboratoire d'épidémiologie animale du Québec in Saint-Hyacinthe, Quebec, which is a USDA-certified laboratory.

An initial 3-day decontamination was carried out on the samples. Initially, 2 ± 0.2 g of feces was diluted into 17.5 mL of sterile distilled water and allowed to settle at room temperature for 30 min. Then 2.5 mL of the supernatant was transferred aseptically to a 50-mL tube with 2.5 mL of 15% yeast extract and 0.2 mL of 10% sodium pyruvate. This solution was mixed briefly and incubated for 90 min at $36 \pm 1^\circ\text{C}$. For each fecal sample preparation, 0.3 mL of sterile 5% malachite green solution was added to a solution of 25 mL of sterile half-strength brain heart infusion (BHI) medium and 0.9% hexadecylpyridinium chloride (HPC). Finally, all 5.2 mL of the feces-germination mix was added to the BHI-HPC solution to complete a 30 mL decontamination suspension, which was vortexed briefly and incubated overnight (18 to 24 h) at $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

The next day, this decontaminated suspension was centrifuged for 30 min at $900 \times g$. The supernatant was gently poured off. Then, 1 mL of an antibiotic brew (vancomycin at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, nalidixic acid at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and potency-adjusted amphotericin B at 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added to the pellet. The suspension was incubated overnight (18 to 24 h) at $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Also, 1.5 mL of an additive cocktail was added to each MGIT Para TB culture tube (Becton, Dickinson). The additive cocktail contained Para TB supplement (bovine albumin, catalase, casein, oleic acid; Becton, Dickinson), egg yolk enrichment, sterile water, and antimicrobials (2.5% vancomycin, 2.5% nalidixic acid, and 1% amphotericin B). These tubes were stored in a safety cabinet at room temperature for 18 to 24 h.

On the third day of the fecal sample processing, the concentrated specimen suspension was mixed by swirling and 0.1 mL was inoculated into the MGIT Para TB culture tubes before they were introduced into the BACTEC 960 detection device for incubation at 37°C for a maximum of 56 d. The additive cocktail used for the environmental samples processed in 2011 included a higher concentration of nalidixic acid (10 times more). From January 2012 onward, a

single additive cocktail, which included an additional 1% ceftriaxone, was used for processing all the samples, both individual and environmental.

The tubes that gave a positive signal before 42 d were always put back in the device for further incubation. The tubes flagged as positive between 42 to 56 d of incubation were incubated for an additional 72 h at $36 \pm 1^\circ\text{C}$ and an acid-fast bacilli stain was done using the TB Fluorescent Stain Kit M (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario). Positive samples were confirmed by real-time polymerase chain reaction (PCR) [*TaqMan* MAP (Johne's) Reagents; Applied Biosystems, Foster City, California, USA]. The results of previous tests were interpreted according to USDA recommendations (28). Samples were identified as MAP-positive if they were flagged in the system and confirmed by both the acid-fast bacilli stain and the real-time PCR.

5.2.5 ELISA

Sera were processed using the IDEXX Pourquier MAP antibody test kit (IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, USA) according to the manufacturer's instructions. Optical density (OD) values were transformed into sample-to-positive (S/P) ratios as described previously (29). Samples with an S/P ratio of 55% or greater were considered positive. As suggested previously (30), a herd was declared ELISA-positive if the serum within-herd prevalence (WHP) was 2% or greater, given that the specificity of ELISA relative to fecal culture has been estimated at 98% to 99% (31–33).

5.2.6 Statistical analysis

Statistical analyses were carried out with the SAS software (Version 9.3; SAS Institute, Cary, North Carolina, USA). Descriptive statistics for the individual and environmental samples were conducted to characterize the distribution of positive results. The Wilcoxon rank test was used to compare the WHP by ELISA and IFC and the number of positive ECs between the 2 visits. The percentage and confidence interval of infected herds detected by the tests used in the study were calculated for a single visit and for 2 visits to assess the impact of repetitive samplings. For the herds visited twice, 1 sampling was randomly chosen for the assessment of a

single visit. The association between the number of positive ECs and fecal WHP was evaluated with the Chi-square test. This test was also used to compare the number of infected herds confirmed by each diagnostic test. All results were considered significant if $P < 0.05$.

5.3 Results

5.3.1 Herd characteristics

The 24 herds were located in 4 regions of Quebec, Canada (Bas-Saint-Laurent, Capitale-Nationale, Montérégie, and Centre-du-Québec). Median herd size in summer was 62 lactating cows (25th percentile=42; 95th percentile=74), ranging from 35 to 210 cows while median herd size in fall was 56 lactating cows (25th percentile=46; 95th percentile=73), ranging from 30 to 211 cows. In 16 herds, the cows were exclusively Holstein, in 1 herd the cows were exclusively Jersey, and in 7 herds, more than 1 breed was also present (Holstein and Jersey in 6 herds and Holstein and Brown Swiss in 1 herd). The mean age of the cows sampled at the beginning of the study was 4.5 y (2 to 14 y). For the infected herds, the apparent WHP ranged from 0% to 28% for IFC and from 0% to 31% for ELISA. For the non-infected herds, the apparent WHP was 0% for the IFC and varied from 0% to 1.4% for ELISA. The number of positive EC samples per herd ranged from 0 to 7. The proportion of culled animals during the study for the herds that were sampled twice was 13% on average (2% to 27%).

When combining sampling results from both seasons, out of the 24 enrolled herds, 17 MAP-infected herds (according to the initial MAP status) were found positive by at least 1 of the detection methods used (Figure 1). According to the initial MAP status, 5 MAP-infected herds were found positive by all 3 tests. Although 7 herds were found positive only by ELISA, 1 of these herds was presumed to be non-infected based on our case definition.

Among the MAP-infected herds according to the initial MAP status ($n = 19$), 17 were detected as positive during the study by at least 1 of the detection methods used (Table 5.2). Overall, the number of infected herds confirmed during either visit was 8 out of 19 for EC, 9 out of 19 for IFC, and 16 out of 19 for ELISA. More infected herds were confirmed by ELISA than by the other tests ($P = 0.01$). The different combinations of test results for a single visit or for both visits of MAP-infected herds are presented in Table 5.3. When the results from 2 different visits were combined, the percentage of infected herds detected by environmental sampling was 44% (95% CI: 20% to 70%) and 32% (95% CI: 13% to 57%) when the results of only 1 random herd visit were considered, although the difference between 1 and 2 herd visits was not significant ($P = 0.5$). Among infected herds, more herds were found positive at both samplings based on individual tests (IFC and ELISA) compared to EC (Table 5.3). At the individual level,

14 cows were IFC-positive at both samplings. Six cows that were IFC-negative in the summer were found to be IFC-positive in the fall.

5.3.2 Individual samples

A total of 3100 samples was tested from 1844 adult cows sampled [summer only ($n = 172$), fall only ($n = 416$), and both seasons ($n = 1256$)]. The MAP pathogen was cultured from 21 IFC samples in the summer (1.5%; 95% CI: 0.9% to 2.2%) and from 24 IFC samples in the fall (1.4%; 95% CI: 0.9% to 2.1%). In total, 35 cows (2.5%; 95% CI: 1.7% to 3.4%) were seropositive in the summer and 49 in the fall (2.9%; 95% CI: 2.2% to 3.9%) (Table 5.2). The proportion of positive samples per visit was not significantly different for IFC ($P = 0.8$) or ELISA ($P = 0.4$).

5.3.3 Environmental samples

Overall, MAP was recovered from 29 out of 392 environmental cultures (ECs) carried out during the study (7%; 95% CI: 5% to 11%) from 8 positive farms. In the summer, MAP was cultured from 12 out of 177 ECs (7%; 95% CI: 4% to 12%) from 5 infected herds. In the fall, 17 out of 215 ECs were positive (8%; 95% CI: 5% to 12%) from 5 infected herds. We did not observe a difference between the percentages of positive environmental samples per sampling period ($P = 0.8$).

5.3.3.1 Environmental sites - The MAP pathogen was isolated from 14% of the boot samples, 11% of the sick cow group samples, 9% of the manure pit samples, 8% of the gutter samples, 5% of the samples from the group with low BCSs, and 1% of the samples from the heifers' area. The manure pit, the gutter, and the sick cow group were found to have 4 MAP-infected herds each. For the gutter alone, 3 MAP-infected herds were detected (Table 5.4). If only 2 sites were sampled, the best sampling option was to combine the samples from the manure pit with either the samples from the sick cow group or the boots because 6 MAP-infected herds were detected with each combination. In order to detect all the herds found positive by EC during the study, a combination of a minimum of 4 sites was required (the manure pit, the sick cows, the cows with

low BCSs, and either the gutter or the boots). When MAP was cultured from the boots, there was at least another positive environmental sample on the farm.

5.3.3.2 Consecutive negative EC results - Among herds that tested negative by EC at both samplings, the odds of not detecting a cow shedding MAP tended to be greater [odds ratio (OR) = 5.4; 95% CI: 0.9 to 38.2; $P = 0.06$] compared to herds found positive by EC in at least 1 of 2 samplings.

5.4 Discussion

When the results of 2 visits were combined, the sensitivity of the standardized environmental and targeted pooled sampling technique proposed in this paper was within the range of the values reported in the literature (23–25). Recently, 2 Canadian studies reported a higher sensitivity of environmental sampling (68% to 71%) when it was conducted quarterly (22,25). It is expected that repeated samplings may increase the capacity of the environmental sampling technique to detect infected herds. On the other hand, herds with 2 consecutive negative EC results were more likely to have no cows shedding MAP. Even if a negative EC result does not guarantee that the farm is not infected, that result may indicate a negative or a low-prevalence herd (17). Repeated negative samplings may increase confidence that the farm has a very low prevalence or is MAP-negative.

One study did not find positive ECs when within-herd prevalence (WHP) was 2% or less (34). In the present study, positive ECs were observed in herds without positive IFCs, as previously reported (21,25). Intermittent fecal shedding may explain the absence of concurrent positive IFCs in the infected herds that tested positive by EC (35). Another hypothesis is that shedder cows had been culled before the herd visit and MAP remained in the environment of the farm. One study suggested that EC may be a measure of the persistency of MAP on farms even if no individual cows are positive by concurrent IFC, indicating that some environmental contamination remains despite the reduction in prevalence (34). Because of the bacterium's ability to survive in the environment for up to 11 mo under optimal conditions, EC has the potential to detect MAP in herds even after infected animals have been culled or in the presence of intermittent shedding. This is a strong advantage of any technique used at any particular point in time.

Overall, no statistically significant difference was observed between the proportion of infected herds identified by EC, IFC, or ELISA. The absence of a statistically significant difference, however, could be a consequence of the low power of the study. In the present study, ELISA misclassified 1 non-infected herd as positive, according to our case definition. This herd may actually be an infected herd that our case definition failed to classify or a non-infected herd that ELISA misclassified due to a lack of specificity.

The choice of detection method depends on the objectives established by the owners or veterinarians. The environmental culture (EC) is the most cost-effective option to determine MAP-herd status (17,18). In the context of the QVPPCP, where the main objective is to detect high-prevalence herds (those herds with the most important economic losses), EC is the most appropriate sampling alternative. Screening a whole herd with individual tests (IFC or ELISA) is more invasive, expensive, and time-consuming than EC. Individual tests are more suitable for identifying infected animals within a MAP-infected herd. At the herd level, our study indicates that all tests (EC, IFC, and ELISA) give different results at different points of time. The demographic changes in the herds could explain such variability.

In the present study, MAP was cultured from the manure pit and the gutter, which is where manure accumulates in tie-stall farms. These locations are traditionally chosen as sampling sites because they have been proven to have a high sensitivity for detecting MAP-infected free-stall herds (19–21,36). The MAP pathogen was also cultured from samples collected from boots, the sick cow group, cows with low BCS, and the heifers' area. While boot sampling was previously found to be a sensitive technique for detecting high-prevalence herds (37), it needs to be evaluated in low-prevalence herds as these authors suggest. Another study suggested including boots as an additional sample in the environmental sampling strategy (38). Although boot sampling (either from the owner or a researcher) is interesting, it is both recommended and expected that owners disinfect and/or change boots as they move from one area on the farm to another. This would be particularly important when different age groups are visited. As for researchers, the same rule should apply so they cannot become a potential risk of dissemination of a pathogen within a herd.

Sampling cows with low BCS was previously suggested for screening beef cattle herds for MAP (17). The pools proposed in our study may be collected by the veterinarian during a herd health visit with minimal additional animal handling. In contrast, a sample from the heifers' area does not seem to increase the sensitivity of the technique, as MAP was cultured from only 1 sample throughout the study. This finding demonstrates that young animals may be exposed to and shed MAP, however, as suggested in a previous study (39). This positive sample was collected from the herd with the highest prevalence (fecal WHP, ELISA WHP, and EC prevalence). Our study suggests that a combination of samples from the manure pit or the gutter,

the sick cows, and/or the cows with low BCS may be an effective strategy to detect MAP-infected tie-stall dairy herds.

It has been suggested that the sensitivity of environmental sampling is expected to be higher in high-prevalence herds (14). Another study found that sensitivity may be close to 100% even in moderate-prevalence herds (when the WHP is 8% or greater) (5). Some factors may have affected the sensitivity of the environmental sampling technique in our study. The low-prevalence herds included were purposively selected from the QVPPCP list because of the owner's willingness to participate in research projects. It can be assumed that these producers are more aware of bovine paratuberculosis than producers who did not participate in the program. The exposure of QVPPCP herds to several years of veterinarian recommendations in order to control MAP infections may have contributed to the lower MAP prevalence. Additionally, in our study several herds that were initially considered to be infected turned out to be either negative or very low-prevalence herds. Possible reasons for this inconsistency may have been the culling of cows (either for paratuberculosis or other reasons) or the delay between the positive diagnosis classifying the herd as infected and the beginning of the study. If at the time of the positive test, the herd had low prevalence and biosecurity measures had been introduced to reduce transmission (as is supposed to be done for herds enrolled in the QVPPCP), it is very likely that the WHP decreased or at least remained at the same level. Although the sensitivity of EC tended to increase when 2 samplings were considered instead of 1, our sample size did not allow us to observe a significant difference.

In conclusion, the proposed standardized environmental and targeted pooled sampling technique was a useful diagnostic method for detecting the MAP-infected tie-stall dairy herds in this study. This inexpensive and non-invasive method detected mainly high-prevalence herds, but it did detect low-prevalence herds as well. Repeated samplings may increase sensitivity for detecting low-prevalence herds and confidence in a negative result. Our sampling strategy proposes that new sample types, compared to current methods, be included to improve MAP detection.

Acknowledgments

The authors thank the producers for participating in this study and the veterinarians for helping with the recruitment process. This project was funded by Novalait Inc.; Agriculture and

Agri-Food Canada; Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec;
and Fonds de recherche du Québec-nature et technologies.

5.5 References

1. Kudahl AB, Nielsen SS. Effect of paratuberculosis on slaughter weight and slaughter value of dairy cows. *J Dairy Sci* 2009;92:4340–4346.
2. Hendrick SH, Kelton DF, Leslie KE, Lissemore KD, Archambault M, Duffield TF. Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. *J Am Vet Med Ass* 2005;227:1302–1308.
3. Lombard JE, Garry FB, McCluskey BJ, Wagner BA. Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* 2005;227:1975–1981.
4. Hermon-Taylor J. Protagonist. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* is a cause of Crohn's disease. *Gut* 2001;49:755–756.
5. Scanu AM, Bull TJ, Cannas S, et al. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cases of irritable bowel syndrome and comparison with Crohn's disease and Johne's disease: Common neural and immune pathogenicities. *J Clin Microbiol* 2007;45:3883–3890.
6. Waddell LA, Rajic A, Sargeant J, et al. The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: A systematic review. *Can J Public Health* 2008;99:145–155.
7. Momotani E, Ozaki H, Hori M, et al. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* lipophilic antigen causes Crohn's disease-type necrotizing colitis in mice. *Springerplus* 2012;1:47.
8. Momotani E, Romona NM, Yoshihara K, et al. Molecular pathogenesis of bovine paratuberculosis and human inflammatory bowel diseases. *Vet Immunol Immunopathol* 2012;148:55–68.
9. Naser SA, Sagrainsingh SR, Naser AS, Thanigachalam S. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* causes Crohn's disease in some inflammatory bowel disease patients. *World J Gastroenterol* 2014;20:7403–7415.
10. Manning EJB, Collins MT. Epidemiology of paratuberculosis. In: Behr MA, Collins DM, eds. *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. Wallingford: CAB International, 2010:22–28.

11. Doré E, Paré J, Côté G, et al. Risk factors associated with transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to calves within dairy herd: A systematic review. *J Vet Intern Med* 2012;26:32–45.
12. Windsor PA, Whittington RJ. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Vet J* 2010;184:37–44.
13. Streeter RN, Hoffsis GF, Bech-Nielsen S, Shulaw WP, Rings DM. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am J Vet Res* 1995;56:1322–1324.
14. Nielsen SS, Ersboll AK. Age at occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in naturally infected dairy cows. *J Dairy Sci* 2006;89:4557–4566.
15. Eisenberg SW, Nielen M, Santema W, Houwers DJ, Heederik D, Koets AP. Detection of spatial and temporal spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment of a cattle farm through bio-aerosols. *Vet Microbiol* 2010;143:284–292.
16. Whittington RJ, Marshall DJ, Nicholls PJ, Marsh IB, Reddacliff LA. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:2989–3004.
17. Collins MT, Gardner IA, Garry FB, Roussel AJ, Wells SJ. 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.
18. Sweeney RW, Collins MT, Koets AP, McGuirk SM, Roussel AJ. Paratuberculosis (Johne's disease) in cattle and other susceptible species. *J Vet Intern Med* 2012;26:1239–1250.
19. Berghaus RD, Farver TB, Anderson RJ, Jaravata CC, Gardner IA. Environmental sampling for detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* on large California dairies. *J Dairy Sci* 2006;89:963–970.
20. Raizman EA, Wells SJ, Godden SM, et al. The distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in the environment surrounding Minnesota dairy farms. *J Dairy Sci* 2004;87:2959–2966.

21. Lombard JE, Wagner BA, Smith RL, et al. Evaluation of environmental sampling and culture to determine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* distribution and herd infection status on US dairy operations. *J Dairy Sci* 2006;89:4163–4171.
22. Wolf R, Barkema HW, De Buck J, et al. High herd-level prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Western Canadian dairy farms, based on environmental sampling. *J Dairy Sci* 2014;97:6250–6259.
23. Pillars RB, Grooms DL, Woltanski JA, Blair E. Prevalence of Michigan dairy herds infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as determined by environmental sampling. *Prev Vet Med* 2009;89:191–196.
24. Smith RL, Schukken YH, Pradhan AK, et al. Environmental contamination with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in endemically infected dairy herds. *Prev Vet Med* 2011;102:1–9.
25. Lavers CJ, McKenna SL, Dohoo IR, Barkema HW, Keefe GP. Evaluation of environmental fecal culture for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* detection in dairy herds and association with apparent within-herd prevalence. *Can Vet J* 2013;54:1053–1060.
26. Nombre moyen de vaches laitières par ferme et par province au 1er janvier, Canada. Groupe AGÉCO. Canada [updated 2013 June 27]. Available from: <http://groupeageco.ca/fr/pdf/stat/PCL3.pdf>. Last accessed May 18, 2016.
27. Aly SS, Anderson RJ, Whitlock RH, et al. Reliability of environmental sampling to quantify *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* on California free-stall dairies. *J Dairy Sci* 2009;92:3634–3642.
28. Harris B, Robbe-Austerman S, Dykema P, Fett K, Stuber T, Stokes K. Laboratory methods for isolation and identification of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (Johne's Disease). Ames: USDA National Veterinary Services Laboratories, 2009.
29. Collins MT. Interpretation of a commercial bovine paratuberculosis enzyme-linked immunosorbent assay by using likelihood ratios. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:1367–1371.
30. Lombard JE, Byrem TM, Wagner BA, McCluskey BJ. Comparison of milk and serum enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in dairy cattle. *J Vet Diagn Invest* 2006;18:448–458.

31. Collins MT, Sockett DC, Ridge S, Cox JC. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for Johne's disease. *J Clin Microbiol* 1991;29:272–276.
32. Collins MT, Wells SJ, Petrini KR, Collins JE, Schultz RD, Whitlock RH. Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12:685–692.
33. Sweeney RW, Whitlock RH, Buckley CL, Spencer PA. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *J Vet Diagn Invest* 1995;7:488–493.
34. Pillars RB, Grooms DL, Kaneene JB. 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 J* 2009;50:1039–1046.
35. Nielsen SS. Transitions in diagnostic tests used for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections in cattle. *Vet Microbiol* 2008;132:274–282.
36. Wolf R, Barkema HW, De Buck J, Orsel K. Sampling location, herd size, and season influence *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* environmental culture results. *J Dairy Sci* 2015;98:275–287.
37. Eisenberg T, Wolter W, Lenz M, Schlez K, Zschock M. Boot swabs to collect environmental samples from common locations in dairy herds for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) detection. *J Dairy Res* 2013;80:485–489.
38. Donat K, Hahn N, Eisenberg T, et al. Within-herd prevalence thresholds for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*-positive dairy herds using boot swabs and liquid manure samples. *Epidemiol Infect* 2016;144:413–424.
39. Wolf R, Orsel K, De Buck J, Barkema HW. Calves shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* are common on infected dairy farms. *Vet Res* 2015;46:71.

Figure 5.1. Of 24 herds, identification of those herds positive for MAP at either sampling using 3 detection methods.

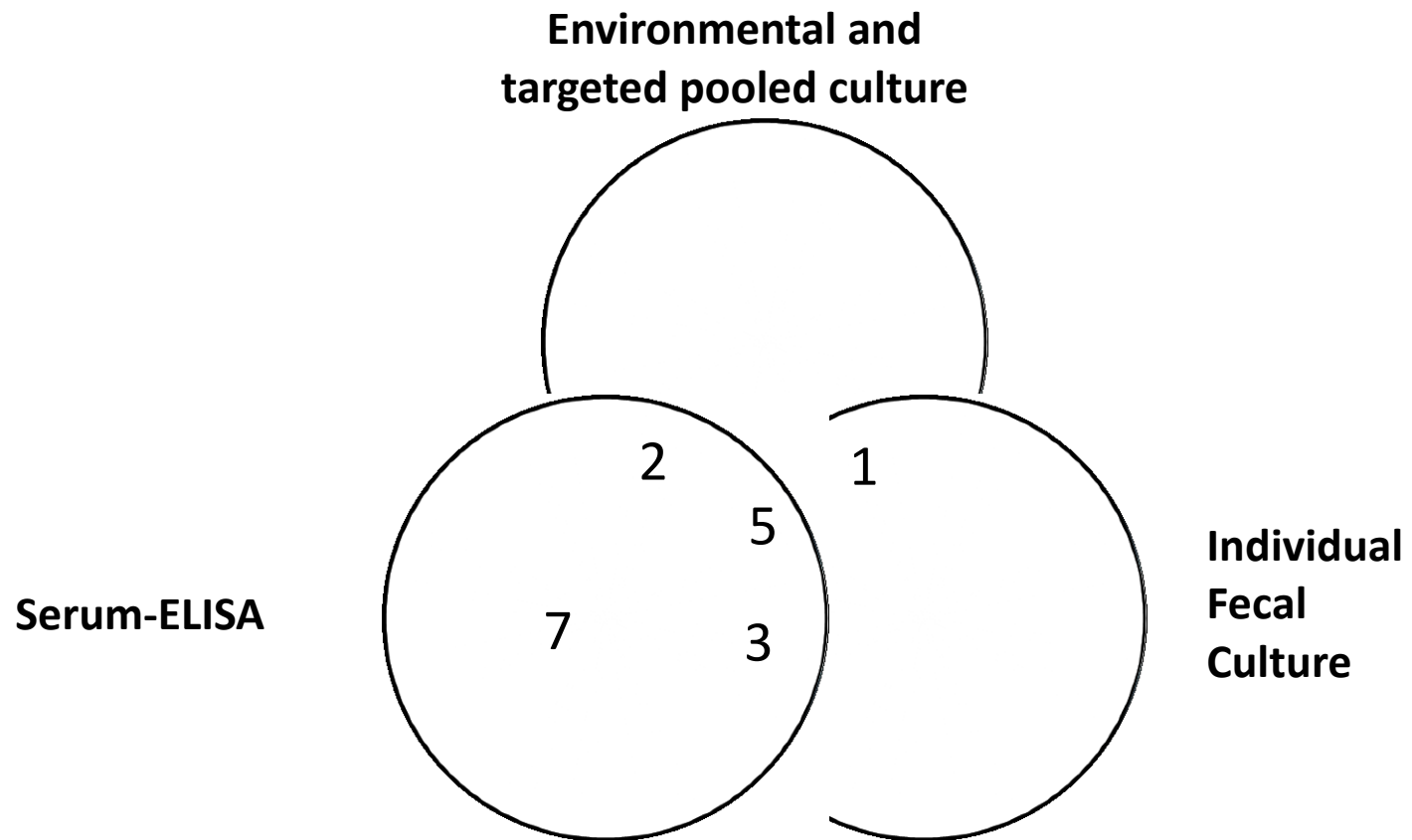


Table 5.1. Environmental and targeted pooled samples for identifying tie-stall dairy herds infected with MAP

Environment al and targeted pooled samples	Description	Number of samples per visit
Manure pit	Samples taken more than 10 cm deep	2
Gutter	At the end of the barn but before the manure pit	2
Heifers' pen	Composite samples from 4 different surfaces at the site	2
Boots	Samples scraped from the soles of boots at the end of each visit but before going to the manure pit	1
Sick cows	Pool of 3 to 5 cows affected by any disease but never having tested positive for paratuberculosis	1
Cows with poor body condition	Pool of 3 to 5 cows with a body condition score lower than 3 on a scale of 1 to 5	1
Total		9

Table 5.2. Herd characteristics and WHP of MAP (estimated using IFC or serum ELISA) and number of positive environmental and targeted pooled cultures for 2 sampling seasons in 24 tie-stall dairy herds in Quebec

Status ^a	Summer				Fall				Number of animals sampled twice
	Herd size ^b	WHP ^c (%)		Number of positive EC-TPS ^f	Herd size ^b	WHP ^c (%)		Number of positive EC-TPS ^f	
		IFC ^d	ELISA ^e			IFC ^d	ELISA ^e		
+	179	1.1	0.6	2	178	0.6	1.7	0	165
+	38	0	0	1	45	0	2.2	0	37
+	52	3.6	3.8	2	55	3.6	3.6	6	44
+	35	28.6	31.4	6 ^f	45	20.0	17.8	7	29
+	97	0	1.0	1	100	2.0	3.0	0	94
+	76	3.9	3.9	0	79	3.8	6.3	2	67
+	52	0	0	0	52	0	3.8	1	38
+	NS ^g	NS ^g	NS ^g	NS ^g	72	5.6	2.8	1	-
+	45	0	0	0	48	2.1	2.1	0	36
+	60	3.3	3.3	0	57	0	1.7	0	53
+	210	0	1.4	0	211	0	4.2	0	190
+	64	0	3.1	0	55	0	0	0	44
+	41	0	9.8	0	43	0	9.3	0	36
+	63	0	3.2	0	62	0	1.6	0	54
+	39	0	2.6	0	39	0	0	0	31
+	NS ^g	NS ^g	NS ^g	NS ^g	30	0	3.3	0	-
+	42	0	0	0	46	0	0	0	41
+	NS ^g	NS ^g	NS ^g	NS ^g	46	0	0	0	-
+	42	4.8	4.8	0	44	4.5	2.3	0	39
-	90	0	0	0 ^f	92	0	0	0 ^e	87
-	71	0	1.4	0	73	0	1.3	0	60
-	NS ^g	NS ^g	NS ^g	NS ^g	72	0	1.4	0	-
-	69	0	0	0	65	0	1.5	0	58
-	63	0	0	0	63	0	3.2	0	53

^a Status: (+) Infected (-) Not infected.

^b Herd size: all the adult cows (≥ 24 months and at least 1 parity) of the herd.

^c Within herd prevalence.

^d Individual fecal culture.

^e Herds were considered positive if ELISA WHP was $\geq 2\%$.

^f Environmental and targeted pooled cultures; 7 environmental and 2 targeted pooled samples (TPS) were taken during all herd visits except 3.

^g Not sampled.

Table 5.3. Combinations of test results for either a single visit or 2 visits to detect MAP in tie-stall dairy herds in Quebec

Number of samplings	Sampling option (Number of infected herds ^a)	Number of positive herds ^b			Sensitivity (CI)		
		EC-TPS	IFC	ELISA	EC-TPS	IFC	ELISA
Single sampling	Summer (16)	5	6	9	31 (11 to 59)	38 (15 to 65)	56 (30 to 80)
	Fall (19)	5	8	12	26 (9 to 51)	42 (20 to 67)	63 (38 to 84)
	One random sampling ^c (19)	6	7	9	32 (13 to 57)	37 (16 to 62)	47 (24 to 71)
Two samplings ^d	Summer or fall ^e (16)	7	8	14	44 (20 to 70)	50 (25 to 75)	88 (62 to 98)
	Summer and fall ^f (16)	2	5	5	13 (2 to 38)	31 (11 to 59)	31 (11 to 59)

^a Infected herd: MAP was cultured from at least 1 sample (IFC or EC) during the 30 mo before the end of the study period.

^b Herds were considered positive through environmental culture and targeted pooled sampling (EC-TPS) strategy and individual fecal culture (IFC) if at least 1 positive sample was obtained. For ELISA, herds were considered positive if within-herd prevalence (WHP) was $\geq 2\%$.

^c Nineteen infected herds had available results in at least 1 sampling season. From the herds visited twice, 1 sampling was randomly chosen.

^d Sixteen infected herds had available test results for both seasons.

^e Herds meeting the criteria for a positive herd according to each diagnostic test, either in summer or fall.

^f Herds meeting the criteria for a positive herd according to each diagnostic test, in both summer and fall.

Table 5.4. Distribution of MAP-positive sites on 8 farms tested by environmental and targeted pooled sampling

EC-TPS positive herds ^a	Number of positive samples by site ^b						Summer			Fall		
							Number. of positive EC-TPS ^a	Within-herd prevalence		Number of positive EC-TPS ^a	Within-herd prevalence	
	MP	G	H	B	S	P		IFC ^c	ELISA		IFC ^c	ELISA
A	0	1	0	1	0	0	2	1.1	0.6	0	0.6	1.7
B	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2.2
C ^d	2	2	0	2	2	0	2	3.6	3.8	6	3.6	3.6
D ^d	4	4	1	2	1	1	6	28.6	31.4	7	20.0	17.8
E	0	0	0	0	0	1	1	0	1.0	0	2.0	3.0
F	0	0	0	1	1	0	0	3.9	3.9	2	3.9	6.3
G	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3.8
H	0	0	0	0	1	0	NS ^e	NS ^e	NS ^e	1	5.6	2.8
No. of herds detected by site	4	3	1	4	4	2						

^a Positive herds by environmental culture and targeted pooled sampling (EC-TPS) strategy in either summer or fall.

^b MP—Manure pit; G—gutter; H—heifers’ area; B—boots; S—sick cows group; P—group of cows with poor body condition.

^c IFC—Individual fecal culture.

^d Positive farms both in summer and fall.

^e NS—Not sampled.

CHAPITRE 6

ÉVALUATION DE LA PCR SUR DES ÉCHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX NON INTERPRÉTABLES CULTIVÉS POUR *MYCOBACTERIUM AVIUM* SSP. *PARATUBERCULOSIS*

EVALUATION OF A PCR ASSAY ON OVERGROWN ENVIRONMENTAL SAMPLES CULTURED FOR *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSP. *PARATUBERCULOSIS*

Détails du rôle du candidat: Je suis le premier auteur de l'article. Avec le groupe de recherche, j'ai conçu le design de l'étude. J'ai fait la revue de littérature des articles portant sur la surcroissance microbienne. J'ai construit, nettoyé et validé la base de données. Sous la supervision du groupe de recherche, j'ai fait l'analyse et l'interprétation des données. J'ai rédigé la première version de l'article et j'adressé les commentaires des collaborateurs du groupe de recherche et des réviseurs du journal.

Article publié dans *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* en novembre 2016.

Juan C. Arango-Sabogal, Olivia Labrecque, Julie Paré, Julie-Hélène Fairbrother, Jean-Philippe Roy, Vincent Wellemans, Gilles Fecteau¹

Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada (Arango-Sabogal, Roy, Wellemans, Fecteau); Laboratory of Epidemiological Animal Surveillance of Québec, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food of Québec, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada (Labrecque, Fairbrother); and Canadian Food Inspection Agency, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada (Paré).

¹Corresponding Author: Gilles Fecteau, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6. gilles.fecteau@umontreal.ca

Running head: Use of PCR on overgrown MAP cultures

Abstract

Culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) is the definitive antemortem diagnostic method for paratuberculosis. Microbial overgrowth is a challenge for MAP culture, however, as it complicates, delays, and increases cost of the process. Additionally, herd status determination is impeded when non-interpretable (NI) results are obtained. The performance of PCR is comparable to fecal culture, thus it may be a complementary diagnostic tool to classify NI samples. Our study aimed to determine if MAP DNA can be identified by PCR performed on NI environmental samples and to evaluate the performance of PCR before and after the culture of these samples in liquid media. A total of 154 environmental samples (culture status: 62 NI, 62 negative, and 30 positive) were analyzed by PCR before being incubated in an automated system. Growth was confirmed by acid-fast bacilli stain and then the same PCR method was again applied on incubated samples, regardless of culture and stain results. Change in MAP DNA after incubation was assessed by converting the PCR quantification cycle (Cq) values into fold change using the $2^{-\Delta Cq}$ method ($\Delta Cq = Cq \text{ after culture} - Cq \text{ before culture}$). A total of 1.6% (SE = 1.6) of the NI environmental samples had detectable MAP DNA. The PCR had a significantly better performance when applied after the culture than before the culture ($P = 0.004$). After the culture, a 66-fold change (SE = 17.1) in MAP DNA was observed on average. Performing a PCR on NI samples improves MAP culturing. The PCR method used in our study is a reliable and consistent method to classify NI environmental samples.

Key words: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*; overgrown environmental cultures; PCR.

6.1 Introduction

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) is the etiologic agent of paratuberculosis, an incurable chronic contagious enteritis of ruminants that causes significant economic losses to the dairy industry,^{14,20,22} and has been associated with Crohn's disease in humans.^{5,15,30} Bacteriologic culture and identification of MAP is considered the definitive antemortem test to confirm Johne's disease.³⁷ Culture of MAP can be performed on individual fecal samples (collected directly from the animal) or environmental samples (collected from sites of manure accumulation in the farms). Environmental sampling is the most cost-effective method to determine herd status.³⁵ Whether samples are from individual animals or from the environment, the bacteriologic culture process remains the same. It includes a purification process (or decontamination) to reduce microbial overgrowth, a long incubation period in a selective culture medium (solid or liquid) to promote the growth of MAP, and, finally, identification of MAP by phenotypic or genotypic methods.³⁷

There are some differences between the culture media used for MAP isolation. Solid medium is less costly than liquid medium, it requires less instrumentation, and MAP identification is simpler.³⁷ However, MAP growth is slower on a solid medium (10–20 weeks) compared to in a liquid one (8–12 weeks). The latter is more sensitive but MAP identification by phenotypic or genotypic methods is required (e.g., by acid-fast bacilli [AFB] stain or PCR assay). As a consequence of microbial overgrowth, non-interpretible (NI) or contaminated samples can be reported with both media.³⁷

Microbial overgrowth is one of the challenges of mycobacterial culture regardless of which medium is used. In the literature, this phenomenon is referred to as contamination, but this term may be misleading. Often, contamination refers to an inappropriate technique during collection of a specimen or during laboratory procedures. When microbial overgrowth is observed in MAP culture, it reflects the growth of the microorganisms normally present in the feces but not relevant to detection of MAP. This overgrowth of normal gut flora may inhibit MAP growth (fermentation has been proven to inhibit MAP growth *in vitro*¹⁷) or reduce the overall efficiency to recover and identify MAP. This phenomena is different from a typical sample contamination that can be

caused by inadequate sampling, shipping, or laboratory process, as it is has been described for other substrates like milk²³ or blood.⁹ It has been suggested that microbial overgrowth should be reported as an outcome in methodologic assessments together with isolation rates.^{10,25,34}

Several purification protocols have been developed and studied to reduce microbial overgrowth and to improve MAP recovery.³⁶ However, the proportion of overgrown cultures is not always reported in MAP publications nor is there a consistent definition of a NI sample among published studies.^{10,37} Often, NI samples are assumed negative or excluded from the statistical analysis. The proportion of overgrown cultures reported in the literature is highly variable,³⁸ as in bovine feces where it has been reported to be from 7% to 44%.^{7,8} Several factors have been mentioned as having an impact on microbial overgrowth. One study³⁸ found clustering of NI cultures within submissions and within farms, suggesting seasonal and environmental factors such as the type of feed given to livestock. Microbial overgrowth complicates, delays, and increases the cost of MAP culture³⁷ and may affect culture sensitivity. Additionally, it may be difficult to correctly assess herd status when NI results are obtained from environmental samples.

Another tool for MAP detection that has been available for several years is PCR. The accuracy of a PCR assay may be different depending on the target, the DNA extraction method used, or the substrate on which the assay is performed. One study²¹ evaluated the sensitivity and specificity of 6 DNA extraction kits and several target genes for the detection of MAP DNA from fecal samples collected from infected cows with different levels of shedding. The authors underlined the importance of using the correct methodology in order to have an accurate result. The IS900 DNA insertion sequence is present in 14–20 copies in the MAP genome and is the most common target for MAP PCR and typing because of the high sensitivity of the assay.^{1,6,24} The performance of PCR has been compared with fecal culture and serum enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in several studies. In one study, comparing the accuracy of direct PCR on environmental samples with the accuracy of culture in liquid and solid media and serum ELISA, the sensitivity and specificity of real-time PCR were estimated to be 60% and 97%, respectively.¹ In another study,² the results of quantitative PCR and culture of pooled and environmental samples were correlated. Whether it is performed directly on

fecal specimens or as a confirmatory method, PCR is useful for identifying MAP-infected herds.^{1,18} Detection of MAP DNA in environmental or individual samples confirms the presence of the microorganism on the farm. On the other hand, a positive PCR on individual cultures may or may not reflect a true infection with a viable microorganism. Overall, PCR performed on NI environmental samples may be a useful complementary diagnostic tool for classification and improving the detection of MAP infected herds without necessitating additional sampling.

The main objective of our study was to determine if MAP DNA can be detected by a PCR method performed on NI environmental samples overgrown by other microorganisms. A secondary objective was to evaluate the performance of the PCR before and after incubation in an automated system.^a

6.2 Materials and methods

6.2.1 Sample selection

Environmental samples from a previous study³ were purposively selected. Samples were collected using a standardized technique,³ between June 20 and November 24, 2011 from different environmental sites of manure accumulation in tie-stall dairy herds with known MAP status. Herds were located in 4 regions of Québec, Canada. The median herd size was 59 lactating cows (30–211 cows). Most of the herds were exclusively Holstein, 1 herd was exclusively Jersey, and, in the other herds, another breed was also present.³ Samples were kept frozen at -70°C until cultured at the Quebec Animal Disease Surveillance Laboratory (LEAQ) in Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, which is a laboratory accredited for MAP culture by the United States Department of Agriculture (USDA).

6.2.2 Study groups

Samples were divided in groups according to the bacteriologic culture result obtained in 2011. A total of 62 NI environmental samples (NI group) were included and matched by farm, season, and environmental site with 62 negative environmental samples (negative group). All positive environmental samples obtained in 2011 were also included (positive group; $n = 30$).

6.2.3 Culture of MAP

Initial isolation of MAP was achieved using liquid medium^b and an automated system.^a Samples were processed as previously described,³ following the recommendations of the manufacturer. The initial decontamination, culture, AFB stain, and PCR confirmation were performed as a part of another study, and full details are provided in that study.³ A brief summary of the methodologies used in this prior work is set out below.

After decontamination, 3 tests were performed in series: 1) incubation in the automated system,^a 2) AFB staining,^c and 3) confirmatory PCR^d applied on incubated samples. The results of these tests were interpreted according to USDA recommendations.¹³ A sample was considered positive for MAP culture if flagged positive by the automated system, the AFB stain, and the PCR. Mycobacteria other than MAP were confirmed if the sample was flagged positive by the automated system and positive by the AFB stain but negative by PCR. When a positive signal was flagged by the automated system and the AFB was negative, no PCR was performed, and the sample was declared NI. When no signal was flagged by the automated system, neither AFB nor PCR were applied and the sample was declared negative to MAP culture.

AFB stain^c was performed on incubated samples following the recommendations of the manufacturer. The incubated sample was applied to a slide, heat-fixed between 65°C and 75°C for 2 h, stained with auramine–rhodamine for 15 min, washed with distilled water, destained with alcohol-acid for 10 min, washed with distilled water, and counterstained with potassium permanganate. The slide was then washed, dried, and examined by fluorescence microscopy by a trained technician.

Confirmatory PCR^d was performed following the instructions of the manufacturer. DNA extraction was performed with a commercial kit,^e and amplification was achieved using the reagents recommended by the manufacturer. A quantification cycle (Cq) value was used to establish a cutoff value to discriminate positive from negative samples. For descriptive purposes, samples were declared positive if Cq < 37, suspect if Cq was 37–40, and negative if no signal was detected, as suggested by the manufacturer.^d However, for statistical analysis, only 2 categories were considered: positive if Cq < 37 and negative if no signal was detected or Cq ≥ 37.

6.2.4 Study protocol

For our study, all analyses were performed at LEAQ between January and April 2014. After the first culture in 2011, the remaining inoculum of all samples was kept frozen at –70°C for an average of 802 days (range: 610–971 days). These samples were thawed and cultured with the same protocol previously described,³ except for the

following modifications. First, a PCR^d was applied directly on all the inocula, which were then incubated in the automated system.^a Growth was confirmed by AFB stain^c and finally, all the samples were analyzed by PCR^d regardless of the outcome of the previous incubation and AFB stain.

6.2.5 Statistical analysis

Descriptive statistics were used to characterize the freezing time and microbial growth variables such as the time to detection (defined as the number of days to flag a positive signal in the automated system^a) and the microbial growth index units (which is a measure of the fluorescence emitted caused by oxygen consumption by the microorganisms in the tube) within the groups. Distribution of the results by group was also described. Kruskal–Wallis rank test was used to compare mean growth units and mean time to detection between the study groups (NI, negative, and positive) within each incubation time. The *t*-test for paired data was used to compare mean growth units and mean time to detection between incubations for each group of samples. Normality distribution of the differences was evaluated using the normality probability plot. McNemar test for paired data was used to compare the performance of PCR within the groups when applied before and after the culture. PCR Cq values were converted into fold change using the $2^{-\Delta Cq}$ method,³¹ where $\Delta Cq = (Cq \text{ after the culture} - Cq \text{ before the culture})$, in order to assess the relative change in the amount of MAP DNA after incubation.

6.3 Results

A total of 154 environmental samples from 23 Québec dairy herds were studied (19 MAP positive and 4 MAP negative). The NI samples and negative samples were matched by farm, site, and season when possible. Absence of duplicate or negative samples from the same site were the 2 reasons why matching was not always possible. Final matching was as follows: out of the 62 samples from the NI group, 36 were matched by farm, site, and season, 17 samples by farm and season, and 9 samples by farm and site.

Samples experienced 2 freeze–thaw cycles before being processed for the present study. From collection and before the first culture, samples were frozen for 66 days on average (SE = 4.0; range: 3–167 days). After the decontamination process for the first culture, the remaining inoculum was frozen for 802 days on average (SE = 8.0; range: 610–971 days). Before the processing for the present study, samples had a mean total freezing time of 868 days (SE = 4.5; range: 777–974 days).

The time to detection and growth index of the samples for both incubation times are presented in Table 1. For the first incubation performed in 2011, growth units were significantly higher for NI samples than for positive samples ($P = 0.0009$); however, there was no statistical difference between the time to detection for these groups of samples ($P = 0.6$). For the second culture performed in 2014, as with the first culture, growth units were significantly higher for the NI samples compared to the negative and positive samples ($P = 0.004$), whereas no difference was observed on the time to detection between the groups ($P = 0.1$). Comparing the first incubation to the second incubation for the samples that were flagged by the automated system at both times within the NI ($n = 36$) and positive ($n = 26$) groups, there was no difference for the NI group on either the growth units ($P = 0.2$) or the time to detection ($P = 0.2$). For the positive group, no difference was observed on the growth units at both incubation times ($P = 0.6$); however, time to detection was significantly lower in 2011 than 2014 ($P < 0.0001$).

6.3.1 PCR on NI samples

Out of the 62 NI samples, MAP DNA was identified from 1 sample (Table 2), which tested positive on all of the tests performed (PCR before culture, incubation, stain, and PCR after culture). This sample was taken from a highly infected herd (concurrent apparent within-herd fecal culture prevalence: 28.6%; number of positive environmental samples: 7/10).³

In the remaining 61 NI samples, MAP DNA was not detected by PCR either before or after incubation. In 26 of these samples, the incubation was negative. Microbial growth was detected in the remaining 35 samples by a positive incubation (flagged positive by the automated system), but in only 1 sample was the AFB stain also positive (Table 2).

Among the negative samples, MAP DNA was not detected; however, 20 of the 62 negative samples were flagged positive by the automated system (Table 2). These samples would be classified as NI with the 2011 serial testing interpretation.

6.3.2 Performance of PCR before and after culture

All of the samples from the positive group that were positive by PCR before culture were positive to PCR after culture ($n = 11$). Also, 4 of 5 suspect samples by PCR before culture were positive by PCR after the culture. These samples were also flagged positive by the automated system and AFB stain. The remaining suspect PCR sample before culture ($Cq = 39.09$) was negative by incubation (not flagged by the automated system), the AFB stain, and PCR after culture. Fourteen samples were negative by PCR before culture. Among them, 6 samples were flagged positive by the automated system, AFB, and PCR after culture. Five samples were only flagged positive by the automated system, and the 3 remaining samples were negative to all serial tests.

Overall, no difference was observed between the number of samples found positive by PCR before and after culture among the NI group (1 sample was positive both before and after) and negative group (none of the samples were positive). However, PCR

yielded more positive results when applied after culture than before culture ($P = 0.004$) within the positive group.

The PCR Cq values before culture ranged from 29.38 to 39.86, whereas after culture these values ranged from 28.03 to 33.07 (Table 3). The difference in MAP DNA increased after the culture was assessed with the $2^{-\Delta Cq}$ method for 16 samples (1 from the NI group and 15 from the positive group), which had Cq values both before and after the culture. On average, a 66-fold increase (SE = 17.1; 95% confidence interval: 29.9–102.8) on MAP DNA was observed after the culture.

6.4 Discussion

Application of a PCR to NI environmental samples identified only 1 NI sample (1.6%) as positive when applied before or after culture. This sample was most likely a true positive sample, based on the positive results after incubation and AFB stain performed in the present study. Moreover, the sample was collected from an infected herd with a high within-herd fecal culture prevalence in addition to other positive environmental samples collected during the same visit.

Non-interpretable samples are not commonly mentioned in scientific publications; they are likely assumed MAP culture negative or excluded from the analysis. According to our study, considering NI samples as negative would misclassify a small percentage of samples (1.6% of the NI samples), which was coherent with the workflow of a positive sample (flagged positive by the automated system, AFB stain, and PCR).

Use of PCR after culture in known positive samples yielded a significantly higher number of positives than prior to incubation. In our study, the same PCR method had a significantly better performance when applied after culture (as a confirmatory method) than when applied before culture. An almost 2-fold increase in the number of positive samples was observed. This finding is in accordance with a previous report that suggested a greater sensitivity of PCR when used to confirm MAP from previously cultured samples.⁶ The incubation process increased the amount of MAP as expected, increasing as well the chance of detection of MAP DNA by PCR. In 45% of the PCR-positive samples after culture, the amount of MAP DNA was not detectable or was in very low levels before culture. The mean increase in MAP DNA of 66 fold after culture (calculated as $\overline{2^{-\Delta Cq}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n 2^{-\Delta Cq}$) suggests an exponential increase in MAP load, as should be expected after a long incubation process in an enriched culture medium.

A previous study²¹ evaluated the ability of 6 fecal DNA extraction kits to obtain MAP DNA from feces. In that study,²¹ the sensitivity and specificity of these kits for different target genes were assessed, and the results highlighted the importance of using the correct methodology in order to have a reliable result. According to the results, the PCR method used in our study had one of the greatest sensitivity (88.2%) and specificity

(100%) values. In the prior study,²¹ a direct PCR was performed on individual fecal samples (instead of environmental) without a decontamination treatment collected from known status cows housed at the National Animal Disease Center in Ames, Iowa. Our results support those findings, although the sensitivity observed in the present study appeared to be lower after the decontamination process and the freezing period of the samples. The PCR method used in our study seems to be a reliable and consistent method to confirm MAP for 3 reasons: 1) every positive result after culture was preceded by a positive signal from the automated system and a positive AFB stain, 2) results were always negative after a negative AFB stain, and finally, 3) there were no positives found in the negative group.

The identification of MAP by either genotypic or phenotypic methods has been suggested by the manufacturer^a and the literature.³⁷ In the MAP culture process, 3 serial tests are applied to confirm a positive sample (incubation, AFB stain, and PCR). For the purpose of our study, we included a confirmatory PCR regardless of the results obtained by incubation and AFB stain. However, we observed that every negative result for the AFB stain was in agreement with a negative result by PCR (100% of the time). It seems that performing a PCR on incubation and AFB-negative samples does not provide additional diagnostic information. In the same way, a positive AFB was PCR positive 95.7% of the time, suggesting that the AFB step has an important diagnostic value in the whole MAP culture process. This finding supports the recommendation of the manufacturer^a who proposes performing either an AFB stain or a PCR after a positive signal flagged by the automated system in order to identify MAP. An AFB stain performed on incubated culture medium by trained laboratory personnel is an economic method to confirm MAP from samples flagged positive by the automated system.

The freezing periods may have an impact on the number and survival of other microorganisms and MAP. In our study, no statistical difference was observed on the growth units and detection time between the 2 incubations within the NI group despite the long freezing period. One would expect that growth units would be higher if the study was performed on fresh fecal samples. However, within the positive group, the mean time to detection was significantly lower in the first incubation compared to the second, suggesting that freezing may reduce the amount of MAP. Time to detection has been

suggested as an approximate measure of shedding level,¹³ with the suggestion being that the automated system will flag a signal before 21 days for a heavy shedder and after 30 days for low shedders. The freeze–thaw cycles may reduce microbial overgrowth, add several days to detection, and reduce MAP recovery of samples from low shedders.¹³

In our study, viable MAP was detected by automated culture in 70% of the samples from the positive group. Previous studies assessing the impact of freezing on MAP viability concluded that storage of samples at -70°C causes a less harmful effect on MAP viability, varying from none (if kept for 3 months) to 14% monthly loss of MAP bacterial load.^{19,27,28} In theory, if MAP is not viable, PCR should be able to detect its DNA unless it is present in too small a quantity, not evenly distributed in the samples (lack of homogeneity), or inhibitors are present. It has been reported that microbial overgrowth can interfere with PCR assays that target IS900, and the samples with this feature require further DNA purification in order to obtain a positive result.³⁸ Inhibitors can vary according to the type of sample. Polysaccharides are one of the most common inhibitors found in feces. They change the chemical properties of nucleic acids.³² Environmental samples may contain proteins, polyphenols, polysaccharides, metal ions, and RNases,²⁹ as well as humic and fulminic acids that are able to inhibit PCR reactions even at low concentrations.¹⁶

Samples from the NI group had the highest growth units at both incubations. Even though there was not a statistical difference on mean growth units between both incubations, we observed that mean growth units halved at the second incubation, possibly by a reduction of bacterial load as a result of the long freezing period. The similarity in the average time to detection within the NI group may be attributed to the absence of available nutrients caused by consumption by growing bacteria. In our study, no microbial growth was observed on almost half of the samples from the NI group. Surprisingly, microbial growth (as detected by a positive signal of the automated system) was confirmed on approximately one-third of the samples from the negative group (microbial growth was not detected on the first culture, as they were considered negative by MAP culture). Several hypotheses may explain this phenomenon: lack of homogeneity of the sample,²⁷ survival of spore-forming bacilli and fungus beyond the freezing period, cross-contamination, and/or high sensitivity of automated liquid systems. Spore-forming

bacilli have been proven to survive extreme conditions.^{4,33} It may be possible that bacteria that were in spore form may have passed to a vegetative form under the favorable conditions of the enrichment broth and the incubation performed in this study. In addition, false-positive readings caused by cross-contamination have been reported when using automated liquid culture systems for the isolation of *M. tuberculosis* and *M. avium*.¹¹ These culture systems are considered too sensitive to microbial growth (and not enough specific for *M. tuberculosis* and *M. avium*) as they can flag growth of any bacterial species,²⁶ which necessitates further MAP confirmation. The enrichment of the culture tubes for the automated system may contribute to microbial overgrowth, as found by a previous study that compared 2 automated systems for MAP culture.¹²

The PCR method used in our study detected MAP from NI environmental samples. Performing a PCR on NI samples may contribute to improving the MAP culture process, eliminating the NI outcome, and thus increasing the certitude of culture results. However, the associated costs need to be taken into account, as only a small percentage of positive results may be obtained. Bacteriologic culture significantly increased PCR performance. This study underlines the diagnostic value of AFB stain, as the results from this test were strongly correlated with PCR outcome. The PCR method used in our study was highly specific, as it was always negative after a negative AFB stain, and no positive results were obtained on the samples from the negative group. Thus, performing a PCR when no signal is flagged by the automated system and when the AFB stain is negative does not provide additional diagnostic information. A positive AFB stain, when performed by trained laboratory personnel, is highly suggestive of a positive MAP culture result. The PCR method used in our study is a reliable confirmatory method, as all PCR-positive results were always preceded by a positive incubation and a positive AFB stain.

Authors' contributions

JC Arango-Sabogal contributed to conception and design of the study; contributed to acquisition, analysis, and interpretation of data; and drafted the manuscript. O Labrecque contributed to design of the study; contributed to analysis of data; and critically revised the manuscript. J Paré contributed to conception and design of the

study; contributed to interpretation of data; drafted the manuscript; and critically revised the manuscript. JH Fairbrother contributed to analysis and interpretation of data, and critically revised the manuscript. JP Roy contributed to conception and design of the study; contributed to analysis and interpretation of data; and critically revised the manuscript. V Wellemans contributed to conception and design of the study; contributed to interpretation of data; and critically revised the manuscript. G Fecteau contributed to conception and design of the study; contributed to acquisition, analysis, and interpretation of data; drafted the manuscript; and critically revised the manuscript. All authors gave final approval, and agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions relating to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Sources and manufacturers

- a. BACTEC MGIT 960 system, BD, Franklin Lakes, NJ.
- b. BD MGIT Para TB culture media, BD, Franklin Lakes, NJ.
- c. TB fluorescent stain kit, Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, Canada.
- d. TaqMan MAP (Johne's) reagents, Applied Biosystems, Foster City, CA.
- e. MagMax total nucleic isolation kit, Applied Biosystems, Foster City, CA.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

This study was funded by Pfizer-Zoetis and the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food of Québec.

6.5 References

1. Alinovi CA, et al. Real-time PCR, compared to liquid and solid culture media and ELISA, for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Vet Microbiol* 2009;136:177–179.
2. Aly SS, et al. 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. *J Vet Diagn Invest* 2010;22:677–683.
3. Arango-Sabogal JC, et al. Detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in tie-stall dairy herds using a standardized environmental sampling technique and targeted pooled samples. *Can J Vet Res* 2016;60:175-182.
4. Atrih A, Foster SJ. Bacterial endospores the ultimate survivors. *Int Dairy J* 2002;12:217–223.
5. Barkema HW, et al. Crohn's disease in humans and Johne's disease in cattle-linked diseases? In: Krause DO, Hendrick S, eds. *Zoonotic Pathogens in the Food Chain*. Wallingford, UK: CAB International, 2011:197–213.
6. Bölske G, et al. Diagnosis of paratuberculosis by PCR. In: Behr MA, Collins DM, eds. *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. Wallingford, Oxfordshire: CAB International, 2010:267–283.
7. Cousins DV, et al. Use of BACTEC radiometric culture method and polymerase chain reaction for the rapid screening of faeces and tissues for *Mycobacterium paratuberculosis*. *Aust Vet J* 1995;72:458–462.
8. Eamens GJ, et al. Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease. *Vet Microbiol* 2000;77:357–367.
9. Fecteau G, et al. Bacteriological culture of blood from critically ill neonatal calves. *Can Vet J* 1997;38:95–100.

10. Gardner IA, et al. Consensus-based reporting standards for diagnostic test accuracy studies for paratuberculosis in ruminants. *Prev Vet Med* 2011;101:18–34.
11. Gascoyne-Binzi DM, et al. Rapid identification of laboratory contamination with *Mycobacterium tuberculosis* using variable number tandem repeat analysis. *J Clin Microbiol* 2001;39:69–74.
12. Gumber S, Whittington RJ. Comparison of BACTEC 460 and MGIT 960 systems for the culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* S strain and observations on the effect of inclusion of ampicillin in culture media to reduce contamination. *Vet Microbiol* 2007;119:42–52.
13. Harris B, et al. Laboratory methods for isolation and identification of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (Johne's Disease). Ames, IA: USDA National Veterinary Services Laboratories, 2009.
14. Hendrick SH, et al. Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. *J Am Vet Med Assoc* 2005;227:1302–1308.
15. Hermon-Taylor J. Protagonist. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* is a cause of Crohn's disease. *Gut* 2001;49:755–756.
16. Ijzerman MM, et al. A method to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1997;63:145–153.
17. Katayama N, et al. Effect of ensilage on inactivation of *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Grassl Sci* 2000;46:282–288.
18. Keller SM, et al. Comparison of fecal culture and F57 real-time polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss cattle herds with a history of paratuberculosis. *Acta Vet Scand* 2014;56:68.
19. Khare S, et al. Effects of shipping and storage conditions of fecal samples on viability of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2008;46:1561–1562.
20. Kudahl AB, Nielsen SS. Effect of paratuberculosis on slaughter weight and slaughter value of dairy cows. *J Dairy Sci* 2009;92:4340–4346.

21. Leite FL, et al. Comparison of fecal DNA extraction kits for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by polymerase chain reaction. J Vet Diagn Invest 2013;25:27–34.
22. Lombard JE, et al. Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows. J Am Vet Med Assoc 2005;227:1975–1981.
23. Makovec JA, Ruegg PL. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. J Dairy Sci 2003;86:3466–3472.
24. Möbius P, et al. Comparison of 13 single-round and nested PCR assays targeting IS900, ISMav2, f57 and locus 255 for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Vet Microbiol 2008;126:324–333.
25. Nielsen SS, et al. Comparison of contamination and growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on two different media. J Appl Microbiol 2004;96:149–153.
26. Pozzato N, et al. Evaluation of a rapid and inexpensive liquid culture system for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine faeces. J Microbiol Methods 2011;84:413–417.
27. Raizman EA, et al. Long-term survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples obtained from naturally infected cows and stored at –18°C and –70°C. Vet Med Int 2011;2011:341691.
28. Richards WD, Thoen CO. Effect of freezing on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. J Clin Microbiol 1977;6:392–395.
29. Rock C, et al. PCR inhibitor levels in concentrates of biosolid samples predicted by a new method based on excitation-emission matrix spectroscopy. Appl Environ Microbiol 2010;76:8102–8109.
30. Scanu AM, et al. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cases of irritable bowel syndrome and comparison with Crohn’s disease and Johne’s disease: common neural and immune pathogenicities. J Clin Microbiol 2007;45:3883–3890.

31. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3:1101–1108.
32. Schrader C, et al. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol* 2012;113:1014–1026.
33. Setlow P. Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spores of *Bacillus* species. *Annu Rev Microbiol* 1995;49:29–54.
34. Stabel JR. An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *J Vet Diagn Invest* 1997;9:375–380.
35. Sweeney RW, et al. Paratuberculosis (Johne's disease) in cattle and other susceptible species. *J Vet Intern Med* 2012;26:1239–1250.
36. Whipple DL, et al. Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. *J Vet Diagn Invest* 1991;3:368–373.
37. Whittington RJ. Cultivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: Behr MA, Collins D, eds. *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. Wallingford, Oxfordshire: CAB International, 2010:244–266.
38. Whittington RJ. Factors affecting isolation and identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from fecal and tissue samples in a liquid culture system. *J Clin Microbiol* 2009;47:614–622.

Table 6.1. Growth units and days to detection of environmental samples collected from Québec dairy herds cultured for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection at 2 different times.*

Group	First incubation (2011)†			Second incubation (2014)		
	No. samples positive by incubation	Growth units‡	Days to detection ‡	No. samples positive by incubation	Growth units‡	Days to detection ‡
NI	62	3,362.7 (766.9)	31.6 (1.6)	36	1,699.9 (386.9)	28.1 (2.0)
Negative	0	NA	NA	20	1,055.4 (514.4)	33.5 (3.2)
Positive	30	712.4 (211.7)	30.5 (1.9)	26	576.8 (256.4)	34.1 (29.5)

* NA = not applicable; NI = non-interpretable.

† The 2011 culture was performed as a part of another study, and full details are provided in that study.³

‡ Results expressed as mean (with standard error provided in brackets).

Table 6.2. Results of a PCR method to detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* when applied before and after the incubation of environmental samples collected from Québec dairy herds in a commercial automated culture system.*

Group (<i>n</i>)	PCR† results before culture	Culture results		PCR† results after culture	<i>n</i>
		Incubation	AFB stain		
NI (62)	–	+	–	–	34
	–	–	NA	–	26
	+	+	+	+	1
	–	+	+	–	1
Negative (62)	–	–	NA	–	42
	–	+	–	–	20
Positive (30)	+	+	+	+	11
	–	+	+	+	6
	–	+	–	–	5
	Suspect	+	+	+	4
	–	–	NA	–	3
	Suspect	–	NA	–	1

* Automated system: BACTEC MGIT 960 system, BD, Franklin Lakes, NJ. AFB = acid-fast bacilli; NA = not applicable; NI = non-interpretable.

† PCR was performed using a commercial system (TaqMan MAP (Johne's) reagents, Applied Biosystems, Foster City, CA) and automated nucleic acid isolation (MagMax total nucleic acid isolation kit, Applied Biosystems, Foster City, CA).

Table 6.3. Comparative quantification cycle (Cq) values of a PCR method when applied before and after the culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from environmental samples collected from Québec dairy herds.*

Group	PCR† results before culture (Cq value)	Culture results			PCR† results after culture (Cq value)	MAP DNA fold increase after culture ($2^{-\Delta Cq}$)
		Incubation		AFB stain		
		Growth units	Time to detection (days)			
NI	36.04	557	40.3	+	30.54	58.1
Positive	36.89	294	37.2	+	29.93	124.5
	29.38	1082	15.2	+	28.03	2.5
	35.79	863	26.1	+	30.13	50.6
	35.99	366	26.9	+	30.58	42.5
	34.45	458	43	+	29.97	22.3
	35.93	304	30.3	+	29.48	87.4
	35.41	437	26.1	+	31.78	12.4
	36.80	217	27.3	+	31.29	45.6
	36.91	224	33.9	+	30.85	66.7
	33.36	256	24.3	+	30.60	6.8
	33.49	412	20.7	+	28.79	26.0
	37.35	179	31.4	+	29.89	176.1
	37.07	313	36.9	+	31.37	52.0
	37.93	85	42.4	+	33.07	29.0
	39.86	314	27	+	31.84	259.6
	39.09	–	–	NA	–	NA
	–	174	35.8	+	30.32	NA
	–	180	27.7	+	30.76	NA
	–	188	34.4	+	30.57	NA
	–	195	43.1	+	32.53	NA
–	304	40.4	+	29.8	NA	
–	247	35.5	+	30.61	NA	

* AFB = acid-fast bacilli; ΔCq = (Cq value after culture – Cq value before culture); NA = not applicable; NI = non-interpretable.

† PCR was performed using a commercial system (TaqMan MAP (Johne's) reagents, Applied Biosystems, Foster City, CA) and automated nucleic acid isolation (MagMax total nucleic isolation kit, Applied Biosystems, Foster City, CA).

CHAPITRE 7
DISCUSSION GÉNÉRALE

DISCUSSION GÉNÉRALE

Dans cette section nous allons d'abord discuter les résultats liés à l'objectif principal de cette thèse qui était de déterminer l'impact de l'adhésion des fermes laitières en stabulation entravée au PVQPCP sur l'incidence de l'excrétion fécale individuelle de MAP. Par la suite, la discussion des résultats liés à l'amélioration de la stratégie de détection des troupeaux laitiers infectés par MAP (deuxième objectif) sera présentée. Cette partie est scindée en deux. La première partie porte sur l'évaluation de la performance de la CPE pour l'identification des troupeaux laitiers en stabulation entravée infectés par MAP. La deuxième partie porte sur l'évaluation de la performance d'une méthode PCR pour la détection de l'ADN de MAP dans les échantillons de l'environnement déclarés NI au préalable. Les enjeux et défis liés à la réalisation d'une étude longitudinale de 5 ans sont également discutés. Finalement, les perspectives futures sont présentées. Les résultats de cette thèse apportent de l'information pour aider à combler des lacunes dans les connaissances scientifiques identifiées récemment (Barkema, Orsel et al. 2017) ainsi que des lacunes propres au contexte québécois.

7.1 Impact de l'adhésion des fermes laitières en stabulation entravée dans le PVQPCP et de la mise en place de mesures de contrôle des maladies entériques contagieuses sur l'incidence de l'excrétion fécale de MAP

Nous avons observé une diminution de l'incidence d'excrétion fécale individuelle de MAP chez les vaches nées après l'adhésion des fermes au PVQPCP. Cette diminution est probablement une conséquence de la réduction du risque de transmission à l'intérieur du troupeau via la mise en place de pratiques de régie qui diminuent le contact des veaux avec les vaches adultes ou leurs fèces. Lors de l'adhésion d'une ferme au PVQPCP, une analyse du risque évaluant la transmission de MAP était effectuée ainsi que des recommandations ciblées visant la réduction du risque de transmission des maladies entériques contagieuses. La mise en place des recommandations améliorerait les bonnes

pratiques d'élevage et devrait diminuer le risque de transmission de MAP. Notre étude comporte une particularité qu'il faut mentionner : elle a été réalisée dans des petits troupeaux (taille moyenne du troupeau au premier prélèvement : 57 vaches) en stabulation entravée et à faible prévalence (prévalence moyenne des troupeaux au premier prélèvement <3%).

Nous avons eu de la collaboration du MAPAQ pour la réalisation de cette étude, mais notre protocole d'échantillonnage (réalisation des prélèvements) ainsi que les questionnaires (Q2 à Q5; complétés par les médecins vétérinaires) étaient indépendants du PVQPCP. Les questionnaires complétés lors de l'adhésion des fermes (Q0) ont été fournis par le MAPAQ, car le PVQPCP a été lancé avant le début de la présente étude. Pour le recrutement des troupeaux participants, le MAPAQ communiquait aux producteurs le fait qu'un projet de recherche était en cours et si les producteurs acceptaient de participer, on les contactait.

Tel que discuté dans l'article du chapitre quatre, nos résultats sont similaires à ceux observés dans d'autres études longitudinales (Benedictus, Mitchell et al. 2008; Ferrouillet, Wells et al. 2009; Collins, Eggleston et al. 2010; Pillars, Grooms et al. 2011; Espejo, Godden et al. 2012). La nouvelle information apportée par notre étude est complémentaire à celle des études réalisées aux États-Unis dans de grands troupeaux en stabulation libre. À la différence des études américaines, où les troupeaux étudiés étaient des troupeaux de démonstration (troupeaux exemples) dans lesquels l'observance des règles et recommandations du programme était obligatoire, dans les troupeaux de notre étude la mise en place du programme était volontaire. Nos résultats apportent de l'information pertinente pour les évaluateurs de programmes de prévention et contrôle dans le monde et contribuent à combler une des lacunes dans les connaissances scientifiques sur l'efficacité des programmes identifiée récemment par les experts (Barkema, Orsel et al. 2017). À notre connaissance, l'étude du chapitre quatre serait la sixième étude évaluant l'impact de l'adhésion à un programme de prévention et contrôle avec un suivi d'au moins cinq ans.

Cependant, l'inférence des résultats de notre étude doit se faire pour l'unité d'intérêt de l'étude, c'est-à-dire la vache. L'unité d'intérêt dicte le niveau d'inférence des résultats d'une étude (Dohoo, Martin et al. 2009). Le fait d'utiliser des données de niveaux

inférieurs (par exemple : l'individu) pour faire inférences sur des niveaux supérieurs (par exemple : le troupeau) est défini comme « biais atomistique » (Dohoo, Martin et al. 2009). Le contraire (faire des inférences au niveau individuel à partir des données à l'échelle du troupeau) est connu comme « biais écologique » (Rothman, Greenland et al. 2008; Dohoo, Martin et al. 2009). Notre devis d'étude nous a permis de démontrer que l'incidence d'excrétion fécale de MAP des vaches nées après l'adhésion de la ferme dans le PVQPCP est significativement moindre que celle des vaches nées avant. Ces résultats suggèrent un impact positif de l'adhésion des fermes sur l'incidence d'excrétion fécale individuelle. Par contre, à partir de notre étude nous ne sommes pas en mesure de conclure sur l'impact du PVQPCP sur l'incidence d'excrétion fécale au niveau du troupeau dans les fermes participantes. Pour atteindre cet objectif, il est nécessaire d'utiliser un devis d'étude à l'échelle du troupeau. Les scénarios possibles seront discutés dans la section sur les perspectives futures.

Nous avons utilisé dans notre étude l'excrétion fécale comme un indice de l'infection par MAP. Cette définition comporte des lacunes associées à la pathogenèse de la maladie et à la performance de la culture fécale. La détection de l'infection par MAP devrait être complétée idéalement par la confirmation de la présence de l'agent pathogène chez les animaux présentant des signes cliniques. Mais cela n'est pas toujours possible dans le cas d'une maladie à développement lent comme la PTB. Les animaux infectés par MAP sont éliminés du troupeau bien avant le développement des signes cliniques (Goodell, Hirst et al. 2000). De plus, du point de vue du contrôle de la maladie, l'impact des animaux asymptomatiques excréteurs (subcliniques) à long terme est plus important que celui des animaux présentant des signes cliniques. Les animaux asymptomatiques excréteurs, par opposition aux animaux dans le stade clinique, disséminent la bactérie avant que les signes cliniques soient décelables. L'utilisation de la culture fécale comme indice de l'infection par MAP est un choix acceptable, car cette méthode est considérée la plus sensible et demeure la méthode de référence pour le diagnostic *antemortem* de la PTB (Whittington 2010). Il a été suggéré aussi que la performance des tests pour le dépistage de la PTB augmente avec la progression de la maladie (Nielsen and Toft 2008). Plus précisément, la capacité de détection des infections avec la culture fécale augmente à

partir de l'âge de 2 ans (Nielsen and Toft 2006), raison pour laquelle, dans notre étude, nous avons ciblé les vaches adultes à prélever (>24 mois et au moins une parité).

Suite à l'adhésion des fermes, nous avons aussi observé une réduction du score du risque. Étant donné que le score reflète le risque de transmission de MAP à l'intérieur du troupeau, on pourrait penser que des mesures de contrôle ont été mises en place par les producteurs suite aux points critiques déficients identifiés dans le questionnaire d'analyse de risque. Ainsi, la réduction de l'excrétion fécale observée chez les animaux exposés au PVQPCP dans notre étude est vraisemblablement une conséquence de la réduction du risque de transmission de MAP à l'intérieur du troupeau qui se répercute sur le score de risque obtenu. Par contre, il est possible que la réduction du score et de l'excrétion fécale observées dans notre étude soient un gain collatéral suite à la mise en place de mesures visant à prévenir la transmission d'autres maladies entériques. Par exemple, les mesures instaurées dans les troupeaux suite à l'éclosion de *Salmonella* Dublin au Québec en 2011 pourront avoir eu un impact sur toutes les maladies entériques contagieuses. Les programmes de contrôle de la PTB sont un bon exemple des mesures de biosécurité ciblées à la ferme (Barker, Barkema et al. 2012). Les mesures de prévention et contrôle recommandées pour éviter la transmission de MAP se concentrent sur la réduction de transmission féco-orale. On pourrait penser que ces mesures seraient aussi efficaces pour réduire la transmission d'autres maladies entériques contagieuses (*Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., et *Cryptosporidium* spp.) telle qu'il a été suggéré (McKenna, Keefe et al. 2006). Une étude canadienne a estimé les bénéfices nets de l'adhésion au programme de prévention et contrôle (Wolf, Clement et al. 2014). Lorsque l'effet d'autres maladies à transmission féco-orale était inclus dans le modèle, le bénéfice net était de 19 \$ par vache par 10 ans vs. 74 \$ par vache par 10 ans sans l'inclusion de ce critère (Wolf, Clement et al. 2014). La diminution du bénéfice net lorsque les maladies à transmission féco-orale étaient considérées est dû à l'inclusion des coûts des pasteurisateurs de lait dans les fermes dans le calcul. Les pertes par une performance inadéquate n'ont pas été considérées dans le calcul non plus. Des exemples de programmes de prévention et contrôle pour d'autres maladies ont été également décrits. Par exemple, dans le cas du contrôle de *Salmonella* Dublin, une étude danoise présentait une approche incluant un score de risque de transmission, un plan d'action

(recommandations de changements des pratiques de régie), la mise en place des changements des pratiques de régie (ciblant à briser les routes d'infection) et le dépistage individuel et à l'échelle du troupeau (Nielsen and Nielsen 2012). Les auteurs ont rapporté que le contrôle de la salmonellose (réduction de la prévalence réelle et changement du statut du troupeau) était efficace dans les 10 troupeaux participants suite aux changements dans les pratiques de régie autour de la période néonatale (aire de vêlage) et dans les premiers mois de vie des animaux (Nielsen and Nielsen 2012). Une autre étude visant à déterminer quelles pratiques de régie étaient associées au contrôle de *Salmonella* Dublin a conclu aussi sur l'importance de l'environnement néonatal pour le succès du contrôle de la salmonellose chez les bovins laitiers (Nielsen, Vesterbæk et al. 2012). Par rapport à la cryptosporidiose, une étude canadienne visait à identifier les facteurs de risque (chez les veaux) associés à la diarrhée néonatale et à l'excrétion de *Cryptosporidium parvum* chez des génisses avant sevrage provenant de troupeaux laitiers avec un historique de diarrhée ou cryptosporidiose (Trotz-Williams, Wayne Martin et al. 2007). Les auteurs ont conclu que laisser les veaux avec leur mère au-delà d'une heure après le vêlage augmentait les chances de diarrhée (OR=1,39; IC 95 % : 1,15-1,69); (Trotz-Williams, Wayne Martin et al. 2007). Au niveau du troupeau, l'utilisation du savon ou détergent pour le lavage des ustensiles dédiés à l'alimentation des veaux était significativement associée à une réduction de la prévalence d'excrétion (RR=0,61; IC 95 % : 0,46-0,82; Trotz-Williams, Martin et al. 2008). Si on assume que, dans les troupeaux participants dans notre étude, des mesures de biosécurité ont été prises tout de suite après la date du premier cas lors de l'éclosion de *Salmonella* Dublin, l'impact de ces mesures sur la PTB sera évident seulement deux à trois ans plus tard (c'est-à-dire au plus tôt en 2013). Étant donné que tous les troupeaux de notre étude, sauf deux, ont adhéré au PVQPCP entre 2007 et 2010, l'impact des mesures du PVQPCP pourrait être confondu pour environ 40% des animaux de la cohorte après qui sont nés suite à l'éclosion de *Salmonella* Dublin au Québec. Par contre, il est probable que les mesures prises suite à l'éclosion de *Salmonella* Dublin au Québec soient mises en place après la grande campagne de sensibilisation et non après le premier cas rapporté. Dans ce cas, il est moins probable que l'impact de ces mesures soit confondu avec les pratiques changées lors de l'adhésion des fermes au PVQPCP.

La réduction du score de risque était variable dans les différentes sections de la ferme examinées par le questionnaire (Annexe 1). Le score initial (lors de l'adhésion au PVQPCP) et le score final (le score au dernier questionnaire disponible) pour chaque ferme et pour chaque section du questionnaire ainsi que pour la question sur les achats ont été analysés. Parmi toutes les pratiques examinées dans le questionnaire, les pratiques concernant les vaches adultes et le risque lié aux achats (comportement d'acheteur) semblent être celles les plus difficiles à changer (Annexe 1). Ces résultats suggèrent que les recommandations n'ont pas été suivies. Ces facteurs de risque sont importants, car l'infection chez les adultes a été rapportée, notamment dans les troupeaux à prévalence élevée (Espejo, Kubat et al. 2013). Ainsi, le facteur de risque le plus important pour l'introduction de MAP dans un troupeau est l'achat ou l'introduction d'animaux de remplacement (Rangel, Paré et al. 2015). Le risque augmente lorsque les animaux achetés proviennent de sources multiples (Pieper, Sorge et al. 2015). Étant donné l'importance reconnue dans la littérature scientifique de la variable « introduction d'animaux (achats) » pour l'introduction de MAP dans un troupeau, nous avons forcé cette variable dans les modèles de la première étude même si elle n'était pas significative dans l'analyse univariée. Par conséquent, nos valeurs estimées (sauf celles du modèle évaluant l'impact de la cohorte) représentent l'effet des prédicteurs d'intérêt après avoir ajusté pour le risque lié à l'introduction d'animaux. Il aurait été logique d'observer un risque d'excrétion fécale plus élevé dans les troupeaux avec un risque élevé d'introduction de MAP lié aux achats. Cependant, nous n'avons pas observé un tel effet. On pourrait penser que l'impact de l'introduction d'animaux dépend du risque de transmission à l'intérieur du troupeau. L'impact de l'introduction d'un animal infecté dans un troupeau pourrait être amplifié si les mesures de contrôle de la transmission du troupeau sont inadéquates. Par contre, l'effet de l'introduction de l'animal infecté pourrait être moindre si des mesures de contrôle sont déjà en place dans le troupeau. Aucune interaction significative entre la variable « achat » et les variables significatives de notre modèle finale n'a été observée dans la première étude. Dans le cas des troupeaux inclus dans la présente étude (inscrits au PVQPCP depuis quelques années et exposés aux mesures recommandées par les médecins vétérinaires), il pourrait être possible qu'une période plus longue que celle

de notre étude soit nécessaire pour observer l'impact des achats sur l'excrétion fécale de MAP.

Une diminution du score final par rapport au score initial a été observée dans les sections du questionnaire concernant les animaux les plus susceptibles à l'infection (aire de vêlage : nouveau-nés, génisses non sevrées et génisses sevrées) pour la majorité des troupeaux de l'étude (Annexe 1). Les plus grands changements ont été observés dans la section concernant les génisses non sevrées. Dans cette section, nous avons observé une réduction du score dans presque tous les troupeaux. Nous avons observé également une diminution du score pour la section aire de vêlage dans plus de la moitié des troupeaux. Les scores initial et final de la section concernant les génisses sevrées étaient toujours très faibles pour l'ensemble des troupeaux de l'étude. Les mesures de contrôle visant à diminuer le risque de dissémination de MAP chez les génisses sont les mesures les plus fréquemment recommandées dans les programmes de contrôle dans le monde (Geraghty, Graham et al. 2014). Les pratiques de régie associées aux animaux les plus susceptibles sont cruciales pour le contrôle de MAP. Cela peut expliquer notre observation d'une variation positive, dans la plupart des cas, du score dans ces sections. Il est possible que ces changements fassent suite aux recommandations des médecins vétérinaires, ce qui pourrait indiquer une bonne compréhension de l'épidémiologie (notamment de la transmission) de la maladie. De plus, il est intuitif que ces bonnes pratiques sont efficaces aussi pour le contrôle d'autres maladies entériques (McKenna, Keefe et al. 2006).

Étant donné que le score total du questionnaire est la somme du score de plusieurs questions se rapportant à des pratiques sur différents groupes d'âge à la ferme, il ne permet pas d'identifier si certaines pratiques de régie spécifiques ont eu un impact plus important sur la réduction du risque d'excrétion fécale. Pour arriver à identifier des pratiques spécifiques, on doit étudier des questions particulières dans chacune des sections. Par exemple, on pourrait penser que les animaux d'un troupeau dans lequel la plupart des points du score proviennent de l'aire de vêlage pourraient avoir un risque plus élevé d'excrétion fécale que les animaux d'un troupeau avec le même score, mais dont la majorité du pointage provient de la section des taures ou des vaches adultes. Dans la première étude, nous avons dû classer les troupeaux dans deux catégories de risque. La valeur seuil utilisée pour le classement des troupeaux a été obtenue en analysant les

rappports de vraisemblance pour être un troupeau positif. Ces valeurs ont été obtenues en appliquant le score de risque à une base de données de 85 troupeaux à statut connu (25 troupeaux positifs et 60 troupeaux négatifs) d'un autre projet de notre groupe de recherche. Cette classification peut comporter des lacunes liées à la détermination du seuil et au nombre de troupeaux dans la base de donnée utilisée pour estimer les rapports de vraisemblance positifs. Une validation du score dans une base de données plus grande (par exemple la base de données du PVQPCP) serait souhaitable. Dans la première étude, en plus de l'impact du score global sur le risque d'excrétion fécale, nous avons évalué aussi l'impact des pratiques de régie spécifiques aux animaux le plus susceptibles à l'infection par MAP. Plus précisément, nous avons exploré dans nos modèles les questions individuelles des sections aire de vêlage, génisses non sevrées et génisses sevrées, étant donné leur importance épidémiologique et le fait qu'elles représentaient 83 % du score total au questionnaire. Les résultats des deux analyses (score global et par question) vont dans la même direction, mais l'analyse des questions individuelles nous a permis d'identifier des pratiques de régie précises associées à l'excrétion fécale individuelle de MAP dans les troupeaux laitiers en stabulation entravée au Québec : l'hygiène des vaches en préparation au vêlage et l'exposition des génisses avant sevrage aux vaches adultes ou leurs fèces.

Dû au devis de l'étude, le temps de suivi des deux cohortes n'était pas égal. Des censures (à gauche et à droite) du temps à risque ont été nécessaires afin d'équilibrer le temps à risque des deux cohortes. Une alternative qui aurait pu être utilisée pour équilibrer le temps à risque aurait été l'approche utilisée par Ferrouillet et al., 2009. Dans cet article, les auteurs ont exclu toutes les vaches nées plus de deux ans avant le début du programme (Ferrouillet, Wells et al. 2009). Si dans notre cas, on avait limité nos analyses aux vaches qui avaient environ deux ans au début de l'étude (2 à < 3 ans), le nombre d'animaux de la cohorte avant aurait diminué considérablement (229 vaches vs 919 avec l'approche utilisée dans l'étude). Également, le nombre d'événements observés dans la cohorte avant serait passé de 33 cas à 11 cas. Pour ce qui est de la cohorte après, le nombre d'animaux ($n=1041$) et le nombre de cas observés ($n=9$) n'auraient pas changé beaucoup par rapport à l'approche utilisée ($n=1239$ animaux; $n=11$ cas). Pour ce qui est du temps à risque, il serait de 396 vaches-année pour la cohorte avant (vs 2405 avec

l'approche utilisée dans notre étude) et de 1617 vaches-année pour la cohorte après (vs 2084 avec l'approche utilisée dans notre étude). Si on limite l'analyse aux vaches qui avaient environ deux ans au début de l'étude, le nouveau ratio des taux d'incidence est de 0,20 (IC 95 % : 0,07-0,53) vs 0,38 (IC 95 % : 0,17-0,78) avec l'approche utilisée dans notre étude. On peut constater que les résultats vont dans la même direction. Notre choix était basé sur le but d'équilibrer le temps à risque des deux cohortes plutôt que le nombre d'animaux dans les deux cohortes, pour cette raison des ajustements (censure à droite et troncature à gauche ont été effectuées). Une autre approche que nous avons explorée pour l'analyse était une étude de cas-témoins appariés. Tous les évènements observés dans l'étude ont été inclus comme cas et appariés par troupeau et âge à l'évènement avec des témoins choisis à partir de la population de non-cas en respectant un ratio de trois témoins par cas. L'association entre la cohorte et l'excrétion fécale individuelle de MAP a été évaluée en utilisant une régression logistique conditionnelle. Les résultats obtenus avec cette approche suggèrent une association statistiquement significative entre la naissance après l'adhésion de la ferme au PVQPCP et l'excrétion fécale de MAP détectée par une culture fécale positive (OR = 0,31; IC 95 %: 0,12-0,82). Par contre, cette approche est moins efficiente en termes d'utilisation de ressources étant donné le nombre réduit d'observations utilisées dans l'analyse.

7.2 Amélioration de l'identification des troupeaux laitiers infectés par MAP

D'abord, il est pertinent de faire un rappel sur la différence entre un test diagnostique et une stratégie de dépistage. Le test diagnostique vise à détecter ou quantifier l'agent causal, les signes cliniques, les lésions ou la réponse immunitaire chez un individu ainsi que le risque d'être infecté. Il peut être utilisé pour le diagnostic ou pour le dépistage selon le stade de la maladie. La stratégie de dépistage utilise les tests pour répondre à un objectif du troupeau plus précis et tient compte de facteurs tels que l'impact économique de la maladie, les coûts, la performance (sensibilité et spécificité) des tests, le type d'échantillon et la taille de l'échantillon.

Dans la deuxième étude, nous avons évalué la performance de la CPE pour la détection des troupeaux en stabulation entravée infectés par MAP. Nos résultats suggèrent que parmi les stratégies disponibles pour le dépistage de la PTB, la CPE est une alternative économique et non invasive pour déterminer la présence des infections à MAP dans les troupeaux laitiers en stabulation entravée. Selon les résultats de notre étude, les meilleurs sites de l'environnement étaient la fosse, l'écurie, le pool de vaches malades et le pool de vaches maigres. En utilisant cette stratégie, les coûts d'une série de prélèvements seraient équivalents aux coûts des prélèvements et analyses de 6 échantillons (échantillons en duplicata pour la fosse et l'écurie et un échantillon pour chaque pool de vaches). Le temps du prélèvement estimé pour ces 6 échantillons est d'environ 45 minutes (maximum 1 heure). Le prélèvement pourrait être effectué lors de la visite de troupeau réalisé par le médecin vétérinaire évitant les frais d'une visite supplémentaire. Dans notre étude, la valeur de sensibilité de la CPE pour deux séries de prélèvements était proche de la limite inférieure de l'étendue de valeurs rapportées dans d'autres études. Le coût réduit et le temps de prélèvements permettent d'utiliser la CPE à plusieurs reprises dans la même année pour augmenter la sensibilité de cette stratégie. Nos résultats montrent que les valeurs de sensibilité au niveau du troupeau des tests individuels étaient supérieures à celle de la CPE. Par contre, l'utilisation des tests individuels pour déterminer le statut d'un troupeau est moins pratique. Pour un troupeau moyen québécois, l'utilisation des tests individuels sur tous les animaux implique le prélèvement d'environ 60 vaches nécessitant probablement une visite additionnelle du médecin vétérinaire seulement pour le réaliser. Considérant que dans notre étude le temps estimé pour prélever un échantillon fécal individuel (incluant la confirmation visuelle du numéro d'identification de l'animal, étiquetage du contenant et prélèvement) était de 2-3 minutes, le médecin vétérinaire prendrait environ 2-3 heures pour prélever les échantillons de l'ensemble d'un troupeau moyen au Québec. Les coûts des analyses au laboratoire (culture bactérienne) des échantillons d'un troupeau de 60 vaches équivalent aux coûts de 10 séries de prélèvements de l'environnement chacun composé par 6 échantillons. Dans notre étude, l'ELISA a eu la meilleure sensibilité. Par contre, un des troupeaux considérés historiquement négatifs avait deux vaches séropositives (3,2 %). Même si le coût des analyses ELISA est inférieur aux coûts de la culture bactérienne, le

temps de prélèvement des échantillons sanguins à la ferme est semblable à celui des échantillons fécaux individuels. Le prélèvement et l'analyse des échantillons individuels de lait à l'aide du test ELISA pourrait être une option plus rapide et moins coûteuse que la culture bactérienne. De même, l'échantillon du lait de réservoir semble être une stratégie attirante en raison de la facilité de prélèvement et du coût, par contre les résultats de sensibilité de cette stratégie sont contradictoires (Stabel, Wells et al. 2002) et une grande variabilité des valeurs a été obtenue (Okura, Toft et al. 2012). Également, des résultats faux positifs peuvent être rapportés avec le test ELISA à cause des réactions croisées avec des Mycobactéries environnementales (Osterstock, Fosgate et al. 2007). Le consensus des experts suggère que la CPE est la stratégie qui donne le meilleur rapport coût-efficacité pour déterminer le statut des troupeaux (Sweeney, Collins et al. 2012). Par contre, les études qui confirmaient cela avaient été réalisées notamment dans des troupeaux en stabulation libre avec une prévalence de la maladie de modérée à élevée. À notre connaissance, la deuxième étude est la seule étude réalisée exclusivement dans des troupeaux en stabulation entravée. Nos résultats confirment que les sites d'accumulation de fumier utilisés normalement pour la détection des troupeaux en stabulation libre sont aussi efficaces pour la détection des troupeaux en stabulation entravée. Un autre site utilisé dans les troupeaux en stabulation libre est la salle de traite ou salle d'attente. Il a été suggéré que les échantillons collectés de sites où le fumier est bien mélangé et humide sont plus adéquats pour l'isolement de MAP (Wolf, Barkema et al. 2015). La salle de traite n'existe pas dans les troupeaux en stabulation entravée. De plus, les échantillons de l'écurie d'un troupeau en stabulation entravée peuvent contenir des quantités importantes de litière et par conséquent, être moins homogènes et plus secs. Ces différences justifient l'évaluation de la CPE dans le contexte québécois où la plupart des troupeaux sont des troupeaux en stabulation entravée. La taille et le type de stabulation des troupeaux de notre étude sont représentatifs des troupeaux du Québec. De plus, les troupeaux participants sont des troupeaux à faible prévalence ce qui diffère des études précédentes. La CPE évaluée dans la deuxième étude est une méthode efficace pour détecter notamment les troupeaux laitiers les plus fortement infectés (ceux dans lesquels l'impact de la PTB pourrait être plus important). Cependant, nos résultats suggèrent que

cette stratégie pourrait aussi identifier les troupeaux à faible prévalence particulièrement si elle est instaurée comme une stratégie de dépistage annuel ou biannuel régulier.

Une des limites de l'étude deux est la taille de notre échantillon. L'effet de la taille de l'échantillon se reflète dans l'amplitude de nos intervalles de confiance et pourrait être une des raisons pour ne pas avoir observé des différences entre les trois tests évalués. Même si nous avons observé une augmentation de la sensibilité de la CPE lorsque deux échantillonnages consécutifs ont été analysés au lieu d'un échantillonnage, notre taille d'échantillon ne nous a pas permis de trouver une différence statistiquement significative entre les estimés obtenues en analysant un échantillonnage *vs* deux échantillonnages. Lorsque les résultats de deux échantillonnages à des moments différents sont combinés, les valeurs de sensibilité de la CPE de notre étude sont dans l'étendue de valeurs rapportées dans la littérature (Pillars, Grooms et al. 2009; Smith, Schukken et al. 2011; Lavers, McKenna et al. 2013). Par contre, la sensibilité de la CPE est moindre si seulement un échantillonnage est considéré. Il est attendu que la répétition des prélèvements augmente la performance de la CPE pour le dépistage des troupeaux. Pour ce qui est de la sensibilité de la CPE, deux études canadiennes ont rapporté des valeurs plus élevées (entre 68 % et 71 %) lorsqu'elle est réalisée 4 fois par an (Lavers, McKenna et al. 2013; Wolf, Barkema et al. 2014). Également, l'obtention de résultats négatifs dans des prélèvements consécutifs augmente la certitude pour un troupeau d'avoir une très faible prévalence ou d'être négatif à MAP (Collins, Gardner et al. 2006). Dans notre étude, les troupeaux dans lesquels tous les échantillons de l'environnement étaient négatifs lors de deux prélèvements consécutifs étaient plus susceptibles de ne pas avoir des vaches excrétaant le MAP. Cependant, un résultat négatif à la CPE n'est pas une garantie que le troupeau est exempt de la PTB. Dans une étude, des résultats négatifs à la CPE étaient obtenus dans des troupeaux où la prévalence était inférieure ou égale à 2 % (Pillars, Grooms et al. 2009).

Même si les valeurs de sensibilité observées dans la deuxième étude se trouvent dans l'étendue des valeurs rapportées dans la littérature, on s'attendait à avoir des estimés de sensibilité plus élevées. La sensibilité de la CPE dépend de la prévalence à l'intérieur du troupeau (Pillars, Grooms et al. 2009; Lavers, McKenna et al. 2013). Elle est plus élevée dans les troupeaux à prévalence moyenne et élevée (Pillars, Grooms et al. 2009), par

exemple près de 100 % lorsque la prévalence est égale ou supérieure à 8 % (Lavers, McKenna et al. 2013). La prévalence de la maladie dans les troupeaux participants à la deuxième étude a pu affecter la valeur de la sensibilité de notre stratégie. Les troupeaux participants, considérés infectés, étaient des troupeaux majoritairement à faible prévalence sélectionnés en fonction de leur souhait de collaborer dans les projets de recherche. Ces producteurs ont adhéré au PVQPCP entre un et quatre ans avant le début de l'étude. Également, il est possible que ces producteurs motivés soient plus conscients de la PTB. Le fait d'être inscrits dans le PVQPCP pendant plusieurs années signifie que ces troupeaux ont bénéficié de plusieurs recommandations du médecin vétérinaire visant à réduire la transmission de MAP (rappel annuel par le médecin vétérinaire).

Une autre limite de l'étude deux pourrait être que la définition de cas d'un troupeau « infecté » comprenait l'isolement de MAP dans au moins un échantillon individuel ou de l'environnement dans les 24 mois avant l'étude ou pendant l'étude. Le fait d'inclure dans notre définition de cas des résultats aux tests évalués (cultures fécales) peut avoir un impact sur les valeurs obtenues de sensibilité. Ce biais est connu comme *Incorporation biais*. L'impact de ce biais est une surestimation des valeurs obtenues (Worster and Carpenter 2008). Une alternative pour notre définition de cas aurait pu être d'inclure comme troupeaux « infectés » des troupeaux où des cas cliniques de PTB avaient été observés. La difficulté avec ce critère est que les animaux positifs à MAP souvent disparaissent avant l'apparition des signes cliniques (Goodell, Hirst et al. 2000). De plus, les signes cliniques ne sont pas spécifiques à 100 %.

L'échantillonnage de notre étude confirme que les échantillons des sites d'accumulation du fumier, fréquemment utilisés pour identifier les troupeaux en stabulation libre infectés par MAP (Raizman, Wells et al. 2004; Berghaus, Farver et al. 2006; Lombard, Wagner et al. 2006; Wolf, Barkema et al. 2015), sont aussi adéquats pour détecter les troupeaux en stabulation entravée. Les échantillons des sites d'accumulation du fumier dans les troupeaux ont vraisemblablement plus de chances d'être positifs à la culture de MAP (Wolf, Barkema et al. 2015). De plus, d'autres sites d'échantillonnage s'avèrent intéressants dans notre étude. Nous avons isolé le MAP à partir des échantillons des bottes du propriétaire ou du collecteur (membre du groupe de recherche qui réalisait les prélèvements), des échantillons poolés de vaches malades, des

échantillons poolés de vaches avec un faible état de chair et à partir des échantillons de l'aire des génisses.

L'échantillonnage des bottes du collecteur a été suggéré comme un prélèvement additionnel dans la stratégie de dépistage de MAP à partir des prélèvements de l'environnement (Eisenberg, Wolter et al. 2013; Donat, Hahn et al. 2016). Les échantillons des bottes du collecteur sont déjà utilisés pour la détection de *Salmonella* Enteritidis chez la volaille (Arnold, Arnold et al. 2010). Une étude considérait que l'échantillonnage des bottes du collecteur pourrait augmenter la sensibilité de la CPE pour l'identification des troupeaux infectés (Eisenberg, Wolter et al. 2013). De plus, l'isolement de MAP dans les échantillons des bottes (du collecteur ou producteur) confirme l'importance des mesures de biosécurité à la ferme. La désinfection des bottes est une mesure de contrôle importante tant pour le personnel de la ferme que pour les visiteurs. Cette mesure est cruciale lorsque des animaux de différents groupes d'âge sont visités par la même personne, afin d'éviter qu'elles deviennent un vecteur de dissémination de MAP. Il faut donc demeurer vigilant avant de recommander ce prélèvement pour culture. En effet, on ne voudrait pas devenir le vecteur de la transmission pendant une procédure diagnostique.

L'échantillonnage ciblant des vaches susceptibles d'être infectées a été suggéré pour le dépistage des troupeaux de bovins de boucherie (Collins, Gardner et al. 2006). Dans notre étude, nous avons inclus un échantillon poolé de vaches atteintes de n'importe quelle maladie (sauf de la PTB) au moment de la visite et un autre échantillon poolé des vaches avec un faible état de chair. Ces 2 échantillons poolés nous ont permis de détecter une ferme pour laquelle aucun des autres échantillons de l'environnement prélevés dans la même visite n'étaient positifs. Les échantillons poolés des vaches malades ou maigres peuvent être prélevés facilement par le médecin vétérinaire pendant la visite préventive du troupeau sans une manipulation additionnelle des animaux.

Selon les résultats de notre étude, l'inclusion de l'échantillonnage de l'aire des génisses ne semble pas augmenter la sensibilité de la technique étant donné que MAP a été isolée seulement une fois à partir de ce site. Cet échantillon positif provenait du troupeau avec la prévalence à la culture fécale individuelle la plus élevée de l'étude. Ce résultat est en accord avec d'autres études qui confirment que les veaux peuvent être

exposés et même excréter le MAP (Bolton, Pillars et al. 2011; Mortier, Barkema et al. 2014; Wolf, Orsel et al. 2015).

Notre étude suggère qu'une combinaison des échantillons des endroits d'accumulation du fumier dans la ferme (écurer et fosse) avec des échantillons poolés des vaches maigres et/ou malades pourrait être une stratégie efficace pour détecter les troupeaux en stabulation entravée infectés par MAP.

La CPE comporte des avantages par rapport aux tests individuels pour la détermination du statut de troupeau. C'est une technique économique et non invasive qui mesure aussi la persistance de MAP dans l'environnement de la ferme (Pillars, Grooms et al. 2009). Dans notre étude, nous avons observé, dans un même troupeau, la présence des résultats positifs à la CPE en absence d'échantillons fécaux individuels positifs. Des résultats semblables ont été également observés dans d'autres études (Lombard, Wagner et al. 2006; Lavers, McKenna et al. 2013). L'absence de résultats positifs aux cultures fécales individuelles au même moment que la CPE s'avère positive peut être expliquée par des animaux excréteurs intermittents (Nielsen 2008) ou par la réforme des animaux positifs avant les prélèvements individuels. La CPE profite donc de la capacité de MAP de survivre en dehors de son hôte pour détecter des troupeaux dans lesquels les animaux infectés ont été réformés ou même si les animaux excréteurs sont intermittents. Ceci est un avantage important par rapport à n'importe quelle méthode diagnostique utilisée sur les individus, le jour du prélèvement. Le choix du test diagnostique et de la stratégie de dépistage dépend des objectifs du producteur et du médecin vétérinaire. Dans le contexte du PVQPCP, où l'objectif est la détection des troupeaux à prévalence élevée, la CPE semble être la meilleure alternative de dépistage. L'utilisation des tests individuels afin de déterminer le statut du troupeau est une alternative plus coûteuse, plus invasive et qui requière plus de temps de prélèvement que la CPE. Ces tests diagnostiques individuels sont plus utiles pour identifier des animaux infectés dans les troupeaux positifs. Le dépistage des animaux dans le contexte d'un programme de contrôle devrait être accompagné idéalement par une restriction au commerce des animaux positifs afin d'éviter la dispersion de la maladie à d'autres troupeaux. Dans le PVQPCP, lors de l'adhésion les producteurs s'engagent à ne pas vendre les animaux positifs aux tests pour la PTB dans les encans ou à d'autres producteurs. Les animaux positifs peuvent être

vendus seulement à l'abattoir. Par contre, il n'y a pas de politiques concernant l'introduction d'animaux dans les troupeaux dans le PVQPCP.

La surcroissance microbienne est un phénomène du processus de culture fécale qui peut nuire la croissance de MAP (Katayama, Tanaka et al. 2000). De plus, l'identification de MAP par des méthodes PCR est plus compliquée en présence de surcroissance microbienne (Whittington 2009). Par conséquent, ce phénomène peut affecter la sensibilité de la culture bactérienne. Dans les cas des échantillons issus de l'environnement, la présence de résultats NI (donc affectés par la surcroissance microbienne) peut rendre difficile l'identification des troupeaux positifs, car un statut de troupeau ne peut être déterminé avec confiance. Dans une autre étude évaluant la CPE, la surcroissance microbienne a été observée dans environ 16 % des cultures (Donat, Kube et al. 2015). Les auteurs suggéraient un impact de la température de l'environnement au moment du prélèvement sur le nombre de résultats NI (plus de résultats NI dans la saison chaude que dans la saison froide; Donat, Kube et al. 2015). Obtenir des résultats NI peut être frustrant pour les médecins vétérinaires, les laboratoires et les producteurs en raison de l'impossibilité de déterminer un statut avec certitude malgré un long processus au laboratoire et les coûts associés.

L'utilisation d'une méthode PCR pour déterminer le statut des échantillons de l'environnement déclarés NI est une alternative pour améliorer la capacité de détection de la CPE. Cette alternative a été évaluée dans la troisième étude. Dans cette étude, la PCR a identifié de l'ADN de MAP dans un échantillon de l'environnement déclaré NI au préalable. Nous croyons que cet échantillon est un vrai positif. Il a été positif à la PCR réalisée avant l'incubation, positif à la coloration AAR et positif à la PCR confirmatoire. De plus, cet échantillon provenait d'un troupeau positif à MAP, avec une forte prévalence et dans lequel d'autres échantillons prélevés à la même visite se sont avérés positifs. Si l'ADN de MAP est dans l'échantillon, la PCR devrait être en mesure de le détecter, mais il faut considérer également que la PCR peut avoir donné des résultats faussement négatifs parmi les échantillons NI. En effet, il a été suggéré que les inhibiteurs présents dans un échantillon peuvent affecter la performance des méthodes PCR, car ils changent les propriétés chimiques des acides nucléiques (Schrader, Schielke et al. 2012; Acharya, Dhand et al. 2017). Le type d'inhibiteurs présents dans un échantillon varie selon le type

d'échantillon analysé. Les polysaccharides sont plus fréquemment trouvés dans les échantillons fécaux tandis que les échantillons de l'environnement peuvent contenir des protéines, polyphénols, polysaccharides, ions de métal, RNases et les acides humique et fulminique (Ijzerman, Dahling et al. 1997; Rock, Alum et al. 2010). L'utilisation de la PCR pour déterminer le statut des échantillons NI contribue à améliorer la détection des troupeaux positifs. Elle nous a permis de récupérer un échantillon positif parmi les NI, mais surtout d'éliminer le statut NI des autres 61 échantillons NI de l'étude avec un degré de confiance élevé.

Récemment, des alternatives pour faire face aux résultats NI ont été proposées (Rangel, Arango-Sabogal et al. 2017) (Annexe 2). Pour ce qui est des échantillons NI issus de l'environnement, l'utilisation d'une méthode PCR pour confirmer leur statut est une option intéressante malgré le faible pourcentage d'échantillons positifs qui pourraient être récupérés. Un résultat positif à la PCR indique la présence de MAP dans la ferme et justifie la mise en place de mesures de contrôle. Le scénario peut être différent s'il s'agit des échantillons individuels. Dans une étude réalisée par notre groupe de recherche, nous avons évalué la surcroissance microbienne avec une perspective différente de celle de la troisième étude: en utilisant des échantillons individuels (Rangel, Arango-Sabogal et al. 2017) (Annexe 2). L'objectif de cette étude était d'estimer le pourcentage d'échantillons positifs à la PCR réalisé sur le milieu de culture incubé des échantillons individuels déclarés NI. Dans cette étude, l'ADN de MAP a été identifié dans 2,7 % des échantillons NI (7 sur 262) et dans 1,1 % des échantillons négatifs (1 sur 88). Tous les échantillons NI s'avérant positifs à la PCR provenaient de troupeaux dans lesquels > 30 % des échantillons individuels avaient été déclarés NI. L'échantillon positif à la PCR parmi les échantillons négatifs provenait d'un troupeau présumé négatif pour MAP (Rangel, Arango-Sabogal et al. 2017) (Annexe 2). Dans le cas des échantillons individuels, réaliser la PCR ne serait pas une option intéressante en raison des coûts associés. Un échantillon individuel positif à la PCR indiquerait la présence de l'ADN de MAP, mais ne refléterait pas nécessairement le statut d'infection de l'animal. Le phénomène des excréteurs passifs (« pass through ») décrit pour la culture bactérienne s'applique probablement aussi pour les résultats positifs à la PCR dans les fèces. De plus, ce phénomène pourrait être plus fréquent pour la PCR que pour la culture quand on prend en compte la sensibilité faible

de la culture. En effet, la probabilité de trouver de l'ADN de MAP dans les fèces d'une vache non infectée logée dans un environnement hautement contaminé avec du MAP pourrait être plus élevé que la probabilité de trouver du MAP vivant (culture fécale positive). La meilleure option pour faire face aux résultats NI des échantillons individuels dépend du contexte. Dans un contexte de recherche, le meilleur choix semble être de les déclarer négatifs étant donné qu'un faible pourcentage des échantillons serait faussement déclaré négatif (environ < 3 %; Rangel, Arango-Sabogal et al. 2017) (Annexe 2). Par contre, dans le contexte d'un troupeau qui fait des efforts pour contrôler la PTB et qui obtient un pourcentage élevé de résultats NI, la meilleure option semble être de réaliser la PCR sur les échantillons NI afin de déterminer la présence de l'ADN de MAP. La répétition des analyses chez les animaux positifs à la PCR au fil du temps pourrait contribuer à déterminer si l'ADN détecté dans l'échantillon signifie une infection de l'animal ou un processus d'excrétion passive. On comprend que l'ajout de la PCR en plus de la culture additionne les coûts des deux techniques.

Dans le processus de culture de MAP réalisé au LÉAQ, trois étapes en série sont effectuées et doivent être positives avant d'émettre le résultat positif à la culture bactérienne. Ces étapes sont l'incubation dans un système automatisé, la réalisation de lames pour coloration AAR et la PCR. Dans la troisième étude, nous avons décidé de réaliser la PCR peu importe le résultat à la coloration AAR. Nous avons observé que chaque échantillon négatif à la coloration était négatif à la PCR. De plus, nous avons constaté que 96 % des échantillons positifs à la coloration étaient suivis par un résultat positif à la PCR. Nous avons fait aussi une analyse rétrospective des résultats aux trois étapes du processus de culture (incubation, coloration AAR et PCR) pour les échantillons individuels et de l'environnement ayant un résultat positif à l'incubation, qui ont été traités au laboratoire entre 2011 et 2014. Le résumé de cette analyse est présenté dans les Annexes 3 (culture fécale individuelle) et 4 (échantillons issus de l'environnement). Cette analyse nous a permis de constater encore une fois l'importance de l'interprétation des lames pour coloration AAR dans le processus de culture. Lorsque le commentaire « belle lame » est utilisé pour qualifier une lame, la PCR n'ajoute pas d'information additionnelle, car presque tous les échantillons donnent un résultat positif à la PCR. Par contre, l'utilisation de la PCR devient intéressante lorsqu'un commentaire suggestif de la

présence de contaminants est fait à la lecture de la lame. Les résultats de la troisième étude et l'analyse des résultats de la banque du laboratoire nous permettent de conclure que la lame pour coloration AAR réalisée sur le milieu de culture après l'incubation et par du personnel technique bien entraîné est une méthode économique pour confirmer les échantillons positifs à l'incubation. Le fabricant du système automatisé et du milieu de culture suggère de réaliser une des deux méthodes (coloration AAR ou PCR) pour confirmer les échantillons positifs à l'incubation, ce qui est en accord avec nos observations. Étant donné que le coût des analyses d'un échantillon positif à MAP est d'environ 47 \$ (17 \$ incubation et coloration + 30 \$ PCR confirmatoire), utiliser seulement la coloration AAR pourrait être une option moins coûteuse, mais qui requiert plus de temps par rapport à la PCR. Une autre option pourrait être de réaliser une PCR directe sur les échantillons fécaux et réaliser une culture bactérienne sur les échantillons négatifs à la PCR. Cette option permet de réduire le coût des échantillons positifs (30 \$ de la PCR vs 47 \$ de l'incubation, coloration AAR et PCR confirmatoire). Par contre, les coûts des échantillons négatifs augmentent à 30 \$ (coût de la PCR directe) vs 17 \$ (coût de l'incubation et la coloration AAR; on ne réalise pas la PCR sur ces échantillons normalement). Dans un contexte où la prévalence est élevée, cette option permettrait de diminuer les coûts du dépistage, car la plupart des échantillons seraient positifs (alors détectés avec la PCR directe à un coût de 30 \$ chacun) et un moindre nombre d'échantillons seraient négatifs (alors mis en culture bactérienne à un coût additionnel de 17 \$). Par contre, si la prévalence est faible comme dans le contexte du Québec (Côté 2003; MAPAQ 2012), cette stratégie augmenterait les coûts du dépistage, car peu d'échantillons seraient positifs (alors détectés par la PCR directe) et la plupart seraient négatifs (alors mis en culture bactérienne à un coût de 47 \$ chacun).

7.3 Enjeux et défis liés à la réalisation d'une étude longitudinale de 5 ans

La réalisation des études longitudinales représente des enjeux et défis liés au coût, au personnel et au temps investi. Les critères d'inclusion des troupeaux participants dans notre étude étaient le statut positif à MAP, la stabulation entravée, les visites de troupeau préventives régulières et l'accès aux données de santé. De plus, pour un suivi de cinq ans,

il est nécessaire de considérer dans les critères d'inclusion le souhait et la motivation des producteurs de collaborer (nous recevoir une fois par an, transfert des données de santé, etc.) pendant toute la durée du projet. Par conséquent, les troupeaux ont été sélectionnés par convenance parmi les troupeaux inscrits dans le PVQPCP. La validité externe de nos résultats est donc limitée étant donné que la sélection des troupeaux participants n'a pas été réalisée de façon aléatoire. Le souhait de collaborer dans les projets de recherche est une des caractéristiques qui différencient les troupeaux participants dans notre étude des troupeaux québécois inscrits dans le PVQPCP. Par contre, les troupeaux de notre étude sont représentatifs des troupeaux laitiers québécois en termes de la taille (dans notre étude : 57 vaches en moyenne; au Québec : 64 vaches en moyenne) et du type de stabulation (Groupe AGÉCO 2013).

Une fois qu'un producteur accepte de participer dans une étude longitudinale, on fait face à un autre défi : garder la motivation des producteurs et des médecins vétérinaires au fil du temps. Dans notre étude, trois troupeaux positifs ont quitté l'étude après la première année. Les raisons précises pour deux de ces troupeaux n'étaient pas connues. Parmi eux, un troupeau était positif à la culture de l'environnement (6 échantillons positifs sur 9) et des tests individuels étaient positifs chez des vaches achetées (culture fécale individuelle : 2/56). L'autre troupeau était positif à la culture de prélèvements de l'environnement (1 échantillon sur 6), mais aucun test individuel ne s'avérait positif. Pour le troisième troupeau, le producteur ne trouvait pas nécessaire de continuer dans l'étude étant donné que MAP n'avait pas été isolé sur sa ferme pendant l'étude malgré le statut positif de troupeau déterminé en 2009 dans le PVQPCP. Les abandons des troupeaux participants pourraient affecter la puissance d'une étude longitudinale. Dans la première étude, nous avons estimé avoir besoin d'un minimum de 588 animaux par cohorte. Le recrutement des troupeaux positifs a continué au-delà de ce chiffre pour tenir compte des réformes (environ 30 % des animaux annuellement). Les trois troupeaux qui se sont retirés après la première année ont été remplacés par deux nouveaux troupeaux enrôlés en 2012. L'ajout de ces troupeaux a causé un décalage par rapport aux autres troupeaux de l'étude, mais c'était la solution afin de maintenir l'objectif de 588 sujets par cohorte. En général, nous considérons que la participation des troupeaux dans la première étude a été adéquate, étant donné que parmi les 21 troupeaux initialement enrôlés, la plupart (14 troupeaux) ont

complété au moins quatre des cinq visites de prélèvements (11 troupeaux ont complété les cinq visites de prélèvements et trois troupeaux ont complété quatre visites). Étant donné la chronicité de la PTB, un suivi inférieur à quatre ans n'est pas adéquat pour évaluer l'impact de mesures de prévention sur l'incidence. Dans notre étude, environ 20 % des troupeaux ont complété trois ans de suivi au maximum (dont deux troupeaux ont complété seulement deux visites). On pourrait penser que parmi les vaches de ces quatre troupeaux, des événements auraient été observés si ces troupeaux avaient complété les cinq visites (notamment chez les vaches de la cohorte après). On croit que cela est peu probable considérant que la prévalence observée dans ces troupeaux pendant leur participation à l'étude était égale à zéro. De plus, aucun des troupeaux de l'étude n'avait une prévalence supérieure à zéro pour la première fois au quatrième prélèvement. Nous avons exploré l'impact de ces quatre troupeaux sur nos valeurs d'incidence et HR. L'inclusion des données de ces troupeaux dans l'étude occasionne très peu de changements sur l'incidence (IR de notre étude=0,38; IC 95 % : 0,17-0,78 vs IR sans ces quatre troupeaux=0,33; IC 95 % : 0,15-0,67) et le HR des cohortes (HR de notre étude=0,48; IC 95 % : 0,23-0,98 vs HR sans ces quatre troupeaux=0,41; IC 95 % : 0,21-0,83). Les valeurs d'incidence et HR obtenues avec notre approche (inclure les données de ces quatre troupeaux) sont plus conservatrices.

L'implication et la formation des médecins vétérinaires sont essentielles pour la réussite des programmes de contrôle (Barker, Barkema et al. 2012). Leur participation et implication contribuent à améliorer le recrutement, à augmenter la crédibilité du programme et facilitent la communication avec les producteurs. En 2014, un des troupeaux voulait quitter l'étude, car il considérait qu'aucun bénéfice n'était lié à sa participation. Le médecin vétérinaire a convaincu le producteur de continuer et lui a expliqué les avantages liés à sa participation. Dans ce cas anecdotique, l'intervention du médecin vétérinaire a permis de maintenir la participation du troupeau. Les programmes à travers le monde reconnaissent que la collaboration entre les médecins vétérinaires et les producteurs est la clé du succès des programmes de prévention et contrôle (*International Association for Paratuberculosis* 2014). Les efforts de transfert de connaissances des médecins vétérinaires ne doivent pas être concentrés seulement à informer les producteurs sur les aspects techniques du contrôle de la PTB, mais à

influencer positivement leurs perceptions sur l'importance des mesures suggérées (Ritter, Jansen et al. 2016). Les perceptions défavorables sur la prévention et le contrôle sont les principaux freins à la mise en place des mesures dans les programmes de contrôle (Ritter, Jansen et al. 2016). Les médecins vétérinaires sont donc les professionnels de choix pour atteindre cet objectif grâce à leur proximité et crédibilité auprès du producteur. Parallèlement à notre étude, nous avons fait des efforts pour garder l'intérêt des médecins vétérinaires collaborateurs à travers la réalisation des bulletins trimestriels sur la PTB et avec la tenue de rencontres annuelles d'information sur les projets de recherche en 2013, 2014 et 2015. Les bulletins trimestriels « InfoPARATUB » (Annexe 5) étaient un moyen pour partager nos résultats préliminaires et les derniers développements au sujet de la maladie dans le monde. Aussi, des articles scientifiques avec une application pratique étaient présentés. La collaboration des médecins vétérinaires tout au long de l'étude était indispensable. Ils étaient le pont entre l'équipe de recherche et les producteurs pour le transfert d'information (disponibilité des producteurs, dossiers de santé, résultats des tests et questionnaires). Nous considérons que la collaboration des médecins vétérinaires tout au long de l'étude était adéquate étant donné le peu de données manquantes observées.

Démontrer la valeur des mesures de prévention pour une maladie comme la PTB n'est pas facile. Lorsqu'un troupeau est positif à la PTB, la majorité des pertes économiques associées à son statut sont observées dans le moyen à long terme quand les animaux infectés deviennent moins productifs une fois adulte. Ces pertes (faible performance) sont en fait un manque à gagner plutôt qu'une dépense, par exemple en traitements ou services vétérinaires, comme c'est le cas pour d'autres maladies. Démontrer la valeur des mesures de prévention est encore plus difficile pour les troupeaux à statut positif dans lesquels aucun échantillon positif n'est pas obtenu lors des prélèvements. Il faut remarquer que le fait de ne pas avoir des résultats positifs dans un troupeau dans lequel MAP avait été isolé ne veut pas nécessairement dire que le troupeau est exempt. Il serait prudent de dire que ce troupeau est à faible prévalence. Par conséquent, les mesures préventives devraient être maintenues afin d'éviter que la prévalence augmente dans ce troupeau. Le producteur pourrait penser que ces mesures ne sont plus nécessaires. Par contre, il est probable que les troupeaux à faible prévalence ont déjà en place plusieurs des mesures de prévention qui réduisent la transmission de MAP.

On pourrait penser que pour ces troupeaux (qui font déjà les choses bien), la participation dans un programme de prévention et contrôle n'ajoute pas à la réduction de la prévalence de PTB. En d'autres mots, ces troupeaux ont déjà leur propre programme de prévention et contrôle en place. Cette perception peut affecter la motivation d'un producteur de demeurer dans un programme de contrôle ainsi que l'observance des mesures de contrôle suggérées dans le programme au fil du temps. Il a été suggéré que la motivation et l'observance des producteurs étaient négativement affectées par le nombre d'années de participation dans les programmes et par l'obtention de résultats négatifs consécutifs (Wolf, Barkema et al. 2015). Nous avons constaté cela dans notre étude. Dans les quatre troupeaux qui ont complété moins de quatre séries de prélèvements, aucun échantillon positif n'a été identifié. Augmenter la participation notamment pour les troupeaux à faible prévalence, garder l'intérêt pour le programme au fil du temps et démontrer la valeur de la prévention (des programmes) dans les troupeaux potentiellement infectés, mais dans lesquels il n'y a pas d'évidence clinique ou perte économique mesurable, ont été identifiés parmi les défis des programmes de contrôle dans le monde (*International Association for Paratuberculosis* 2014). L'importance de la participation de ces troupeaux dans un programme de prévention et contrôle (ainsi que le dépistage pour suivre le statut) peut être justifiée lorsqu'on parle de l'achat et/ou l'introduction d'animaux de remplacement. Un des défis du contrôle de la PTB est de déterminer le statut des animaux avant leur introduction dans un troupeau, car les tests diagnostiques disponibles ne sont pas parfaits. Un des piliers de certains programmes de prévention et contrôle de la PTB réussis dans le monde est d'assurer que le commerce d'animaux se fait selon le risque de transmission des troupeaux. Par exemple en Australie (Citer and Sergeant 2014), acheter les animaux de remplacement à partir d'un troupeau avec un risque de transmission égal ou inférieur à celui du troupeau acheteur fait partie des règles à suivre. La participation des troupeaux dans les programmes de prévention et leur dépistage permettent aux troupeaux de gagner une certitude envers leur statut. Cela pourrait être utile pour réduire la transmission entre troupeaux.

7.4 Perspectives futures

Comme discuté précédemment, la suite logique de cette thèse serait l'évaluation du programme de prévention et contrôle à l'échelle du troupeau. Pour ce faire, trois scénarios sont possibles. Le premier scénario consisterait à comparer la prévalence/incidence des troupeaux inscrits au PVQPCP avec celles des troupeaux non inscrits dans le programme. La difficulté de cette approche est l'inclusion dans l'étude des troupeaux non inscrits dans le PVQPCP. On pourrait penser que ces troupeaux seront plus difficiles à recruter pour un projet de recherche. Il pourrait y avoir moins d'intérêt pour ces producteurs de participer à l'étude au fil du temps. Le deuxième scénario pourrait être de comparer des troupeaux inscrits dans le PVQPCP mais avec des risques d'introduction et de transmission de MAP (mesuré en utilisant le score au questionnaire développé dans l'étude de cohorte) ou des prévalences différentes. Par exemple, on pourrait faire deux groupes de troupeaux : risque/prévalence faible vs risque/prévalence élevée et les suivre au fil du temps. Par la suite, on pourrait demander aux producteurs de s'engager à mettre en place certaines pratiques de régie dans leur troupeau. Cette approche entraîne des coûts élevés liés au suivi des troupeaux notamment ceux à risque/prévalence faible. Il est probable que ces troupeaux ont déjà en place des mesures de prévention et qu'ils n'obtiennent pas de bénéfices additionnels en participant à un programme de contrôle. Une étude a estimé que le bénéfice net pour les troupeaux participant à un programme de prévention et contrôle est plus élevé que celui des troupeaux non participants (74 \$ par vache par 10 ans en moyenne). Cette même étude a conclu que le bénéfice net des troupeaux augmente avec la prévalence, par exemple pour un troupeau avec une prévalence de 3 % le bénéfice net est d'environ 300 \$ par vache par 10 ans (Wolf, Clement et al. 2014). D'autres études ont suggéré des pertes (bénéfice net négatif) pour les troupeaux en absence d'un programme de contrôle (Pillars, Grooms et al. 2009; Smith, Al-Mamun et al. 2017). L'impact de l'adhésion d'un troupeau sans pertes économiques liées à la PTB à un programme de contrôle est difficile à estimer et justifier. On pourrait penser que la prévalence dans ces troupeaux n'augmentera pas grâce aux pratiques déjà en place. La plus-value d'être inscrit dans un programme de contrôle pour ces troupeaux se justifie par la prévention d'autres maladies entériques et par la

détermination d'un statut de troupeau et d'un niveau de risque pour la l'achat et vente d'animaux (Wolf, Clement et al. 2014). Le troisième scénario pourrait être de cibler les troupeaux à risque d'introduction et de transmission de MAP ou prévalences élevées. Par la suite, on pourrait demander aux producteurs de s'engager à mettre en place certaines pratiques de régie dans leur troupeau. Finalement, l'évolution de la prévalence/incidence à l'échelle du troupeau pourrait être mesurée au fil du temps. L'un de ces trois scénarios semble la suite logique de cette thèse. Il faut considérer que le nombre de troupeaux qui devrait être recrutés pourrait être très élevé afin d'avoir une puissance suffisante pour observer des différences statistiquement significatives. Celle-ci a été identifiée souvent comme une des limitations pratiques pour la réalisation des études à l'échelle du troupeau (Dohoo, Martin et al. 2009). De plus, la réalisation de ces études entraîne des coûts élevés associés aux prélèvements dans les troupeaux. Un autre facteur important est de garantir l'observance des producteurs au fil du temps envers les pratiques recommandées. Pour ces études, les pratiques recommandées devraient être les mêmes pour tous les troupeaux participants (sauf pour le premier scénario). Par contre, cela pourrait menacer la mise en place des pratiques si les producteurs considèrent que les recommandations effectuées ne sont pas en accord avec leurs priorités et objectifs. Les experts dans les programmes de prévention et contrôle dans le monde s'entendent sur le fait que les stratégies de contrôle doivent être adaptées aux ressources et doivent satisfaire les objectifs des producteurs (*International Association for Paratuberculosis* 2014).

D'autres études pourraient constituer également la suite de cette thèse et apporter de l'information pour combler des lacunes dans les connaissances scientifiques (Barkema, Orsel et al. 2017) sur l'amélioration de la détection des troupeaux positifs à MAP. En analysant l'ensemble des données recueillies dans différents projets de recherche de notre groupe, des éléments de réponse à ces lacunes pourraient être énoncés. Pour d'autres questions, des prélèvements additionnels et de futurs projets devront être réalisés. Les prochaines étapes pourraient être : 1) l'optimisation du score de risque (développé pour l'étude de cohorte) pour déterminer le statut à MAP des troupeaux québécois (données déjà disponibles); 2) l'estimation de la sensibilité et de la spécificité de la culture fécale en milieu liquide à l'aide d'une analyse de classe latente (données déjà disponibles); 3) l'évaluation de la PCR directe sur les échantillons issus de l'environnement pour la

détection des troupeaux positifs à MAP; 4) l'évaluation de la corrélation entre la culture de prélèvements de l'environnement et la prévalence à la culture fécale individuelle à l'intérieur du troupeau (données déjà disponibles); 5) améliorer la compréhension du phénomène de surcroissance microbienne en décrivant les caractéristiques de croissance des échantillons NI au laboratoire (données déjà disponibles); et 6) l'amélioration du protocole de décontamination des échantillons fécaux.

7.4.1 Optimisation du score de risque

Dans le cadre de l'étude 1, le questionnaire du PVQPCP a été utilisé pour déterminer le risque d'introduction et de transmission de MAP dans les troupeaux. Afin de pouvoir classer les troupeaux, nous avons dû transformer ce questionnaire qui était qualitatif à quantitatif. Un score a été développé en nous inspirant des questionnaires quantitatifs des programmes de contrôle des États-Unis et de l'Ontario. Ce score a été attribué aux troupeaux d'une autre étude de notre groupe de recherche afin d'obtenir les rapports de vraisemblance pour être un troupeau positif qui nous ont permis de classer les troupeaux dans deux catégories : risque faible et risque élevé. Le choix du seuil du score utilisé pour dichotomiser cette variable peut affecter sa performance (sensibilité et spécificité) pour déterminer le statut d'un troupeau. Il serait donc intéressant de valider le score dans une base de données plus grande (par exemple celle du PVQPCP) et d'ajuster les cotes de chaque question afin d'optimiser la capacité de détection des troupeaux infectés. La version qualitative du questionnaire permet d'identifier les sections de la ferme méritant une intervention. Par contre, elle ne donne pas une idée globale de l'évolution de la ferme dans le programme. Avoir un résultat quantitatif pourrait être plus attirant pour les producteurs et pourrait servir comme référence de leur évolution dans le programme. Également, le score de risque pourrait servir pour comparer le niveau de risque d'introduction et de transmission de MAP entre les troupeaux et de cette façon contribuer à estimer le risque lors de l'achat/introduction d'animaux.

7.4.2 Sensibilité et spécificité de la culture fécale en milieu liquide à l'aide d'une analyse de classe latente

Un des défis du diagnostic de la PTB est l'absence de « *gold standard* ». La performance (sensibilité et spécificité) des tests diagnostiques disponibles pour détecter les infections à MAP est imparfaite (Collins, Gardner et al. 2006). Le test de référence pour le diagnostic *antemortem* de la PTB est la culture fécale (Whittington 2010) malgré une sensibilité et spécificité de 60 % et >99 % respectivement (Collins, Gardner et al. 2006). L'ELISA est le test le plus utilisé en raison du moindre coût et temps requis au laboratoire par rapport à la culture fécale. Par contre, ce test a une faible sensibilité (30 %) par rapport à la nécropsie (Collins, Gardner et al. 2006). Concernant le diagnostic de la PTB, il faut tenir compte qu'un résultat positif à la culture fécale reflète l'excrétion fécale de MAP dans les fèces et qu'un résultat positif à l'ELISA indique la présence d'anticorps contre MAP. Même si l'ELISA détecte une réaction immunitaire contre MAP et non l'agent causal, les résultats positifs ont été associés à l'infection par MAP (Collins 2002). Il est possible que les résultats de ces deux tests ne correspondent pas au vrai statut des animaux. Il a été décrit que les vaches cohabitant avec des animaux super excréteurs ou dans un environnement hautement contaminé par MAP peuvent ingérer la bactérie et avoir un résultat positif à la culture fécale sans être nécessairement infectées (Kralik, Pribylova-Dziedzinska et al. 2014). Également, outre qu'un manque de spécificité, des résultats faux positifs peuvent être rapportés au test ELISA à cause des réactions croisées avec des Mycobactéries environnementales (Osterstock, Fosgate et al. 2007). Les modèles bayésiens de classe latente sont adéquats pour évaluer la performance des méthodes diagnostiques en absence de « *gold standard* ». À notre connaissance, dans la littérature il n'y a pas d'études qui rapportent la sensibilité de la culture fécale de MAP en milieu liquide MGIT 960 à l'aide des modèles bayésiens de classe latente. Une telle analyse pourrait être réalisée en utilisant les bases de données des projets de notre groupe de recherche.

7.4.3 Évaluation de la PCR directe sur les échantillons issus de l'environnement pour la détection des troupeaux positifs à MAP

L'utilisation de la PCR directement sur les échantillons de l'environnement pour déterminer le statut des troupeaux a été suggérée dans des études précédentes (Donat, Kube et al. 2015; Donat, Hahn et al. 2016). Un des avantages de cette méthode sur la CPE est le temps réduit du processus au laboratoire. Par contre, la PCR ne détecte que l'ADN de MAP et non la viabilité de l'agent pathogène. La présence de MAP (vivant ou l'ADN) sur une ferme justifie la mise en place des mesures de prévention et contrôle, car cela signifie que l'organisme circule dans la ferme. Il serait intéressant d'évaluer la performance de la PCR en le comparant avec la CPE dans les conditions du Québec. Contrairement à d'autres études présentées dans cette section, cette étude requiert des prélèvements additionnels. Le nombre de troupeaux à prélever serait calculé selon la prévalence estimée à partir des données du PVQPCP. On pourrait inclure des troupeaux ayant participé ou non dans le PVQPCP. Une analyse PCR directe et une culture bactérienne des échantillons pourraient être réalisées afin de comparer les deux méthodes.

7.4.4 Corrélation entre la culture de prélèvements de l'environnement et la prévalence à la culture fécale individuelle à l'intérieur du troupeau

Le nombre d'échantillons positifs à la CPE est associé à la prévalence de MAP dans le troupeau (Lavers, McKenna et al. 2013). Dans presque tous les projets de notre groupe de recherche portant sur la CPE, des échantillons fécaux individuels ont été prélevés au même moment. Une étude évaluant la corrélation entre la CPE et la prévalence à la culture fécale individuelle incluant 13 troupeaux a été réalisée par notre groupe de recherche. Nous disposons maintenant des données d'environ 80 troupeaux qui ont été échantillonnés depuis 2007 dans différents projets. Certains troupeaux ont eu un seul prélèvement (CPE et culture fécale individuelle), mais d'autres ont participé à plusieurs séries de prélèvements. Ces données pourraient être consolidées dans une seule base de données et analysées de façon longitudinale ou transversale afin d'estimer la

corrélation entre le nombre d'échantillons positifs à la CPE et la prévalence à l'intérieur du troupeau dans les conditions du Québec.

7.4.5 Améliorer la compréhension du phénomène de surcroissance microbienne en décrivant les caractéristiques de croissance au laboratoire des échantillons NI

La base de données du laboratoire inclut des données d'environ 9000 échantillons traités entre 2010 et 2015. Des analyses préliminaires présentées dans cette thèse (Annexes 3 et 4) suggèrent que les échantillons NI peuvent être classés dans différentes catégories selon le commentaire aux lames attribué par les techniciens lors de la coloration AAR. Il serait intéressant de décrire les caractéristiques de croissance des échantillons NI (temps de détection et unités de croissance) en les comparant avec les échantillons positifs. On pourrait penser par exemple que les échantillons NI pourraient avoir un moindre temps de détection que les échantillons positifs. Une telle analyse effectuée à partir de la base de données du LÉAQ pourrait nous aider à mieux comprendre le phénomène de la surcroissance microbienne des échantillons cultivés pour MAP.

7.4.6 Amélioration du protocole de décontamination des échantillons fécaux

La troisième étude a été l'origine de la demande de subvention du projet sur l'amélioration du protocole de décontamination qui est en cours de réalisation. À partir d'une revue de littérature, les modifications au protocole de décontamination ayant un impact sur le pourcentage d'échantillons NI ont été répertoriées. Ces variantes seront mises à l'épreuve sur des échantillons de l'environnement déclarés au préalable comme étant NI afin d'estimer l'impact sur la surcroissance microbienne. Ainsi, des échantillons inoculés avec des quantités de MAP connues subiront les mêmes protocoles afin d'estimer l'impact de ces variantes sur la viabilité de MAP. Une autre étape de ce projet pourrait être l'identification des microorganismes présents dans les échantillons NI.

CHAPITRE 8
CONCLUSIONS GÉNÉRALES

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Une diminution de l'excrétion et le risque d'excrétion fécale de MAP a été observée chez les vaches nées après l'adhésion des fermes laitières en stabulation entravée au PVQPCP. Cette diminution est vraisemblablement une conséquence de la réduction du risque de transmission de MAP à l'intérieur du troupeau à travers de la mise en place de pratiques de régie spécifiques pour éviter le contact des veaux avec les vaches adultes ou leurs fèces.

La culture bactérienne des prélèvements de l'environnement est une alternative peu coûteuse et non invasive par rapport aux tests individuels (culture or ELISA), pour déterminer le statut des troupeaux à stabulation entravée au Québec. C'est une stratégie qui permet de détecter notamment les troupeaux laitiers les plus fortement infectés, mais qui détecte aussi les troupeaux à faible prévalence. Nous avons observé que la répétition des prélèvements augmente la sensibilité de la stratégie. Également, l'obtention de résultats négatifs dans des prélèvements consécutifs augmente la certitude pour un troupeau d'avoir une très faible prévalence ou d'être négatif à MAP.

L'utilisation de la PCR sur les échantillons NI contribue à améliorer le processus de culture de MAP en augmentant la sensibilité et la spécificité et en évitant des délais supplémentaires liés à la prise des nouveaux échantillons et aux cultures additionnelles. Par contre, les coûts générés devraient être considérés étant donné le très faible nombre d'échantillons positifs qui pourraient être récupérés (environ 1 % à 3 % selon si l'échantillon est issu de l'environnement ou individuel).

BIBLIOGRAPHIE

Acharya, K. R., N. K. Dhand, R. J. Whittington and K. M. Plain (2017). "PCR Inhibition of a Quantitative PCR for Detection of *Mycobacterium avium* Subspecies *Paratuberculosis* DNA in Feces: Diagnostic Implications and Potential Solutions." Front Microbiol **8**: 115.

Alinovi, C. A., M. P. Ward, T. L. Lin, G. E. Moore and C. C. Wu (2009). "Real-time PCR, compared to liquid and solid culture media and ELISA, for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*." Vet Microbiol **136**(1-2): 177-179.

Aly, S. S., B. L. Mangold, R. H. Whitlock, R. W. Sweeney, R. J. Anderson, J. Jiang, Y. H. Schukken, E. Hovingh, D. Wolfgang, J. A. Van Kessel, J. S. Karns, J. E. Lombard, J. M. Smith and I. A. Gardner (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." J Vet Diagn Invest **22**(5): 677-683.

Annam, V., M. H. Kulkarni and R. B. Puranik (2009). "Comparison of the modified fluorescent method and conventional Ziehl–Neelsen method in the detection of acidfast bacilli in lymphnode aspirates." Cytojournal **6**: 13.

Ansari-Lari, M., M. Haghkhah, A. Bahramy and A. M. Novin Baهران (2009). "Risk factors for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Fars province (Southern Iran) dairy herds." Trop Anim Health & Prod **41**(4): 553-557.

Arnold, M. E., M. E. Arnold, J. J. Carrique-Mas and R. H. Davies (2010). "Sensitivity of environmental sampling methods for detecting *Salmonella* Enteritidis in commercial laying flocks relative to the within-flock prevalence." Epidemiol Infect **138**(03): 330-339.

Arrigoni, N., L. Ruocco, G. Paternoster and M. Tamba (2014). Bovine Paratuberculosis in Italy: Building Infrastructures and Defining the Guidelines for Control and for Ranking of Herds. 4th ParaTB Forum, Parma, Italy.

Arsenault, R. J., P. Maattanen, J. Daigle, A. Potter, P. Griebel and S. Napper (2014). "From mouth to macrophage: mechanisms of innate immune subversion by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*." Vet Res **45**: 54.

Bannantine, J. P. and L. E. Bermudez (2013). "No holes barred: invasion of the intestinal mucosa by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*." Infect Immun **81**(11): 3960-3965.

Barkema, H. W., J. W. Hesselink, S. L. B. McKenna, G. Benedictus and H. Groenendaal (2010). Global prevalence and economics of infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ruminants. Paratuberculosis : Organism, Disease, Control. M. A. Behr and D. M. Collins. Wallingford, Oxfordshire, CAB International: 10-21.

Barkema, H. W., K. Orsel, S. S. Nielsen, A. P. Koets, V. Rutten, J. P. Bannantine, G. P. Keefe, D. F. Kelton, S. J. Wells, R. J. Whittington, C. G. Mackintosh, E. J. Manning, M. F. Weber, C. Heuer, T. L. Forde, C. Ritter, S. Roche, C. S. Corbett, R. Wolf, P. J. Griebel, J. P. Kastelic and J. De Buck (2017). "Knowledge gaps that hamper prevention and control of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection." Transbound Emerg Dis.

Barker, R. A., H. W. Barkema, G. Fecteau, G. Keefe and D. F. Kelton (2012). Johne's Disease Control in Canada - Coordinated Nationally - Delivered Provincially. 3rd ParaTB Forum, Sydney, Australia.

Behr, M. A. (2010). Paratuberculosis and Crohn's Disease. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. M. A. Behr and D. Collins. Wallingford, Oxfordshire, CAB International: 40-49.

Benedictus, A., R. M. Mitchell, M. Linde-Widmann, R. Sweeney, T. Fyock, Y. H. Schukken and R. H. Whitlock (2008). "Transmission parameters of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infections in a dairy herd going through a control program." Prev Vet Med **83**(3-4): 215-227.

Berghaus, R. D., T. B. Farver, R. J. Anderson, C. C. Jaravata and I. A. Gardner (2006). "Environmental sampling for detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* on large California dairies." J. Dairy Sci. **89**(3): 963-970.

Berghaus, R. D., J. E. Lombard, I. A. Gardner and T. B. Farver (2005). "Factor analysis of a Johne's disease risk assessment questionnaire with evaluation of factor scores and a subset of original questions as predictors of observed clinical paratuberculosis." Prev Vet Med **72**(3/4): 291-309.

Billman-Jacobe, H., M. Carrigan, F. Cockram, L. A. Corner, I. J. Gill, J. F. Hill, T. Jessep, A. R. Milner and P. R. Wood (1992). "A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle." Aust Vet J **69**(2): 25-28.

Bölske, G. and D. Herthnek (2010). Diagnosis of paratuberculosis by PCR. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. M. A. Behr and D. M. Collins. Wallingford, Oxfordshire, CAB International: 267-283.

Bolton, M. W., R. B. Pillars, J. B. Kaneene, W. A. Mauer and D. L. Grooms (2011). "Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in naturally exposed dairy heifers and associated risk factors." J. Dairy Sci. **94**(9): 4669-4675.

Brumell, J. H. and M. A. Scidmore (2007). "Manipulation of rab GTPase function by intracellular bacterial pathogens." Microbiol Mol Biol Rev **71**(4): 636-652.

Burgelt, C. D., C. Hall, K. McEntee and J. R. Duncan (1978). "Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle." Vet Pathol **15**(2): 196-207.

Cai, H. Y., J. L. Caswell and J. F. Prescott (2014). "Nonculture molecular techniques for diagnosis of bacterial disease in animals: a diagnostic laboratory perspective." Vet Pathol **51**(2): 341-350.

Campe, A., H. Köhler and K. Donat (2014). Approaches to Controlling Paratuberculosis in Germany – Conditioned by Voluntariness and Federalism. 4th ParaTB Forum, Parma, Italy.

Citer, L. and E. S. G. Sergeant (2014). JD Control in Australia: Keeping Pace with National Animal Health Policies, the Challenges and Lessons Learned. 4th ParaTB Forum, Parma, Italy.

Collins, M. T. (2002). "Interpretation of a commercial bovine paratuberculosis enzyme-linked immunosorbent assay by using likelihood ratios." Clin. Diagn. Lab. Immunol. **9**(6): 1367-1371.

Collins, M. T. (2011). "Diagnosis of paratuberculosis." Vet Clin North Am Food Anim Pract **27**(3): 581-591, vi.

Collins, M. T., V. Eggleston and E. J. Manning (2010). "Successful control of Johne's disease in nine dairy herds: results of a six-year field trial." J Dairy Sci **93**(4): 1638-1643.

Collins, M. T., I. A. Gardner, F. B. Garry, A. J. Roussel and S. J. Wells (2006). "Consensus recommendations on diagnostic testing for the detection of paratuberculosis in cattle in the United States." J. Am. Vet. Med. Assoc. **229**(12): 1912-1919.

Collins, M. T., S. J. Wells, K. R. Petrini, J. E. Collins, R. D. Schultz and R. H. Whitlock (2005). "Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis." Clin Diagn Lab Immunol **12**(6): 685-692.

Condrom, R. and J. McNeil (2014). Application of BJD Management Strategies in the Australian Dairy Industry. 4th ParaTB Forum, Parma, Italy.

Côté, G., Institut national de santé animale, Ministère de l'Agriculture des Pêcheries et l'Alimentation du Québec. (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. Québec, Canada.

Cousins, D. V., R. J. Evans and B. R. Francis (1995). "Use of BACTEC radiometric culture method and polymerase chain reaction for the rapid screening of faeces and tissues for *Mycobacterium paratuberculosis*." Aust. Vet. J. **72**(12): 458-462.

Coussens, P., E. A. Lamont, E. Kabara and S. Sreevatsan (2010). Host-Pathogen Interactions and Intracellular Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. M. A. Behr and D. M. Collins. Wallingford, Oxfordshire, CAB International: 109-125.

Crossley, B. M., F. J. Zagmutt-Vergara, T. L. Fyock, R. H. Whitlock and I. A. Gardner (2005). "Fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by dairy cows." Vet Microbiol **107**(3-4): 257-263.

Davis, J. M. and L. Ramakrishnan (2009). "The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection." Cell **136**(1): 37-49.

Dohoo, I. R., S. W. Martin and H. Stryhn (2009). Vet Epidemiol Res. Charlottetown, P.E.I., VER, Inc.

Donat, K., N. Hahn, T. Eisenberg, K. Schlez, H. Kohler, W. Wolter, M. Rohde, R. Putzschel, U. Rosler, K. Failing and P. M. Zschock (2016). "Within-herd prevalence thresholds for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*-positive dairy herds using boot swabs and liquid manure samples." Epidemiol Infect **144**(2): 413-424.

Donat, K., J. Kube, J. Dressel, E. Einax, M. Pfeffer and K. Failing (2015). "Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in environmental samples by faecal culture and real-time PCR in relation to apparent within-herd prevalence as determined by individual faecal culture." Epidemiol Infect **143**(5): 975-985.

Doré, E., J. Paré, G. Côté, S. Buczinski, O. Labrecque, J. P. Roy and G. Fecteau (2012). "Risk factors associated with transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to calves within dairy herd: a systematic review." J. Vet. Intern. Med. **26**(1): 32-45.

Eamens, G. J., R. J. Whittington, I. B. Marsh, M. J. Turner, V. Saunders, P. D. Kemsley and D. Rayward (2000). "Comparative sensitivity of various faecal culture

methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease." Vet Microbiol **77**(3/4): 357-367.

Eisenberg, T., W. Wolter, M. Lenz, K. Schlez and M. Zschock (2013). "Boot swabs to collect environmental samples from common locations in dairy herds for *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis (MAP) detection." J Dairy Res **80**(4): 485-489.

Englund, S., G. Bolske and K. E. Johansson (2002). "An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis." FEMS Microbiol Lett **209**(2): 267-271.

Eppleston, J., D. J. Begg, N. K. Dhand, B. Watt and R. J. Whittington (2014). "Environmental survival of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in different climatic zones of eastern Australia." Appl Environ Microbiol **80**(8): 2337-2342.

Espejo, L. A., S. Godden, W. L. Hartmann and S. J. Wells (2012). "Reduction in incidence of Johne's disease associated with implementation of a disease control program in Minnesota demonstration herds." J Dairy Sci **95**(7): 4141-4152.

Espejo, L. A., N. Kubat, S. M. Godden and S. J. Wells (2013). "Effect of delayed exposure of cattle to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis on the development of subclinical and clinical Johne's disease." Am J Vet Res **74**(10): 1304-1310.

Fecteau, M. E. and R. H. Whitlock (2010). Paratuberculosis in Cattle. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. M. A. Behr and D. M. Collins. Wallingford, Oxfordshire, CAB International: 114-156.

Ferrouillet, C., S. J. Wells, W. L. Hartmann, S. M. Godden and J. Carrier (2009). "Decrease of Johne's disease prevalence and incidence in six Minnesota, USA, dairy cattle herds on a long-term management program." Prev Vet Med **88**(2): 128-137.

Foster, S. J. and K. Johnstone (1990). "Pulling the trigger: the mechanism of bacterial spore germination." Mol Microbiol **4**(1): 137-141.

Fourichon, C. and R. Guatteo (2014). Control of Paratuberculosis in Cattle in France: Components of National and Regional Voluntary Programs and their Application. 4th ParaTB Forum, Parma, Italy.

Gao, A., L. Mutharia, S. Chen, K. Rahn and J. Odumeru (2002). "Effect of pasteurization on survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk." J Dairy Sci **85**(12): 3198-3205.

Garcia-Ispuerto, I. and F. Lopez-Gatius (2016). "Early Foetal Loss Correlates Positively with Seroconversion against *Mycobacterium avium* paratuberculosis in High-Producing Dairy Cows." Reprod Domest Anim **51**(2): 227-231.

Gardner, I. A., S. S. Nielsen, R. J. Whittington, M. T. Collins, D. Bakker, B. Harris, S. Sreevatsan, J. E. Lombard, R. Sweeney, D. R. Smith, J. Gavalchin and S. Eda (2011). "Consensus-based reporting standards for diagnostic test accuracy studies for paratuberculosis in ruminants." Prev Vet Med **101**(1-2): 18-34.

Garry, F. (2011). "Control of paratuberculosis in dairy herds." Vet Clin North Am Food Anim Pract **27**(3): 599-607, vii.

Geraghty, T., D. A. Graham, P. Mullooney and S. J. More (2014). "A review of bovine Johne's disease control activities in 6 endemically infected countries." Prev Vet Med **116**(1-2): 1-11.

Givens, M. D. and M. S. D. Marley (2008). "Pathogens that cause infertility of bulls or transmission via semen." Theriogenology **70**(3): 504-507.

Gonzalez, J., M. V. Geijo, C. Garcia-Pariente, A. Verna, J. M. Corpa, L. E. Reyes, M. C. Ferreras, R. A. Juste, J. F. Garcia Marin and V. Perez (2005). "Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle." J Comp Pathol **133**(2-3): 184-196.

Goodell, G. M., H. Hirst, F. Garry and P. Dinsmore (2000). Comparison of cull rates and milk production of dairy cows that have been identified as Johne's positive by the IDEXX ELISA test. International Symposia on Veterinary Epidemiology and Economics proceedings, ISVEE 9: Proceedings of the 9th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, Breckenridge, Colorado, USA, International Society for Veterinary Epidemiology and Economics.

Grant, I. R. (2010). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Animal-derived Foods and the Environment. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. M. A. Behr and D. Collins. Wallingford, Oxfordshire, CAB International: 29-39.

Griebel, P. J. and W. R. Hein (1996). "Expanding the role of Peyer's patches in B-cell ontogeny." Immunol Today **17**(1): 30-39.

Groenendaal, H., M. Nielen, A. W. Jalvingh, S. H. Horst, D. T. Galligan and J. W. Hesselink (2002). "A simulation of Johne's disease control." Prev Vet Med **54**(3): 225-245.

Groupe AGÉCO. (2013, June 27 2013). "Nombre moyen de vaches laitières par ferme et par province au 1er janvier, Canada." Retrieved May 18th 2016, 2014, from <http://groupeageco.ca/fsl/>.

Gunn, G. J., C. Heffernan, M. Hall, A. McLeod and M. Hovi (2008). "Measuring and comparing constraints to improved biosecurity amongst GB farmers, veterinarians and the auxiliary industries." Prev Vet Med **84**(3-4): 310-323.

Harris, B., S. Robe-Austerman, P. Dykema, K. Fett, T. Stuber and K. Stokes (2009). Laboratory methods for isolation and identification of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (Johne's Disease). Ames, IA, USDA National Veterinary Services Laboratories.

Hendrick, S. H., D. F. Kelton, K. E. Leslie, K. D. Lissemore, M. Archambault and T. F. Duffield (2005). "Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds." J. Am. Vet. Med. Ass. **227**(8): 1302-1308.

Hermon-Taylor, J. (2001). "Protagonist. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* is a cause of Crohn's disease." Gut **49**(6): 755-756.

Hostetter, J., E. Steadham, J. Haynes, T. Bailey and N. Cheville (2003). "Phagosomal maturation and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in J774 cells." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **26**(4): 269-283.

Hutchings, M. R., K. Stevenson, A. Greig, R. S. Davidson, G. Marion and J. Judge (2010). Infection of Non-ruminant Wildlife by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. M. A. Behr and D. Collins. Wallingford, Oxfordshire, CAB International: 188-200.

Ijzerman, M. M., D. R. Dahling and G. S. Fout (1997). "A method to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction." J Virol Methods **63**(1-2): 145-153.

International Association for Paratuberculosis. (2015-12-08). "International Association for Paratuberculosis." Retrieved 2017-06-25, 2017, from <http://paratuberculosis.net/>.

International Association for Paratuberculosis (2012). Proceedings of the 3rd ParaTB Forum. 3rd ParaTB Forum, Sydney, Australia, International Association for Paratuberculosis.

International Association for Paratuberculosis (2014). Proceedings of the 4th ParaTB Forum. 4th ParaTB Forum, Parma, Italy, International Association for Paratuberculosis.

Johansen, K. A., E. E. Hugen and J. B. Payeur (2006). "Growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the presence of hexadecylpyridinium chloride, natamycin, and vancomycin." J Food Prot **69**(4): 878-883.

Johnson-Ifeorlundu, Y. and J. B. Kaneene (1999). "Distribution and environmental risk factors for paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan." Am J Vet Res **60**(5): 589-596.

Johnson-Ifeorlundu, Y. J., J. B. Kaneene, D. J. Sprecher, J. C. Gardiner and J. W. Lloyd (2000). "The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on days open in Michigan, USA, dairy cows." Prev Vet Med **46**(3): 171-181.

Jubb, T. F. and J. W. Galvin (2004). "Effect of a test and control program for bovine Johne's disease in Victorian dairy herds 1992 - 2002." Aust Vet J **82**(4): 228-232.

Kalis, C. H., H. W. Barkema, J. W. Hesselink, C. van Maanen and M. T. Collins (2002). "Evaluation of two absorbed enzyme-linked immunosorbent assays and a complement fixation test as replacements for fecal culture in the detection of cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*." J Vet Diagn Invest **14**(3): 219-224.

Kalis, C. H., M. T. Collins, H. W. Barkema and J. W. Hesselink (2004). "Certification of herds as free of *Mycobacterium paratuberculosis* infection: actual pooled faecal results versus certification model predictions." Prev Vet Med **65**(3-4): 189-204.

Kalis, C. H., M. T. Collins, J. W. Hesselink and H. W. Barkema (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." Vet Microbiol **97**(1-2): 73-86.

Kalis, C. H., J. W. Hesselink, H. W. Barkema and M. T. Collins (2000). "Culture of strategically pooled bovine fecal samples as a method to screen herds for paratuberculosis." J Vet Diagn Invest **12**(6): 547-551.

Katayama, N., C. Tanaka, T. Fujita, Y. Saitou, S. Suzuki and E. Onouchi (2000). "Effect of ensilage on inactivation of *M. avium* subsp. *paratuberculosis*." Grassl Sci **46**(3/4): 282-288.

Kelton, D. F., H. W. Barkema, C. Bauman and C. Pickel (2016). Regional differences in Johne's Disease prevalence based on environmental culture and bulk milk testing. International Colloquium for Paratuberculosis, Nantes, France.

Kelton, D. F., H. W. Barkema, G. Keefe, G. Fecteau and R. A. Barker (2014). Johne's Disease Control in Canada - 2010-2013 - Successes and Challenges. 4th ParaTB Forum, Parma, Italy.

Kennedy, D. (2011). "International efforts at paratuberculosis control." Vet Clin North Am Food Anim Pract **27**(3): 647-654, viii.

Khare, S., L. G. Adams, J. Osterstock, A. Roussel and L. David (2008). "Effects of shipping and storage conditions of fecal samples on viability of *Mycobacterium paratuberculosis*." J Clin Microbiol **46**(4): 1561-1562.

Khare, S., J. S. Nunes, J. F. Figueiredo, S. D. Lawhon, C. A. Rossetti, T. Gull, A. C. Rice-Ficht and L. G. Adams (2009). "Early phase morphological lesions and transcriptional responses of bovine ileum infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis." Vet Pathol **46**(4): 717-728.

Khol, J. L. and W. Baumgartner (2014). 8 Years of Compulsory Measures against Clinical Paratuberculosis in Austria – A Success? 4th ParaTB Forum, Parma, Italy.

Khol, J. L., P. Kralik, I. Slana, V. Beran, C. Aurich, W. Baumgartner and I. Pavlik (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." J Vet Med Sci **72**(10): 1283-1288.

Kim, Y. G., S. Bech-Nielsen, J. C. Gordon, R. D. Slemons and E. Spangler (1989). "Comparison of two methods for isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples." Am J Vet Res **50**(7): 1110-1113.

Klausen, J., A. Huda, L. Ekeroth and P. Ahrens (2003). "Evaluation of serum and milk ELISAs for paratuberculosis in Danish dairy cattle." Prev Vet Med **58**(3-4): 171-178.

Kralik, P., R. Pribylova-Dziedzinska, A. Kralova, K. Kovarcik and I. Slana (2014). "Evidence of passive faecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in a Limousin cattle herd." Vet J **201**(1): 91-94.

Kralik, P. and I. Slana (2014). Control of Paratuberculosis in the Czech Republic. 4th ParaTB Forum, Parma, Italy.

Kudahl, A. B. and S. S. Nielsen (2009). "Effect of paratuberculosis on slaughter weight and slaughter value of dairy cows." J. Dairy Sci. **92**(9): 4340-4346.

Kudahl, A. B., S. S. Nielsen and S. Ostergaard (2008). "Economy, efficacy, and feasibility of a risk-based control program against paratuberculosis." J. Dairy Sci. **91**(12): 4599-4609.

Kunzler, R., P. Torgerson, S. Keller, M. Wittenbrink, R. Stephan, G. Knubben-Schweizer, B. Berchtold and M. Meylan (2014). "Observed management practices in relation to the risk of infection with paratuberculosis and to the spread of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Swiss dairy and beef herds." BMC Vet Res **10**: 132.

Lambeth, C., L. A. Reddacliff, P. Windsor, K. A. Abbott, H. McGregor and R. J. Whittington (2004). "Intrauterine and transmammary transmission of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis in sheep." Aust Vet J **82**(8): 504-508.

Lambrecht, R. S. and M. T. Collins (1993). "Inability to detect mycobactin in *Mycobacteria*-infected tissues suggests an alternative iron acquisition mechanism by *Mycobacteria* in vivo." Microb Pathog **14**(3): 229-238.

Lamont, E. A., J. P. Bannantine, A. Armien, D. S. Ariyakumar and S. Sreevatsan (2012). "Identification and characterization of a spore-like morphotype in chronically starved *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis cultures." PLoS One **7**(1): e30648.

Lavers, C. J., I. R. Dohoo, S. L. McKenna and G. P. Keefe (2015). "Sensitivity and specificity of repeated test results from a commercial milk enzyme-linked

immunosorbent assay for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle." J Am Vet Med Assoc **246**(2): 236-244.

Lavers, C. J., S. L. McKenna, I. R. Dohoo, H. W. Barkema and G. P. Keefe (2013). "Evaluation of environmental fecal culture for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* detection in dairy herds and association with apparent within-herd prevalence." Can. Vet. J. **54**(11): 1053-1060.

Lombard, J. E. (2011). "Epidemiology and economics of paratuberculosis." Vet Clin North Am Food Anim Pract **27**(3): 525-535, v.

Lombard, J. E., F. B. Garry, B. J. McCluskey and B. A. Wagner (2005). "Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows." J. Am. Vet. Med. Assoc. **227**(12): 1975-1981.

Lombard, J. E., B. A. Wagner, R. L. Smith, B. J. McCluskey, B. N. Harris, J. B. Payeur, F. B. Garry and M. D. Salman (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**(11): 4163-4171.

Mackintosh, C. G. and F. Griffin (2010). Paratuberculosis in Deer, Camelids and Other Ruminants. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. M. A. Behr and D. Collins. Wallingford, Oxfordshire, CAB International: 179-187.

Manning, E. J. B. and M. T. Collins (2010). Epidemiology of paratuberculosis. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. M. A. Behr and D. Collins. Wallingford, Oxfordshire, UK, CAB International: 22-28.

Manning, E. J. B. and M. T. Collins (2010). History of Paratuberculosis. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. M. A. Behr and D. Collins. Wallingford, Oxfordshire, CAB International: 1-9.

MAPAQ, Ministère de l'Agriculture des Pêcheries et l'Alimentation du Québec (2012) "Revue d'épidémiologie animale du RAIZO: bilan 2011."

Marce, C., P. Ezanno, M. F. Weber, H. Seegers, D. U. Pfeiffer and C. Fourichon (2010). "Invited review: modeling within-herd transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle: a review." J Dairy Sci **93**(10): 4455-4470.

Markey, B. K., F. C. Leonard, M. Archambault, A. Cullinane and D. Maguire (2013). Clin Vet Microbiol. Edinburgh, Elsevier.

McAloon, C. G., P. Whyte, S. J. More, M. J. Green, L. O'Grady, A. Garcia and M. L. Doherty (2016). "The effect of paratuberculosis on milk yield--A systematic review and meta-analysis." J Dairy Sci **99**(2): 1449-1460.

McKenna, S. L., G. P. Keefe, A. Tiwari, J. VanLeeuwen and H. W. Barkema (2006). "Johne's disease in Canada part II: disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers." Can Vet J **47**(11): 1089-1099.

Mintiens, K. (2014). Paratuberculosis in Belgium. 4th ParaTB Forum, Parma, Italy.

Mitchell, R. M., Y. Schukken, A. Koets, M. Weber, D. Bakker, J. Stabel, R. H. Whitlock and Y. Louzoun (2015). "Differences in intermittent and continuous fecal shedding patterns between natural and experimental *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in cattle." Vet Res **46**: 66.

Mitchell, R. M., R. H. Whitlock, S. M. Stehman, A. Benedictus, P. P. Chapagain, Y. T. Grohn and Y. H. Schukken (2008). "Simulation modeling to evaluate the persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) on commercial dairy farms in the United States." Prev Vet Med **83**(3-4): 360-380.

Momotani, E., H. Ozaki, M. Hori, S. Yamamoto, T. Kuribayashi, S. Eda and M. Ikegami (2012). "*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* lipophilic antigen causes Crohn's disease-type necrotizing colitis in Mice." Springerplus **1**(1): 47.

Momotani, E., N. M. Romona, K. Yoshihara, Y. Momotani, M. Hori, H. Ozaki, S. Eda and M. Ikegami (2012). "Molecular pathogenesis of bovine paratuberculosis and human inflammatory bowel diseases." Vet. Immunol. Immunopathol. **148**(1-2): 55-68.

Momotani, E., D. L. Whipple, A. B. Thiermann and N. F. Cheville (1988). "Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves." Vet Pathol **25**(2): 131-137.

Mortier, R. A., H. W. Barkema, K. Orsel, R. Wolf and J. De Buck (2014). "Shedding patterns of dairy calves experimentally infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*." Vet Res **45**: 71.

Mullowney, P. and S. Strain (2014). Johne's Disease Control in Ireland - Past, Present and Future. 4th ParaTB Forum, Parma, Italy.

Naser, S. A., D. Schwartz and I. Shafran (2000). "Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients." Am J Gastroenterol **95**(4): 1094-1095.

Nielsen, L. R. and S. S. Nielsen (2012). "A structured approach to control of *Salmonella* Dublin in 10 Danish dairy herds based on risk scoring and test-and-manage procedures." Food Research International **45**(2): 1158-1165.

Nielsen, S. S. (2008). "Transitions in diagnostic tests used for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections in cattle." Vet. Microbiol. **132**(3-4): 274-282.

Nielsen, S. S. (2010). Immune-based Diagnosis of Paratuberculosis. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. M. A. Behr and D. Collins. Wallingford, Oxfordshire, CAB International 284-293.

Nielsen, S. S., H. Bjerre and N. Toft (2008). "Colostrum and milk as risk factors for infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle." J Dairy Sci **91**(12): 4610-4615.

Nielsen, S. S. and A. K. Ersboll (2006). "Age at occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in naturally infected dairy cows." J. Dairy Sci. **89**(12): 4557-4566.

Nielsen, S. S., B. Kolmos and A. B. Christoffersen (2004). "Comparison of contamination and growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on two different media." J Appl Microbiol **96**(1): 149-153.

Nielsen, S. S. and K. Krogh (2014). Developments in the Danish Control Program on Paratuberculosis 2006-2014. 4th ParaTB Forum, Parma, Italy.

Nielsen, S. S. and N. Toft (2006). "Age-specific characteristics of ELISA and fecal culture for purpose-specific testing for paratuberculosis." J Dairy Sci **89**(2): 569-579.

Nielsen, S. S. and N. Toft (2007). "Assessment of management-related risk factors for paratuberculosis in Danish dairy herds using Bayesian mixture models." Prev Vet Med **81**(4): 306-317.

Nielsen, S. S. and N. Toft (2008). "Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon- γ assay and faecal culture techniques." Vet Microbiol **129**(3-4): 217-235.

Nielsen, S. S. and N. Toft (2009). "A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe." Prev Vet Med **88**(1): 1-14.

Nielsen, T. D., I. L. Vesterbæk, A. B. Kudahl, K. J. Borup and L. R. Nielsen (2012). "Effect of management on prevention of Salmonella Dublin exposure of calves during a one-year control programme in 84 Danish dairy herds." Prev Vet Med **105**(1): 101-109.

Norby, B., G. T. Fosgate, E. J. Manning, M. T. Collins and A. J. Roussel (2007). "Environmental mycobacteria in soil and water on beef ranches: association between presence of cultivable mycobacteria and soil and water physicochemical characteristics." Vet Microbiol **124**(1-2): 153-159.

Obasanjo, I. O., Y. T. Grohn and H. O. Mohammed (1997). "Farm factors associated with the presence of Mycobacterium paratuberculosis infection in dairy herds on the New York State Paratuberculosis Control Program." Prev Vet Med **32**(3-4): 243-251.

Okura, H., N. Toft and S. S. Nielsen (2012). "Occurrence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in milk at dairy cattle farms: a systematic review and meta-analysis." Vet Microbiol **157**(3-4): 253-263.

Orpin, P. G. and R. J. Sibley (2014). A Review on Progress with Johne's Engagement Program in UK Dairy Herds. 4th ParaTB Forum, Parma, Italy.

Østerås, O. (2014). Is the Norwegian Cattle Population Free of Johne's Disease? How to Prove this? 4th ParaTB Forum, Parma, Italy.

Osterstock, J. B., G. T. Fosgate, B. Norby, E. J. Manning, M. T. Collins and A. J. Roussel (2007). "Contribution of environmental mycobacteria to false-positive serum ELISA results for paratuberculosis." J Am Vet Med Assoc **230**(6): 896-901.

Pieper, L., U. S. Sorge, T. J. DeVries, A. Godkin, K. Lissemore and D. F. Kelton (2015). "Evaluation of the Johne's disease risk assessment and management plan on dairy farms in Ontario, Canada." J Dairy Sci **98**(10): 6792-6800.

Pieper, L., U. S. Sorge, T. J. DeVries, A. Godkin, K. Lissemore and D. F. Kelton (2015). "Evaluation of the Johne's disease risk assessment and management plan on dairy farms in Ontario, Canada." J Dairy Sci **98**(10): 6792-6800.

Pillars, R. B., D. L. Grooms, J. C. Gardiner and J. B. Kaneene (2011). "Association between risk-assessment scores and individual-cow Johne's disease-test status over time on seven Michigan, USA dairy herds." Prev Vet Med **98**(1): 10-18.

Pillars, R. B., D. L. Grooms and J. B. Kaneene (2009). "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. J. **50**(10): 1039-1046.

Pillars, R. B., D. L. Grooms, C. A. Wolf and J. B. Kaneene (2009). "Economic evaluation of Johne's disease control programs implemented on six Michigan dairy farms." Prev Vet Med **90**(3): 223-232.

Pillars, R. B., D. L. Grooms, J. A. Woltanski and E. Blair (2009). "Prevalence of Michigan dairy herds infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as determined by environmental sampling." Prev. Vet. Med. **89**(3-4): 191-196.

Pouillot, R., B. Dufour and B. Durand (2004). "A deterministic and stochastic simulation model for intra-herd paratuberculosis transmission." Vet Res **35**(1): 53-68.

Pribylova, R., L. Kubickova, V. Babak, I. Pavlik and P. Kralik (2012). "Effect of short- and long-term antibiotic exposure on the viability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as measured by propidium monoazide F57 real time quantitative PCR and culture." Vet Journal **194**(3): 354-360.

Qual, D. A., J. B. Kaneene, T. J. Varty, R. Miller and C. O. Thoen (2010). "Lack of association between the occurrence of Crohn's disease and occupational exposure to dairy and beef cattle herds infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*." J Dairy Sci **93**(6): 2371-2376.

Raizman, E. A., S. J. Wells, S. M. Godden, R. F. Bey, M. J. Oakes, D. C. Bentley and K. E. Olsen (2004). "The distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in the environment surrounding Minnesota dairy farms." J. Dairy Sci. **87**(9): 2959-2966.

Raizman, E. A., S. J. Wells, S. M. Godden, J. Fetrow, K. Friendshuh and J. Michael Oakes (2006). "Characterization of Minnesota dairy herds participating in a Johne's disease control program and evaluation of the program risk assessment tool." Prev Vet Med **75**(1-2): 22-33.

Rangel, S., J. C. Arango-Sabogal, O. Labrecque, J. Paré, J. H. Fairbrother, S. Buczinski, J. P. Roy, G. Côté, V. Wellemans and G. Fecteau (2017). "Evaluation of a PCR assay on overgrown individual fecal samples cultured for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*." J Vet Diagn Invest.

Rangel, S. J., J. Paré, E. Doré, J. C. Arango, G. Côté, S. Buczinski, O. Labrecque, J. H. Fairbrother, J. P. Roy, V. Wellemans and G. Fecteau (2015). "A systematic review of risk factors associated with the introduction of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP) into dairy herds." Can Vet J **56**(2): 169-177.

Ridge, S. E., C. Heuer, N. Cogger, A. Heck, S. Moor, I. M. Baker and S. Vaughan (2010). "Herd management practices and the transmission of Johne's disease within infected dairy herds in Victoria, Australia." Prev Vet Med **95**(3-4): 186-197.

Ritter, C., J. Jansen, K. Roth, J. P. Kastelic, C. L. Adams and H. W. Barkema (2016). "Dairy farmers' perceptions toward the implementation of on-farm Johne's disease prevention and control strategies." J Dairy Sci **99**(11): 9114-9125.

Ritter, C., G. P. Kwong, R. Wolf, C. Pickel, M. Slomp, J. Flaig, S. Mason, C. L. Adams, D. F. Kelton, J. Jansen, J. De Buck and H. W. Barkema (2015). "Factors associated with participation of Alberta dairy farmers in a voluntary, management-based Johne's disease control program." J Dairy Sci **98**(11): 7831-7845.

Rock, C., A. Alum and M. Abbaszadegan (2010). "PCR inhibitor levels in concentrates of biosolid samples predicted by a new method based on excitation-emission matrix spectroscopy." Appl Environ Microbiol **76**(24): 8102-8109.

Rogers, J., P. Nosworthy and G. Gilbert (2012). An industry and government cooperative approach to managing Bovine Johne's Disease in the dairy industry in South Australia. 3rd ParaTB Forum, Sydney, Australia.

Rothman, K. J., S. Greenland and T. Lash (2008). Modern Epidemiology. United States, Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, c2008.

Runyon, E. H. (1959). "Source of scotochromogens." Am Rev Respir Dis **80**: 277-278.

Sartor, R. B. (2005). "Does *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cause Crohn's disease?" Gut **54**(7): 896-898.

Scanu, A. M., T. J. Bull, S. Cannas, J. D. Sanderson, L. A. Sechi, G. Dettori, S. Zanetti and J. Hermon-Taylor (2007). "*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cases of irritable bowel syndrome and comparison with Crohn's disease and Johne's disease: common neural and immune pathogenicities." J. Clin. Microbiol. **45**(12): 3883-3890.

Schrader, C., A. Schielke, L. Ellerbroek and R. Johne (2012). "PCR inhibitors - occurrence, properties and removal." J Appl Microbiol **113**(5): 1014-1026.

Schukken, Y. H., R. H. Whitlock, D. Wolfgang, Y. Grohn, A. Beaver, J. VanKessel, M. Zurakowski and R. Mitchell (2015). "Longitudinal data collection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in dairy herds: the value of precise field data." Vet Res **46**: 65.

Scott, H. M., G. T. Fosgate, M. C. Libal, L. W. Sneed, E. Erol, A. B. Angulo and E. R. Jordan (2007). "Field testing of an enhanced direct-fecal polymerase chain reaction procedure, bacterial culture of feces, and a serum enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* infection in adult dairy cattle." Am J Vet Res **68**(3): 236-245.

Smith, R. L., M. A. Al-Mamun and Y. T. Gröhn (2017). "Economic consequences of paratuberculosis control in dairy cattle: A stochastic modeling study." Prev Vet Med **138**(Supplement C): 17-27.

Smith, R. L., Y. H. Schukken, A. K. Pradhan, J. M. Smith, R. H. Whitlock, J. S. Van Kessel, D. R. Wolfgang and Y. T. Grohn (2011). "Environmental contamination with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in endemically infected dairy herds." Prev. Vet. Med. **102**(1): 1-9.

Socket, D. C., D. J. Carr and M. T. Collins (1992). "Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a commercial DNA probe for diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in cattle." Can J Vet Res **56**(2): 148-153.

Sorge, U. S., K. Lissemore, A. Godkin, J. Jansen, S. Hendrick, S. Wells and D. F. Kelton (2012). "Risk factors for herds to test positive for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*-antibodies with a commercial milk enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in Ontario and western Canada." Can Vet J **53**(9): 963-970.

Stabel, J. (2010). Immunology of Paratuberculosis Infection and Disease. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. M. A. Behr and D. Collins. Wallingford, Oxfordshire, CAB International: 230-243.

Stabel, J. R. (1996). "Production of gamma-interferon by peripheral blood mononuclear cells: an important diagnostic tool for detection of subclinical paratuberculosis." J Vet Diagn Invest **8**(3): 345-350.

Stabel, J. R. (2000). "Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*." Vet Microbiol **77**(3-4): 465-473.

Stabel, J. R. and J. P. Bannantine (2005). "Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples." J Clin Microbiol **43**(9): 4744-4750.

Stabel, J. R., S. J. Wells and B. A. Wagner (2002). "Relationships between fecal culture, ELISA, and bulk tank milk test results for Johne's disease in US dairy herds." J Dairy Sci **85**(3): 525-531.

Stevenson, K. (2010). Comparative Differences between Strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. M. A. Behr and D. M. Collins. Wallingford, Oxfordshire, CAB International: 126-137.

Stevenson, K. (2015). "Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and the influence of strain type on infection and pathogenesis: a review." Vet Res **46**: 64.

Streeter, R. N., G. F. Hoffsis, S. Bech-Nielsen, W. P. Shulaw and D. M. Rings (1995). "Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows." Am. J. Vet. Res. **56**(10): 1322-1324.

Sweeney, R. W. (1996). "Transmission of paratuberculosis." Vet Clin North Am Food Anim Pract **12**(2): 305-312.

Sweeney, R. W. (2011). "Pathogenesis of paratuberculosis." Vet Clin North Am Food Anim Pract **27**(3): 537-546, v.

Sweeney, R. W., M. T. Collins, A. P. Koets, S. M. McGuirk and A. J. Roussel (2012). "Paratuberculosis (Johne's disease) in cattle and other susceptible species." J Vet Intern Med **26**(6): 1239-1250.

Sweeney, R. W., J. Uzonna, R. H. Whitlock, P. L. Habecker, P. Chilton and P. Scott (2006). "Tissue predilection sites and effect of dose on *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* organism recovery in a short-term bovine experimental oral infection model." Res Vet Sci **80**(3): 253-259.

Sweeney, R. W., R. H. Whitlock and A. E. Rosenberger (1992). "*Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows." J Clin Microbiol **30**(1): 166-171.

Tavornpanich, S., I. A. Gardner, R. J. Anderson, S. Shin, R. H. Whitlock, T. Fyock, J. M. Adaska, R. L. Walker and S. K. Hietala (2004). "Evaluation of microbial culture of pooled fecal samples for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in large dairy herds." Am J Vet Res **65**(8): 1061-1070.

Tavornpanich, S., S. J. Wells, C. P. Fossler, A. J. Roussel and I. A. Gardner (2012). "Evaluation of an alternative method of herd classification for infection with paratuberculosis in cattle herds in the United States." Am J Vet Res **73**(2): 248-256.

Timms, V. J., M. M. Gehringer, H. M. Mitchell, G. Daskalopoulos and B. A. Neilan (2011). "How accurately can we detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection?" J Microbiol Methods **85**(1): 1-8.

Tiwari, A., J. A. VanLeeuwen, I. R. Dohoo, G. P. Keefe, J. P. Haddad, H. M. Scott and T. Whiting (2009). "Risk factors associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* seropositivity in Canadian dairy cows and herds." Prev Vet Med **88**(1): 32-41.

Trotz-Williams, L. A., S. W. Martin, K. E. Leslie, T. Duffield, D. V. Nydam and A. S. Peregrine (2008). "Association between management practices and within-herd prevalence of *Cryptosporidium parvum* shedding on dairy farms in southern Ontario." Prev Vet Med **83**(1): 11-23.

Trotz-Williams, L. A., S. Wayne Martin, K. E. Leslie, T. Duffield, D. V. Nydam and A. S. Peregrine (2007). "Calf-level risk factors for neonatal diarrhea and shedding of *Cryptosporidium parvum* in Ontario dairy calves." Prev Vet Med **82**(1): 12-28.

Turenne, C. Y. and D. C. Alexander (2010). *Mycobacterium avium* Complex. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. M. A. Behr and D. M. Collins. Wallingford, Oxfordshire, CAB International: 60-72.

USDA-APHIS-VS. (2010, 2010-09-01). "Uniform Program Standards for the Voluntary Bovine Johne's Disease Control Program." Retrieved 2017-09-01, 2017, from https://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_diseases/johnes/downloads/johnes-ups.pdf.

USDA (2008) "Johne's Disease on US Dairies, 1991-2007."

van Schaik, G., F. Haro, A. Mella and J. Kruze (2007). "Bayesian analysis to validate a commercial ELISA to detect paratuberculosis in dairy herds of southern Chile." Prev Vet Med **79**(1): 59-69.

Vazquez, P., J. M. Garrido and R. A. Juste (2013). "Specific antibody and interferon-gamma responses associated with immunopathological forms of bovine paratuberculosis in slaughtered Friesian cattle." PLoS One **8**(5): e64568.

Verdugo, C., E. Pleydell, M. Price-Carter, D. Prattley, D. Collins, G. de Lisle, H. Vogue, P. Wilson and C. Heuer (2014). "Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis isolated from sheep, cattle and deer on New Zealand pastoral farms." Prev Vet Med **117**(3-4): 436-446.

Vilar, A. L. T., C. S. A. B. Santos, C. L. R. M. Pimenta, T. D. Freitas, A. W. L. Brasil, I. J. Clementino, C. J. Alves, C. S. Bezerra, F. Riet-Correa, T. S. Oliveira and S. S. Azevedo (2015). "Herd-level prevalence and associated risk factors for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in cattle in the State of Paraíba, Northeastern Brazil." Prev Vet Med **121**(1/2): 49-55.

Waddell, L., A. Rajić, K. Stärk and S. A. McEwen (2016). "*Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis detection in animals, food, water and other sources or vehicles of human exposure: A scoping review of the existing evidence." Prev Vet Med **132**: 32-48.

Waddell, L. A., A. Rajic, K. D. Stark and E. S. Mc (2015). "The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis: a systematic review and meta-analyses of the evidence." Epidemiol Infect **143**(15): 3135-3157.

Waddell, L. A., A. Rajic, K. D. Stark and S. A. McEwen (2016). "The potential Public Health Impact of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis: Global Opinion Survey of Topic Specialists." Zoonoses Public Health **63**(3): 212-222.

Weber, M. F., J. Kogut, J. de Bree, G. van Schaik and M. Nielen (2010). "Age at which dairy cattle become *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis faecal culture positive." Prev Vet Med **97**(1): 29-36.

Weber, M. F., G. van Schaik, M. Aalberts and A. G. J. Velthuis (2014). Milk Quality Assurance for Paratuberculosis: Progress Obtained in the Cohort of Dairy Herds that Entered the Program in 2006-2007. 4th ParaTB Forum, Parma, Italy.

Weber, M. F., J. Verhoeff, G. van Schaik and C. van Maanen (2009). "Evaluation of Ziehl-Neelsen stained faecal smear and ELISA as tools for surveillance of clinical paratuberculosis in cattle in the Netherlands." Prev Vet Med **92**(3): 256-266.

Wells, S. J., S. M. Godden, C. J. Lindeman and J. E. Collins (2003). "Evaluation of bacteriologic culture of individual and pooled fecal samples for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in dairy cattle herds." J Am Vet Med Assoc **223**(7): 1022-1025.

Wells, S. J., R. H. Whitlock, C. J. Lindeman and T. Fyock (2002). "Evaluation of bacteriologic culture of pooled fecal samples for detection of *Mycobacterium paratuberculosis*." Am J Vet Res **63**(8): 1207-1211.

Whipple, D. L., D. R. Callihan and J. L. Jarnagin (1991). "Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure." J Vet Diagn Invest **3**(4): 368-373.

Whitlock, R. H. and C. Buergelt (1996). "Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology)." Vet Clin North Am Food Anim Pract **12**(2): 345-356.

Whitlock, R. H. and Rosenberg, A. E. (1990) Fecal culture protocol for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. A recommended procedure. In: Proceedings of the Annual Meeting of the United States Animal Health Association. US Animal Health Association, Richmond, Virginia: 280-285.

Whittington, R. J. (2009). "Factors affecting isolation and identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from fecal and tissue samples in a liquid culture system." J Clin Microbiol **47**(3): 614-622.

Whittington, R. J. (2010). Cultivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. M. A. Behr and D. Collins. Wallingford, Oxfordshire, CAB International: 244-266.

Whittington, R. J., D. J. Marshall, P. J. Nicholls, I. B. Marsh and L. A. Reddacliff (2004). "Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment." Appl. Environ. Microbiol. **70**(5): 2989-3004.

Whittington, R. J. and E. S. G. Sergeant (2001). "Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in animal populations." Aust Vet Journal **79**(4): 267-278.

Whittington, R. J. and P. A. Windsor (2009). "In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis." Vet J **179**(1): 60-69.

Windsor, P. A. and R. J. Whittington (2010). "Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease." Vet. J. **184**(1): 37-44.

Wolf, R., H. W. Barkema, J. De Buck and K. Orsel (2015). "Factors affecting management changes on farms participating in a Johne's disease control program." J. Dairy Sci. **98**(11): 7784-7796.

Wolf, R., H. W. Barkema, J. De Buck and K. Orsel (2015). "Sampling location, herd size, and season influence *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* environmental culture results." J. Dairy Sci. **98**(1): 275-287.

Wolf, R., H. W. Barkema, J. De Buck, M. Slomp, J. Flaig, D. Hauptstein, C. Pickel and K. Orsel (2014). "High herd-level prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Western Canadian dairy farms, based on environmental sampling." J. Dairy Sci. **97**(10): 6250-6259.

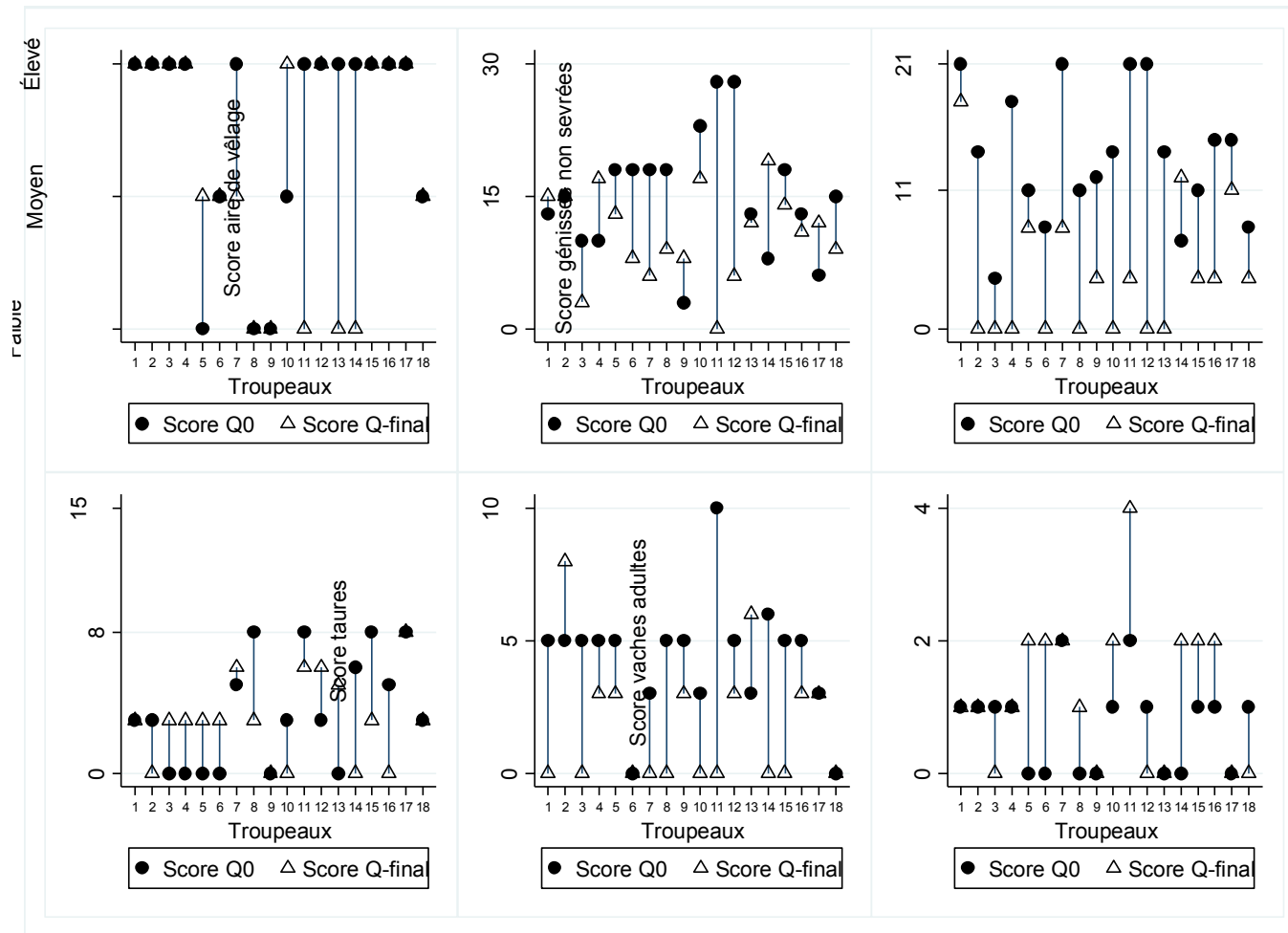
Wolf, R., F. Clement, H. W. Barkema and K. Orsel (2014). "Economic evaluation of participation in a voluntary Johne's disease prevention and control program from a farmer's perspective—The Alberta Johne's Disease Initiative." J. Dairy Sci. **97**(5): 2822-2834.

Wolf, R., K. Orsel, J. De Buck and H. W. Barkema (2015). "Calves shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* are common on infected dairy farms." Vet Res **46**: 71.

Worster, A. and C. Carpenter (2008). "Incorporation bias in studies of diagnostic tests: how to avoid being biased about bias." Cjem **10**(2): 174-175.

ANNEXES

Annexe 1. Comparaison du score à l'adhésion (Q0) et du score final (Q-final) par ferme et par section du questionnaire.



Ce graphique présente l'analyse du score initial (lors de l'adhésion au PVQPCP : Q0) et final (le score au dernier questionnaire disponible : Q-final) pour chaque ferme et pour chaque section du questionnaire ainsi que pour la question sur les achats. Le score du questionnaire est la somme du score de plusieurs questions se rapportant à des pratiques sur différents groupes d'âge à la ferme.

On peut constater que dans 8 sur les 18 troupeaux de l'étude, le Q-final pour la section des vaches adultes était plus élevé que Q0. Le risque lié aux achats était le même lors du Q0 et Q-final dans la plupart des troupeaux (élevé dans 8 troupeaux, moyen dans 2 troupeaux et faible dans 2 troupeaux). Une amélioration du risque lié aux achats a été observée dans 5 troupeaux dont 3 ont atteint un risque jugé faible au Q-final tandis qu'une détérioration du risque a été observée dans le dernier troupeau qui a passé de moyen lors du Q0 à élevé lors du Q-final. Une diminution du Q-final par rapport au Q0 a été observée dans les sections du questionnaire concernant les animaux les plus susceptibles à l'infection (aire de vêlage, génisses non sevrées et génisses sevrées) pour la majorité des troupeaux de l'étude. Les plus grands changements ont été observés dans la section concernant les génisses non sevrées dans laquelle nous avons observé une réduction dans presque tous les troupeaux (17 troupeaux sur 18). Nous avons observé également une diminution pour la section aire de vêlage (11 troupeaux). Le Q0 et Q-final de la section concernant les génisses sevrées étaient toujours en dessous de 9 points sur les 15 points possibles pour cette section pour l'ensemble des troupeaux de l'étude.

Annexe 2

Evaluation of a PCR assay on overgrown individual fecal samples cultured for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Saray Rangel, Juan C. Arango-Sabogal, Olivia Labrecque, Julie Paré, Julie-Hélène Fairbrother, Sébastien Buczinski, Jean-Philippe Roy, Geneviève Côté, Vincent Wellemans, Gilles Fecteau¹

Détails du rôle du candidat: Je suis le deuxième auteur de l'article. J'ai participé dans l'analyse, et l'interprétation des données ainsi que dans la rédaction de l'article.

Article publié dans Journal of Veterinary Diagnostic Investigation en août 2017.

Abstract. Microbial overgrowth can interfere with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) growth and detection. We estimated the percentage of positive samples by PCR performed on the incubated media of individual fecal samples classified as non-interpretable (NI) by bacteriologic culture of liquid media. A total of 262 liquid cultures declared NI and 88 samples declared negative were included in the study. MAP DNA was detected in 7 NI samples (2.7%; 95% CI: 1.1–5.4%) and in 1 negative sample (1.1%; 95% CI: 0.3–6.2%). The PCR allowed the detection of MAP-positive samples that had been missed in the initial bacteriologic culture. However, the benefit of these few additional positive results must be weighed against the additional costs incurred. Using PCR to classify overgrown cultures optimizes the detection process and eliminates the NI outcome.

Key words: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*; overgrown individual fecal cultures; PCR.

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) is the etiologic agent of paratuberculosis, a chronic incurable contagious enteric disease of ruminants found the world over.⁶ Fecal culture is challenging because the presence of normal microbial flora may interfere with the slow growth and identification of MAP.¹⁰ Nevertheless, bacteriologic culture remains the reference antemortem detection test despite the overgrowth of other microorganisms, the long laboratory turnaround time, and the relatively high cost.¹⁰ To reduce microbial overgrowth, a decontamination step is performed before samples are inoculated into the culture medium. This step involves double incubation centrifugation and the addition of antimicrobials to the culture medium prior to incubation in the automated system. After incubation, confirmation of MAP detection is made by phenotypic or genotypic techniques such as acid-fast bacilli (AFB) stain or PCR.

When microbial overgrowth occurs and MAP is not identified by AFB, culture results are classified as non-interpretable (NI). This outcome does not provide useful information. The proportion of overgrown samples (classified as NI) is variable across studies (0.13–60%)¹⁰ and is associated with multiple factors such as diet, geographic location, or culture medium used.⁹ A previous study evaluating a PCR assay found MAP DNA in 1.6% of the NI environmental samples² when applied on NI environmental samples before and after incubation of the samples in an automated system. The NI environmental samples in that study ($n = 62$) were matched by farm, environmental site, and sampling season with 62 negative environmental samples. All of the available positive environmental samples ($n = 30$) were also analyzed.

We evaluated the overgrowth of samples cultured for MAP but from a different perspective: using individual fecal samples. Environmental samples contain substances that may inhibit MAP identification by PCR. Because inhibitors present in environmental samples may differ from those present in individual fecal samples,⁷ the proportion of samples found positive by PCR might be different among NI individual fecal samples and NI environmental samples.

PCR inhibitors are a very heterogeneous group of organic and inorganic chemical substances. Fecal samples contain highly variable components depending on nutrition, environment, and other factors. Polysaccharides are the most common inhibitors found in fecal samples (as well as chlorophyll, bile salts, urea, and glycolipids). Inhibitors contribute to the

Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada (Arango- Sabogal, Rangel, Buczinski, Roy, Wellemans, Fecteau); Laboratory of Epidemiological Animal Surveillance of Québec (Labrecque, Fairbrother); Laboratory and Animal Health General Direction (Côté); and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food of Québec, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, and Canadian Food Inspection Agency, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada (Paré).

¹Corresponding author: Gilles Fecteau, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, CP 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6. gilles.fecteau@umontreal.ca

degradation or sequestration of nucleic acids, changing the chemical properties of nucleic acids, and inhibiting DNA polymerase or reverse transcriptase activity.⁷ Our objective was to estimate the percentage of positive samples by PCR performed on the incubated media of individual fecal samples classified as NI.

Stored individual fecal samples analyzed as part of other paratuberculosis research projects were selected based on culture result. In 2010, 1,276 individual fecal samples from 17 dairy farms were analyzed. Of these, 262 (20%) were NI and were included in our study. Negative samples ($n = 88$) were prospectively selected among negative cultures collected from 3 herds in 2011.

Individual fecal samples were initially processed as described previously,¹ following the recommendations of the manufacturer and the U.S. Department of Agriculture (USDA; Harris B, et al. Laboratory methods for isolation and identification of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (Johne's disease). Ames, IA: USDA, National Veterinary Services Laboratories, 2009). Isolation of MAP was achieved using a liquid medium (MGIT Para TB culture medium, BD, Franklin Lakes, NJ) and an automated system (BACTEC MGIT 960 system, BD); MAP culture was performed at the Québec Animal Disease Surveillance Laboratory in Saint-Hyacinthe (Québec, Canada).

An initial 3-d decontamination was carried out on the samples. Initially, a 2 ± 0.2 g sample of feces was diluted into 17.5 mL of sterile distilled water and allowed to settle at room temperature for 30 min. Then, 2.5 mL of the supernatant was transferred aseptically to a 50-mL tube containing 2.5 mL of 15% yeast extract and 0.2 mL of 10% sodium pyruvate. This solution was mixed briefly and incubated for 90 min at $36 \pm 1^\circ\text{C}$. For each fecal sample preparation, 0.3 mL of sterile 5% malachite green solution was added to a solution of 25 mL of sterile half-strength brain heart infusion (BHI) medium and 0.9% hexadecylpyridinium chloride (HPC). Finally, all 5.2 mL of the feces-germination mix were added to the BHI-HPC solution to complete a 30-mL decontamination suspension, which was vortexed briefly and incubated overnight (18–24 h) at $36 \pm 1^\circ\text{C}$. The next day, this decontaminated suspension was centrifuged for 30 min at $900 \times g$. The supernatant was gently poured off. Then, 1 mL of an antibiotic mix (vancomycin at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, nalidixic acid at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and potency-adjusted amphotericin B at 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added to the pellet. The suspension was incubated overnight (18–24 h) at $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Also, 1.5 mL of an additive cocktail was added to each culture tube (BD MGIT Para TB culture media, BD). The additive cocktail was composed of bovine albumin, catalase, casein, oleic acid, egg yolk enrichment, sterile water, and antimicrobials (2.5% vancomycin, 2.5% nalidixic acid, and 1% amphotericin B). The tubes were held in a biosafety cabinet at room temperature for 18–24 h. On the third day of the fecal sample processing, the concentrated specimen suspension was mixed by swirling, and 0.1 mL was inoculated into the commercial culture tubes before they were introduced into the automated system (BACTEC MGIT 960 system, BD).

The samples were incubated in the automated system for 49 d. For samples flagged as positive by the automated system, an AFB stain (TB fluorescent stain kit, Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, Canada) was performed, and the remaining incubated medium was stored at -80°C for further analysis if required. If the AFB stain was positive, samples were analyzed (TaqMan MAP [Johne's] reagents, Applied Biosystems, Foster City, CA), DNA extraction was performed (MagMax total nucleic isolation kit, Applied Biosystems), and amplification was achieved using the reagents recommended by the manufacturer. A quantification cycle (Cq) value was used to establish a cutoff to discriminate positive from negative results. Samples were declared positive if $\text{Cq} < 37$. The results of these tests were interpreted as described previously² and according to USDA recommendations (Harris B, et al. Laboratory methods). Four scenarios were possible for each sample: (1) absence of growth: considered MAP negative; (2) positive result by the automated system but negative AFB staining: considered NI; (3) positive result by the automated system and positive AFB staining but PCR negative: classified as *Mycobacteria* other than MAP; (4) positive by all 3 tests (automated system, AFB stain, and PCR): considered MAP positive.

The incubated media for NI and negative samples were analyzed using the commercial real-time PCR (TaqMan MAP [Johne's] reagents, Applied Biosystems) described previously. Distribution of data was graphically assessed with histograms and normal probability plots. Descriptive analyses were used to estimate the proportion and the 95% confidence intervals (95% CI) of PCR-positive samples among the NI and negatives samples.

After collection, fecal samples were initially stored at -80°C for 71 d on average (range: 7–121 d; median = 60 d; 25% percentile = 56 d; 75% percentile = 91 d) until they were processed for initial MAP culture. The average freezing time for NI samples was 65 days (range: 7–99 d; median = 57 d; 25% percentile = 56 d; 75% percentile = 77 d). For negative samples, mean freezing time was 88 d (range: 53–121 d; median = 93 d; 25% = 69 d; 75% = 108 d). After the initial culture, the incubated media of both NI and negative samples were stored at -80°C for 483 d on average (range: 146–655 d; median = 554; 25% percentile = 168; 75% percentile = 626) until the PCR analysis was performed. It has been suggested that the detection of MAP DNA should not be influenced by the freezing period (especially with a holding temperature of -70°C and with no repetitive freezing and thawing).³ Hence, in theory, despite a possible decrease in viable MAP, the MAP PCR should be able to detect the target DNA.³

Time to detection was recorded for initial bacteriologic culture of NI samples. Mean time to detection was 26 d (95% CI:

24.7–27.6), and 64% ($n = 168$ of 262) of these samples signaled positive before 30 d of incubation.

Overall, MAP DNA was found in 8 of the 350 fecal samples analyzed. The PCR-positive samples originated from 5 different farms. Among NI samples ($n = 262$), MAP DNA was found in 7 samples (2.7%; 95% CI: 1.1–5.4%) collected from 4 MAP-positive farms. Among the negative samples ($n = 88$), 1 sample was positive by PCR (1.1%; 95% CI: 0.3– 6.2%). This sample was collected from a farm presumed to be negative for MAP.

If only the herds from which NI samples were obtained ($n = 13$; Table 1) are considered, the mean percentage of NI samples by herd was 19.6% (min: 0.9%; max: 65.0%). However, in 7 of these herds, the percentage of NI samples was <9%. All of the positive PCR results originated from samples taken from 4 herds with a percentage of NI samples >30%. During whole herd screening, 3 of these herds had been identified as MAP positive by at least 1 positive fecal culture (herds: I, K, and L). The herd that had not been identified previously as MAP positive (herd M) had the highest percentage of NI samples (65%) and the highest number of PCR-positive NI samples ($n = 3$; Table 1).

MAP DNA was recovered from 2.7% of NI samples from infected farms. NI samples are believed to be the consequence of the fast growth of other microorganisms that survived the decontamination process.¹⁰ These microorganisms were detected by the automated system and could have competed with and/or inhibited the growth of MAP, thus preventing identification of MAP by AFB staining and lowering the diagnostic sensitivity of culture. There is also a possibility that very low quantities or nonviable MAP were present in those samples. Given that the PCR assay used in our study has a diagnostic specificity estimated to be 100%,⁵ false positives are not likely. Microbial overgrowth can interfere with PCR⁹ because inhibitors in the sample can change the chemical properties of nucleic acids.⁷ Hence, it appears that false negatives are more likely to occur than false positives.

MAP DNA was recovered from one negative sample. The history of the PCR-positive sample from the negative group was examined. This sample originated from a 7.5-y-old Holstein cow with 120 d in milk at the time of sampling. This cow was sampled again during another study¹ with a negative result, and the herd it resided in has never been identified as MAP positive. Given these facts, this PCR result is likely a false-positive result. Avoiding false-positive results is one of the critical control points of laboratory procedures.⁴ False positives could be the consequence of cross-contamination at different steps of the laboratory process (e.g., between samples or previous PCR products).⁴

Obtaining a NI result can be frustrating for laboratories, veterinarians, and producers, considering the long and costly process of bacteriologic culture and given that the animal or herd status remains in question. The purpose of our study was to estimate the percentage of NI samples that could be MAP- positive. We also considered analyzing the consequences and benefits of using PCR on individual fecal samples declared NI (Table 2). Upon attaining an NI sample, a decision of whether to perform a PCR on the sample has to be made. The benefit of performing a PCR on all NI fecal samples (collected from individual cows) is limited by the cost and the apparently small percentage of positive samples that might be recovered. Moreover, a positive PCR result only indicates that MAP DNA is present in the sample but does not provide information about the viability of the pathogen. The true infection status of the animal sampled may or may not be reflected by the PCR result. At the herd level, this positive PCR result indicates the presence of MAP on the farm. However, if the goal is to determine herd status, individual fecal sampling is not the most cost-efficient strategy.⁸ An alternative approach may be to consider NI samples as negative, without performing the PCR. In our study, using this approach would have misclassified <3% of the animals.

In our study, the percentage of NI samples was highly variable among herds. Although the percentage was acceptable for several herds, in some herds the percentage was extremely high. We also observed that all of the positive PCR results were obtained from samples that originated from herds with a high percentage of NI samples. Running a PCR on NI samples can contribute to recovering positive samples that were missed by culture as a result of microbial overgrowth and can help identify an additional MAP-positive herd (e.g., herd M). Performing a PCR on herds with a high percentage of NI results for individual fecal samples (e.g., >20–30%) may be useful to gain confidence in individual and herd MAP status.

Declaration of conflicting interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This study was funded by Pfizer-Zoetis and the “Programme de Soutien à l’Innovation en Agroalimentaire” of Ministry of Agriculture, Fisheries and Food of Québec.

Table 1. Distribution of positive samples by PCR performed on incubated medium of non-interpretable (NI) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* individual fecal cultures in 13 Québec dairy herds.*

Farm	Herd size	No. of positive individual fecal cultures	No. of NI samples	No. of NI samples positive by PCR on incubated medium
A	105	0	1 (0.9)	0
B	79	0	1 (1.3)	0
C	61	1 (1.6)	1 (1.6)	0
D	40	0	1 (2.5)	0
E	69	2 (2.9)	2 (2.9)	0
F	56	5 (8.9)	5 (8.9)	0
G	45	14 (31.1)	4 (8.9)	0
H	22	0	4 (18.2)	0
I	252	10 (3.9)	80 (31.7)	2 (2.5)
J	44	1 (2.3)	15 (34.1)	0
K	80	5 (6.3)	29 (36.3)	1 (3.4)
L	67	6 (9.0)	28 (41.8)	1 (3.6)
M	140	0	91 (65.0)	3 (3.3)
Total	1,060	44 (4.2)	262 (24.7)	7 (2.7)

NI (non-interpretable) = a sample positive in the incubation and negative to the acid-fast bacilli stain. Numbers in parentheses are percentages.

* PCR was performed using a commercial system (TaqMan MAP [Johne's] reagents, Applied Biosystems, Foster City, CA) and automated nucleic isolation (MagMax total nucleic isolation kit, Applied Biosystems).

Use of PCR on overgrown individual MAP cultures

915

Table 2. Consequences or benefits of using PCR on non-interpretable (NI) samples cultured for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Sample status	Perform PCR?	PCR result	Conclusion	Consequences or benefits
NI	Yes	+	Positive sample	Confirms the presence of MAP DNA: —Herd status: indicates presence of MAP on the farm —Individual status: result confirms the presence of MAP but not necessarily infection with MAP
	Yes	–	Negative sample	Increase of testing costs (97% of NI are PCR negative)
	No	NA	Samples considered negative	Misclassification of 3% of the NI samples; cost efficient

NA = not applicable; NI (non-interpretable) = a sample positive to the incubation and negative to the acid-fast bacilli stain.

1. Arango-Sabogal JC, et al. Detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in tie-stall dairy herds using a standardized environmental sampling technique and targeted pooled samples. *Can J Vet Res* 2016;80:175–182.
2. Arango-Sabogal JC, et al. Evaluation of a PCR assay on overgrown environmental samples cultured for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *J Vet Diagn Invest* 2016;28:638–645.
3. Bölske G, et al. Diagnosis of paratuberculosis by PCR. In: Behr MA, Collins DM, eds. *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. Wallingford, UK: CAB International, 2010:267–283.
4. Cai HY, et al. Nonculture molecular techniques for diagnosis of bacterial disease in animals: a diagnostic laboratory perspective. *Vet Pathol* 2014;51:341–350.
5. Leite FL, et al. Comparison of fecal DNA extraction kits for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 2013;25:27–34.
6. Lombard JE. Epidemiology and economics of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2011;27:525–535.
7. Schrader C, et al. PCR inhibitors—occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol* 2012;113:1014–1026.
8. Sweeney RW, et al. Paratuberculosis (Johne’s disease) in cattle and other susceptible species. *J Vet Intern Med* 2012;26:1239–1250.
9. Whittington RJ. Factors affecting isolation and identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from fecal and tissue samples in a liquid culture system. *J Clin Microbiol* 2009;47:614–622.
10. Whittington RJ. Cultivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: Behr MA, Collins D, eds. *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. Wallingford, UK: CAB International, 2010:244–266.

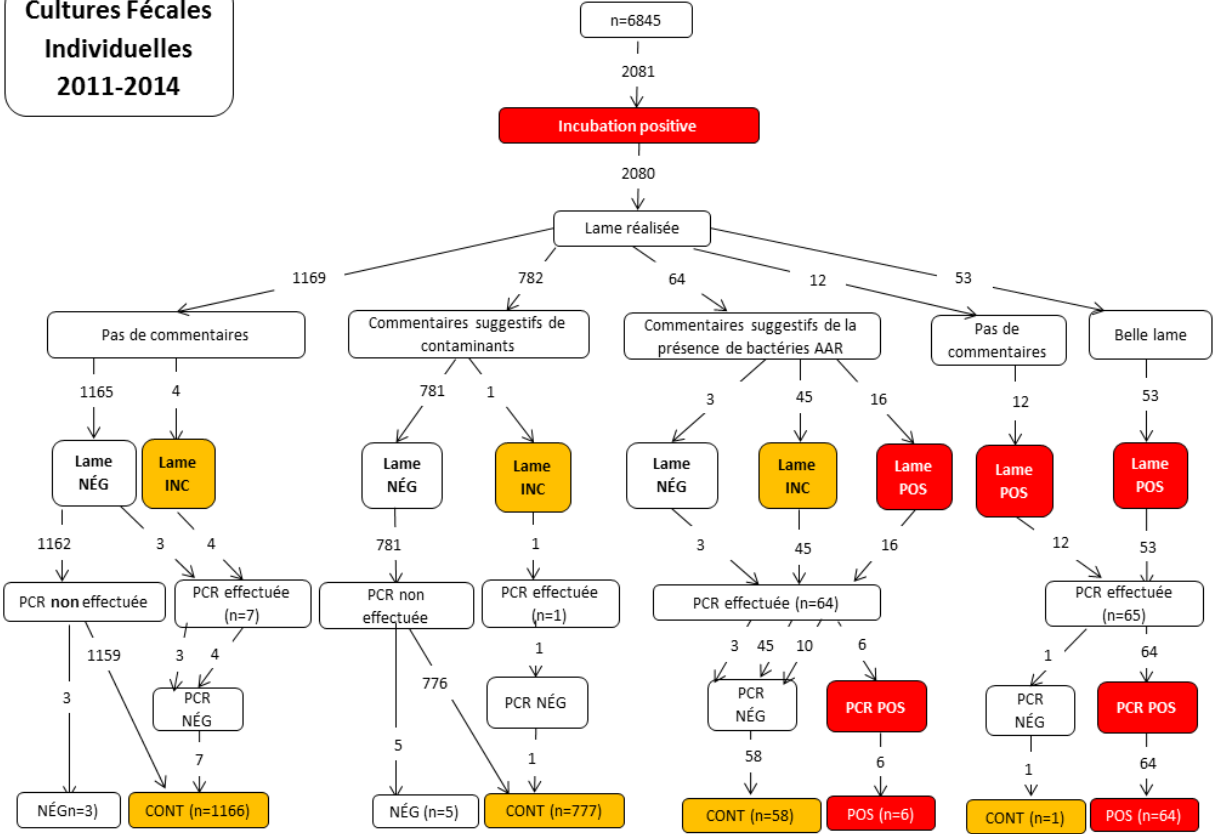
Annexe 3. Schéma décrivant les résultats possibles des échantillons individuels donnant un signal positif dans un système automatisé d'incubation utilisé dans le processus de culture de *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*.

Nous avons fait aussi une analyse rétrospective des résultats aux étapes du protocole de culture bactérienne de MAP pour les échantillons individuels traités au laboratoire entre 2011 et 2014. Au total, 6845 échantillons individuels ont été analysés au LÉAQ entre 2011 et 2014. Parmi eux, 2081 étaient positifs à l'incubation dans le système automatisé. Une lame pour coloration AAR a été réalisée sur 2080 échantillons. Quatre catégories de commentaires ont été faites par les techniciens lors de la lecture des lames :

1. Pas de commentaires : aucun commentaire n'est fait, normalement cela devrait survenir en absence de bactéries AAR ou d'autres microorganismes. Ce pourrait être aussi dû à une erreur de saisi (4^e colonne du graphique).
2. Commentaires suggestifs de la présence de contaminants : lorsque d'autres microorganismes différents aux bactéries AAR sont observés.
3. Commentaires suggestifs de la présence de bactéries AAR : lorsque des bactéries AAR sont observées même en présence d'autres microorganismes.
4. Belle lame : des bactéries AAR typiques sont observées.

Cette analyse nous a permis de constater encore une fois l'importance de l'interprétation des lames pour coloration AAR dans le processus de culture. Lorsque le commentaire « belle lame » est utilisé pour qualifier une lame, la PCR n'ajoute pas d'information additionnelle, car presque tous les échantillons donnent un résultat positif à la PCR. Par contre, l'utilisation de la PCR devient intéressante lorsqu'un commentaire suggestif de la présence de contaminants est fait à la lecture de la lame. Les résultats de l'étude 3 et l'analyse des résultats de la banque du laboratoire nous permettent de conclure que la lame pour coloration AAR réalisée sur le milieu de culture après l'incubation et par du personnel technique bien entraîné est une méthode économique pour confirmer les échantillons positifs à l'incubation. Utiliser seulement la coloration AAR pourrait être une option moins coûteuse, mais qui requiert plus de temps par rapport à la PCR.

Cultures Fécales Individuelles 2011-2014



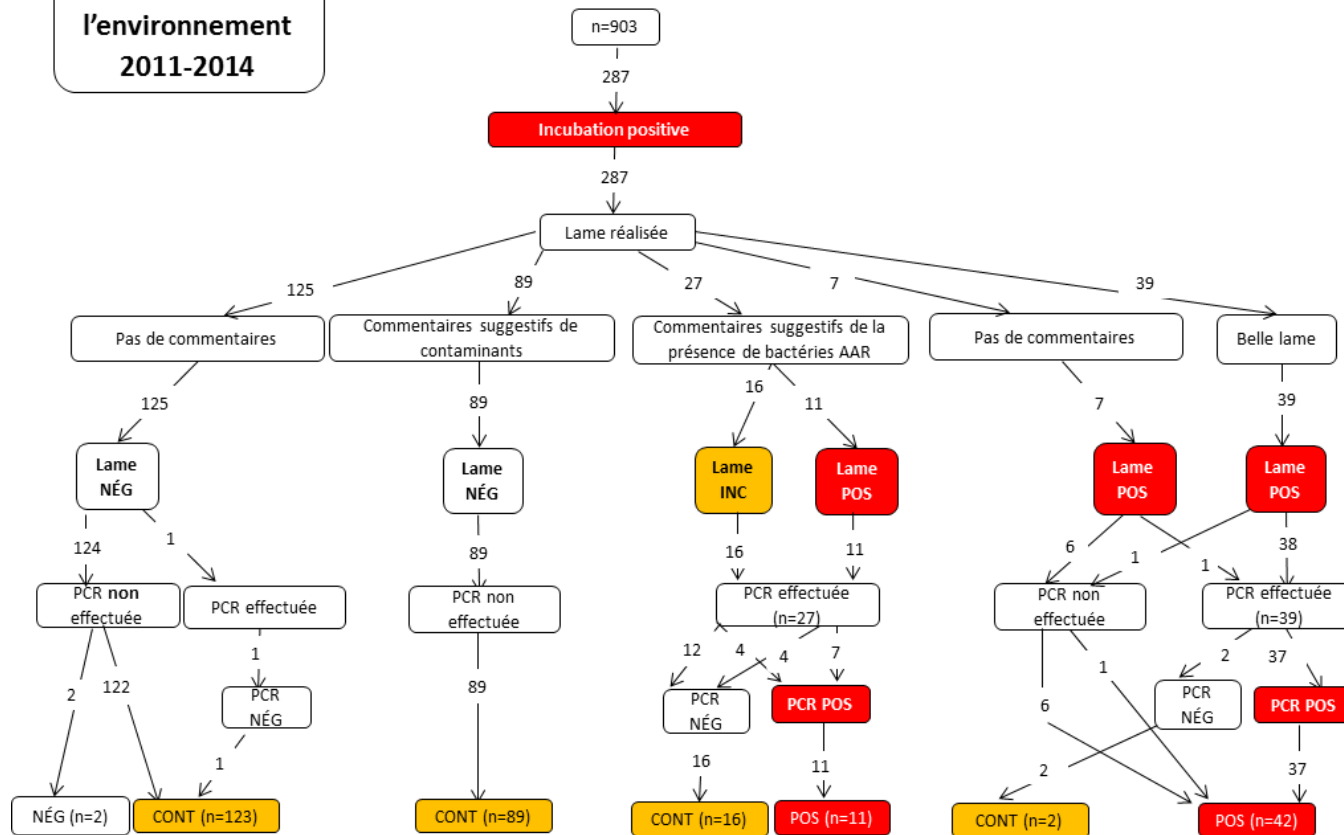
Annexe 4. Schéma décrivant les résultats possibles des échantillons de l'environnement donnant un signal positif dans un système automatisé d'incubation utilisé dans le processus de culture de *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*.

Nous avons fait aussi une analyse rétrospective des résultats aux étapes du protocole de culture bactérienne de MAP pour les échantillons de l'environnement traités au laboratoire entre 2011 et 2014. Au total, 903 échantillons individuels ont été analysés au LÉAQ entre 2011 et 2014. Parmi eux, 287 étaient positifs à l'incubation dans le système automatisé et une lame pour coloration AAR a été réalisée. Quatre catégories de commentaires ont été faites par les techniciens lors de la lecture des lames :

1. Pas de commentaires : aucun commentaire n'est fait, normalement cela devrait survenir en absence de bactéries AAR ou d'autres microorganismes. Ce pourrait être aussi dû à une erreur de saisi (4^e colonne du graphique).
2. Commentaires suggestifs de la présence de contaminants : lorsque d'autres microorganismes différents aux bactéries AAR sont observés.
3. Commentaires suggestifs de la présence de bactéries AAR : lorsque des bactéries AAR sont observées même en présence d'autres microorganismes.
4. Belle lame : des bactéries AAR typiques sont observées.

Cette analyse nous a permis de constater encore une fois l'importance de l'interprétation des lames pour coloration AAR dans le processus de culture. Lorsque le commentaire « belle lame » est utilisé pour qualifier une lame, la PCR n'ajoute pas d'information additionnelle, car presque tous les échantillons donnent un résultat positif à la PCR. Par contre, l'utilisation de la PCR devient intéressante lorsqu'un commentaire suggestif de la présence de contaminants est fait à la lecture de la lame. Les résultats de l'étude 3 et l'analyse des résultats de la banque du laboratoire nous permettent de conclure que la lame pour coloration AAR réalisée sur le milieu de culture après l'incubation et par du personnel technique bien entraîné est une méthode économique pour confirmer les échantillons positifs à l'incubation. Utiliser seulement la coloration AAR pourrait être une option moins coûteuse, mais qui requiert plus de temps par rapport à la PCR.

Échantillons de l'environnement 2011-2014



Annexe 5

7 NUMÉROS DU BULLETIN : INFO PARATUB

Info PARATUB 01

01
novembre
2013

Introduction :

Le 5 septembre dernier, nous avons eu notre rencontre d'information avec les médecins vétérinaires collaborateurs des projets portant sur la paratuberculose. Nous avons présenté les projets réalisés et ceux en cours ainsi que quelques résultats préliminaires. Un rappel sur la maladie et quelques principes épidémiologiques de base nous ont amenés à comprendre le défi que représente le diagnostic de la paratuberculose. Nous avons parlé aussi de la culture bactériologique de fèces en passant par toutes les étapes que suivent les échantillons de la ferme au résultat. Nous avons constaté la complexité du processus de la culture fécale. Il existe un problème avec la prolifération des autres microorganismes (bactéries et champignons) abondants dans les fèces. Une visite guidée par Dre Olivia Labrecque des installations du laboratoire d'épidémiosurveillance animale du Québec (LÉAQ) a suivi. Des résultats préliminaires et les explications sur le projet portant sur les mesures de biosécurité ont complété le programme de la rencontre. C'était un échange très enrichissant où nous pouvions avoir une rétroaction grâce aux commentaires, questions et suggestions.

Pourquoi ce bulletin?

Il a été suggéré de maintenir une réunion chaque année et d'établir des contacts par courriel pour vous tenir au courant des projets entre ces réunions annuelles. Vous y trouverez parfois des résultats partiels de nos projets, des articles ou des nouvelles sur la maladie. Nous avons le plaisir de vous présenter aujourd'hui le premier numéro de notre bulletin de nouvelles.

Identification de troupeaux laitiers : diagnostic par la culture standardisée de l'environnement

- a. Présentation du projet :** Plusieurs d'entre vous ont participé en 2011 à un projet sur les prélèvements de l'environnement (ENV) ayant comme objectif la validation de cette technique dans le contexte québécois. Nous avons des résultats à partager.
- b. Pourcentage d'échantillons positifs :** 24 fermes ont été visitées en été et automne 2011 pour faire des prélèvements individuels et de l'ENV (Tableau 1). MAP a été trouvé dans 30 des 402 échantillons de l'ENV prélevés (7.5 %). Pour la première visite (été), MAP a été identifié dans 7.1 % des échantillons (13/183) provenant de 5 fermes positives. Pour la deuxième visite (automne), 7.7 % des échantillons (17/219) provenant de 5 fermes ont été identifiés comme positifs. Deux fermes étaient positives autant l'été que l'automne.

Tableau 1. Résumé des données des prélèvements 2011.

Saison	Nombre de fermes prélevées		Nombre d'échantillons prélevés			
	Total	Statut présumé*	ENV		Culture fécale individuelle (CFI)	
			N	Positifs	N	Positifs
Été	20	16 (+) 4 (-)	183	13 (7,1 %)	1436	21 (1.5 %)
Automne	24	19 (+) 5 (-)	219	17 (7,7 %)	1681	24 (1.4 %)
Total			402	30 (7,5 %)		

* Le statut présumé était selon l'historique de la ferme

- c. Pourcentage de résultats positifs de l'ENV par site :** parmi les 9 échantillons obtenus de chaque ferme, les deux sites identifiés le plus souvent comme positifs autant l'été que l'automne étaient les bottes (15 % et 12.5 %) et la fosse (9.5 % et 10.4 %). MAP a aussi été isolée de l'écurieur (7 %) en été et du pool de vaches malades (16.7 %) en automne.
- d. Stratégie d'échantillonnage :** 8 fermes ont été identifiées comme positives par la technique des prélèvements de l'ENV en 2011, dont 2 étaient positives autant l'été que l'automne (Tableau 2). La combinaison fosse, écurieur et pool de vaches malades nous a

permis d'identifier 7 fermes; la huitième ferme a été détectée avec le pool de vaches maigres. Il est important de remarquer qu'à chaque fois qu'il y avait un échantillon positif issu des bottes, il y avait au moins un autre échantillon positif dans la ferme. Ce qui suggère une probabilité élevée de dissémination de la bactérie à l'intérieur de la ferme à travers ces éléments.

Tableau 2. Distribution des résultats positifs par site et par ferme

Fermes positives à l'ENV	Fosse	Écureur	Parc des veaux	Pool malades	Pool maigres	Bottes
A		+				+
B	+					
C*	+	+		+		+
D*	+	+	+	+	+	
E					+	
F				+		+
G	+					
H				+		
Nombre d'échantillons positifs par site	9	7	1	5	2	6
Nombre de fermes positives par site	4	3	1	4	2	4

*** Fermes positives tant l'été que l'automne**

Impact de l'application de mesures de biosécurité sur la diminution de l'incidence de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* dans les troupeaux laitiers du Québec

Nous avons un projet en cours qui a comme objectif de déterminer l'impact des mesures de biosécurité ciblées à chaque ferme sur l'incidence de paratuberculose. Nous allons évaluer plusieurs paramètres dans deux cohortes d'animaux : ceux nés avant et après l'adhésion du troupeau au programme volontaire québécois de prévention et contrôle de la paratuberculose. Ce projet comprend le suivi des animaux des troupeaux à statut positif pendant 5 ans (les années 1 et 2 sont déjà complétées, troisième année en cours). La

stratégie d'échantillonnage est semblable à celle du projet de l'environnement : 9 échantillons issus de l'ENV et un échantillon fécal et sanguin de tous les animaux de 24 mois et plus, ayant au moins une parité. Il n'y a aucuns frais pour le producteur.

Ce que nous vous demandons...

Pour arriver à déterminer le niveau de risque de chaque ferme, nous vous demandons de remplir un questionnaire d'évaluation de risque, de donner des recommandations et de faire le suivi des recommandations faites lors de votre évaluation l'année précédant. Les documents vous parviendront dans un courriel quelques jours après notre visite d'échantillonnage. Il y a un montant forfaitaire de 100 \$ pour remplir le questionnaire suite au retour des documents à l'adresse indiquée dans le courriel.

Suivez-vous des troupeaux positifs à la paratuberculose?

Nous avons encore du budget pour quelques troupeaux positifs qui seraient intéressés à mettre en place des mesures de contrôle de la paratuberculose. Si vous suivez de tels troupeaux, s'il vous plaît nous contacter rapidement, car ils devront avoir la première visite avant décembre 2013. Les critères d'inclusion sont :

- Troupeau à stabulation entravée.
- Troupeau à statut positif déterminé par la culture de l'ENV, la culture fécale individuelle, la nécropsie ou un cas clinique.
- Volonté de s'enrôler au programme volontaire.
- La plupart des animaux devront avoir été élevés sur la ferme (seulement quelques achats seront admissibles).
- Engagement du producteur à demeurer dans l'étude jusqu'à l'automne 2015.
- Nous accueillir pour notre visite de prélèvements à chaque été-automne pour les années 2013, 2014 et 2015.
- Avoir le suivi vétérinaire (visite du troupeau) et nous donner accès au dossier de santé animale.
- Idéalement, suivre les recommandations faites par le médecin vétérinaire chaque année.

Varias

- **État des prélèvements 2013** : La saison de prélèvements 2013 est en cours, nous avons visité 95 % des fermes. Plusieurs d'entre vous ont commencé à recevoir le courriel avec l'évaluation des recommandations de l'année passée, le questionnaire et les nouvelles recommandations. On remercie ceux qui l'ont déjà fait parvenir. Aux autres, on vous rappelle amicalement de les compléter.
- **Fichiers DSA** : lors de la réunion du 5 septembre on vous a manifesté notre besoin de compléter avec précision notre banque de données. Ceci est un long processus, autant pour les échantillonneurs que pour les producteurs, si l'on veut le faire au moment de la visite. Dès lors, on va commencer à vous demander, dans un courriel individuel, le fichier DSA de vos troupeaux et on le fera chaque année (quelques-uns d'entre vous nous l'ont déjà fait parvenir).

Remerciements

Au nom de l'équipe de chercheurs, je tiens à vous remercier pour votre collaboration.

Juan Carlos Arango Sabogal

Étudiant au PhD

Département de sciences cliniques, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal

Équipe de collaborateurs :

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal : **Sébastien Buczinski, Gilles Fecteau, Jean-Philippe Roy, Vincent Wellemans**

Agence Canadienne d'Inspection des Aliments : **Julie Paré**

Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) : **Geneviève Côté, Julie-Hélène Fairbrother, Olivia Labrecque**

Agriculture et Agroalimentaire Canada, Sherbrooke, Québec : **Nathalie Bissonnette**

Étudiantes à la maîtrise (finie et en cours) : **Elizabeth Doré, Saray Rangel**



Dans ce numéro :

- Pourcentage de fermes identifiées par la technique de prélèvements de l'environnement et par la culture fécale individuelle
- Profil inflammatoire de vaches atteintes de paratuberculose bovine
- Résumé de la 6e réunion canadienne des chercheurs sur le MAP
- Vidéo : « La maladie de Johne dans les troupeaux laitiers canadiens: Ce que ça représente pour les fermiers »
- Varias

Pourcentage des fermes positives confirmées par la technique de prélèvements de l'environnement (ENV) et par la culture fécale individuelle (CFI)

Dix-neuf fermes historiquement positives (statut initial) étaient enrôlées en 2011 dans le cadre du projet sur l'identification des troupeaux laitiers par la culture standardisée de l'environnement (9 échantillons de l'ENV par ferme). Parmi ces 19 fermes, visitées en été et automne, 11 ont été confirmées par au moins un des 2 tests (ENV et/ou CFI) (Figure 1).

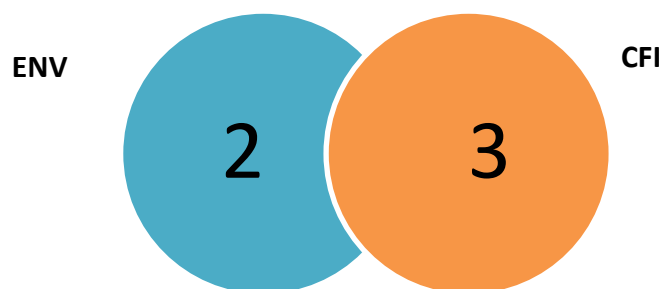


Figure 1. Nombre de fermes positives identifiées par l'un ou l'autre des tests : technique de prélèvement de l'environnement (ENV) et/ou culture fécale individuelle (CFI).

Deux fermes ont été identifiées par l'ENV seulement (échantillons provenant de la fosse), 6 ont été confirmées par les deux tests ensemble (prévalence moyenne à la CFI 7.5%

(IC95% : 1.1 % à 13.8 %) et 3 par la CFI seulement (prévalence moyenne 3.5 % (IC95% : 1.9 % à 5.1 %) (Tableau 1). Avec la technique de prélèvements de l'ENV, 72.7 % des fermes positives (IC95 % : 46.4 % à 99 %) furent confirmées alors que 81.8 % (IC 95 % : 59 % à 100 %) de celles-ci furent identifiées à l'aide de la CFI. Ces résultats suggèrent une performance semblable de l'ENV et de la CFI pour l'identification des troupeaux entravés positifs à MAP au Québec.

Tableau 3. Fermes positives à la CFI et/ou à l'ENV en 2011

# Ferme	Échantillons de l'ENV positifs	Prévalence à la CFI (%)
1	0/9	2.4
2	0/9	3.3
3	0/9	4.8
4	1/9	0
5	1/9	0
6	1/9	2
7	1/9	5.6
8	2/9	1.1
9	2/9	3.6
10	2/9	3.9
11	7/9	28.6

Profil inflammatoire sanguin de vaches atteintes de paratuberculose bovine

Le profil inflammatoire sanguin de chaque cas positif identifié par la CFI fut étudié afin de déceler des cytokines ou molécules inflammatoires qui sont associés à cette maladie. Ainsi, en étudiant les composantes et caractéristiques du sang provenant de vaches infectées, il nous a été possible d'observer que les niveaux de cytokines plasmatiques telles l'interleukine 17 et l'ostéopontine se trouvent sécrétées à un niveau plus élevé chez les vaches atteintes de paratuberculose bovine (Figure 2). De plus, l'analyse de la capacité de leur sérum à soutenir efficacement la prolifération des cellules mononucléées du sang périphérique révèle que le sérum de vaches infectées interfère et entrave la prolifération cellulaire. Il s'avère qu'un composant provoque une diminution de la réponse immunitaire

antibactérienne chez les vaches malades. Les résultats offrent une appréciation des dérèglements immunitaires provoqués par la paratuberculose bovine.

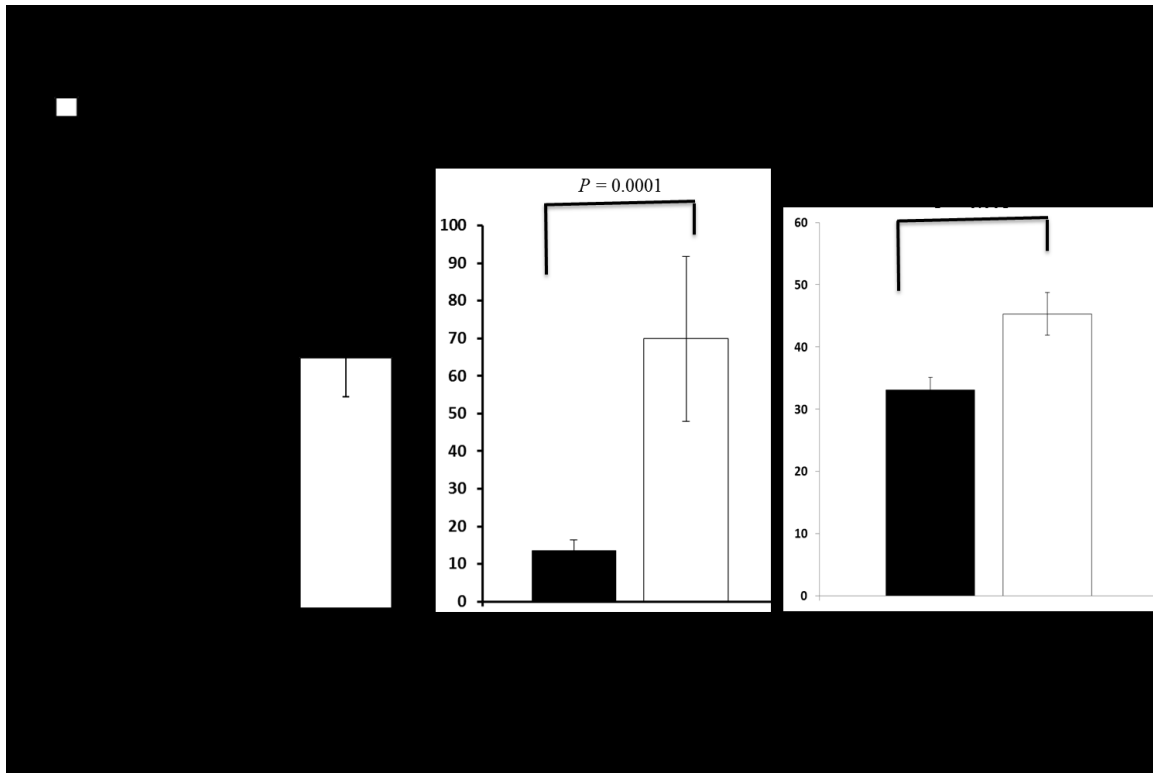


Figure 2. Profile inflammatoire sanguin de vaches atteintes de paratuberculose bovine. Alors que les vaches ont une capacité réduite à soutenir une réponse inflammatoire, leur taux sanguin de molécules inflammatoires associés à une maladie chronique confirme la présence d'une infection chronique.

Résumé de la 6e réunion canadienne des chercheurs sur le MAP

Chaque année, les chercheurs du Canada qui travaillent sur des projets portant sur le MAP se rencontrent à Banff en Alberta pour présenter des résultats et pour renforcer les réseaux de collaboration. Cette année, la réunion a eu lieu le 23 et 24 octobre. Les conférences ont été divisées en 8 sections selon le sujet.

- Le premier sujet abordé était la **génomique** avec des présentations sur l'application de cet outil afin d'améliorer la compréhension des mécanismes d'infection, de la pathogénie et pour étudier la résistance génétique de MAP.

- Dans la section sur la **pathogénèse** et les **vaccins**, des projets portant sur l'étude des facteurs de virulence et le métabolisme de la souche ovine (S) et bovine (C) de MAP ainsi que l'étude de la modulation de l'immunité cellulaire et le développement d'un vaccin vivant atténué ont été présentés.
- L'après-midi portait sur les **tests diagnostiques**. Nous avons participé en présentant les résultats de notre projet sur la technique standardisée de prélèvements de l'ENV. Il y a eu aussi d'autres présentations sur le même sujet réalisées dans différentes provinces canadiennes et dans des conditions variées : taille des troupeaux, type de stabulation et protocole de prélèvements. Une évaluation des résultats répétés au test ELISA-lait a été présentée aussi. La première journée finissait avec des présentations sur la comparaison entre l'extraction de l'ADN MAGMAX et la culture en milieu liquide pour la détection de MAP, l'effet de la dose et l'âge d'inoculation dans la réponse des anticorps et le rendement de l'analyse microbiologique du microbiome (<http://fr.wikipedia.org/wiki/Microbiome>) pour confirmer la susceptibilité des veaux à la maladie.
- La deuxième journée a commencé avec des projets portant sur la **motivation des producteurs à participer à un programme de contrôle**. La comparaison entre les producteurs participants et les non-participants au programme volontaire de l'Ontario, le contrôle de la maladie à travers des projets d'extension et les stratégies de prévention dans les fermes organiques ont été présentées.
- Après la pause, divers sujets ont été abordés : l'effet de la saison et la lactation sur l'isolement de MAP chez les vaches, l'évaluation des tests diagnostiques chez les petits ruminants et des protocoles de recherche sur l'effet de la pasteurisation du lait sur la transmission de MAP et l'évaluation de la présence des bactéries pathogènes dans les nœuds lymphatiques mésentériques et le gras des patients atteints de la maladie de Crohn.
- Le dernier après-midi de la réunion a été dédié aux présentations sur les perspectives des programmes de prévention et contrôle. Simultanément dans une salle adjacente, un atelier sur l'identification des parties prenantes de nos projets de recherche et la communication efficace et ciblée selon l'auditoire (offert aux étudiants de 2e et 3e cycle) a été réalisé. Des experts de l'organisation Alberta

Innovates Health Solutions nous ont remarqué l'importance de résumer notre projet : ce que nous faisons, les avantages de notre étude et l'impact de nos résultats, à travers d'une présentation de 3 minutes ciblée à un public de notre choix identifié préalablement comme parti prenante de notre projet de recherche.

Vidéo : La maladie de Johne's dans les troupeaux laitiers canadiens: Ce que ça représente pour les fermiers

Une des initiatives présentées lors de la réunion annuelle à Banff portait sur l'utilisation de la communication et la formation continue comme outils dans le contrôle de la paratuberculose. M. Steve Roche, candidat au PhD du département de médecine des populations de l'Université de Guelph, et son équipe ont créé une vidéo de 5 minutes qui inclut tous les points de contrôle de la maladie. On vous encourage de partager cette vidéo avec vos clients lors de vos visites de troupeau pour les aider à améliorer la compréhension de la maladie et renforcer vos recommandations.

Voici le lien : <http://bit.ly/HJhnjv>

Vous pouvez aussi donner vos suggestions et commentaires en complétant le sondage en ligne : <http://svy.mk/1e3UUyY>

Varias

- **12e Colloque international sur la paratuberculose** : cette importante réunion qui rassemble des chercheurs, des médecins vétérinaires, des représentants de l'industrie agroalimentaire et des autorités de santé publique autour de la paratuberculose aura lieu à Parma en Italie du 22 au 26 juin 2014. L'appel pour les résumés, les inscriptions et réservations sont maintenant ouvertes. Pour plus de renseignements veuillez aller sur le site web de l'organisation internationale de la paratuberculose: <http://www.paratuberculosis.org/>
- **Fin des prélèvements 2013** : La saison de prélèvements 2013 est déjà finie. Un gros merci pour votre collaboration et pour nous servir de lien et de point de contact avec les producteurs. On espère compter sur vous pour la saison 2014.
- **Résultats** : Nous avons commencé à recevoir des résultats des cultures fécales. Les analyses ELISA seront réalisées au cours du mois de décembre 2013.

Remerciements

Au nom de l'équipe de chercheurs, je vous remercie pour votre collaboration au long de cette année, on espère continuer avec votre participation. Également, je vous souhaite un joyeux temps de fêtes et une excellente année 2014.

Juan Carlos Arango Sabogal

Étudiant au PhD

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Université de Montréal

Équipe de collaborateurs :

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal : **Sébastien Buczinski, Gilles Fecteau, Jean-Philippe Roy, Vincent Wellemans**

Agence Canadienne d'Inspection des Aliments : **Julie Paré**

Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) : **Geneviève Côté, Julie-Hélène Fairbrother, Olivia Labrecque**

Agriculture et Agroalimentaire Canada, Sherbrooke, Québec : **Nathalie Bissonnette**

Étudiantes à la maîtrise (finie et en cours) : **Elizabeth Doré, Saray Rangel**

Dans ce numéro :

- Article : « Attitudes des producteurs laitiers canadiens envers un programme volontaire de contrôle de la maladie de Johne »
- Varias

Résumé de l'article : « Attitudes des producteurs laitiers canadiens envers un programme volontaire de contrôle de la maladie de Johne »

Cet article, publié dans le Journal of Dairy Science en 2010 par Sorge et collaborateurs, avait comme **objectifs** (1) de décrire la perception des producteurs sur l'impact de la paratuberculose, sur le processus de l'analyse du risque et sur les recommandations effectuées et (2) de décrire le coût associé à la mise en œuvre des recommandations suite à l'évaluation de risque.

Un total de **238 producteurs de 5 provinces canadiennes** (ON, MB, SK, AB et BC) ayant participé à un programme volontaire initial en 2005 et ayant testé tout le troupeau ont été contactés pour participer à l'étude. **Une enquête téléphonique** a été administrée entre février et juillet 2008 pour connaître la perception des producteurs sur la paratuberculose, les raisons pour s'enrôler dans le programme volontaire et leur perception sur ce programme basé sur l'analyse de risque.

Par rapport à **la perception de la maladie**, 50 % des producteurs l'ont considérée comme un problème important pour l'industrie (à cause de l'impact que pourrait avoir la perception des consommateurs en cas d'un lien éventuel entre la paratuberculose et la maladie de Crohn) même si 72 % considéraient que la paratuberculose n'était pas un problème dans leur ferme.

Parmi les 52 différentes **recommandations** effectuées par les médecins vétérinaires, les deux **plus fréquentes** étaient reliées aux jeunes animaux (retirer les veaux de l'aire de vêlages et administrer le colostrum des vaches négatives).

En ce qui concerne le **suivi des recommandations**, la plupart des producteurs (62 %) les considéraient comme réalisables, mais ils ont mis en application seulement un tiers des recommandations effectuées. La recommandation la plus suivie (89 %) était la réforme des vaches positives.

Même si les **coûts associés à la mise en œuvre des recommandations** étaient difficiles à estimer, la plupart des producteurs ont déclaré ne pas avoir dépensé ni temps ni argent additionnel pour exécuter environ 60 % des recommandations. Les producteurs ont aussi manifesté avoir constaté des bénéfices en appliquant des recommandations telles que l'amélioration de la santé du troupeau notamment des veaux.

Les producteurs ont manifesté des **préoccupations** par rapport à l'interprétation des tests diagnostiques et à la possibilité que la maladie de Crohn soit causée par MAP.

Conclusions :

- Le pourcentage élevé des troupeaux négatifs dans l'étude pourrait indiquer que leur participation était liée à l'inquiétude d'une réduction de la demande des produits laitiers si les consommateurs craignent une relation entre MAP et la maladie de Crohn.
- Les producteurs enrôlés voulaient être proactifs avant que la paratuberculose devienne un problème dans leurs fermes.
- De façon générale, les producteurs ont trouvé que les recommandations effectuées par les médecins vétérinaires étaient réalisables.
- Selon les auteurs, la communication des recommandations et de leur importance devrait être améliorée pour augmenter l'application des mesures recommandées.
- Dans le cas de troupeaux sans résultats individuels positifs pour le MAP, les médecins vétérinaires doivent valoriser les bénéfices de l'application des mesures de biosécurité sur la présentation de maladies contagieuses autres que la paratuberculose (par exemple l'impact sur la santé des veaux).
- Les efforts en formation des producteurs devraient se concentrer sur l'amélioration des connaissances au sujet de la maladie et de ses effets dans les troupeaux ainsi que l'interprétation des résultats des tests.

Varias

- **Deuxième ronde de prélèvements de l'environnement (ENV) :** dans le projet sur l'impact des recommandations ciblées à la ferme sur l'incidence de MAP nous souhaitons obtenir 2 prélèvements de l'ENV par an. Un de ces 2 prélèvements se fait lors de notre visite aux fermes. Pour le prélèvement additionnel (printemps) nous demandons votre collaboration pour le réaliser étant donné que notre budget ne nous permet qu'un seul déplacement par ferme et par an. Il y a un montant forfaitaire de \$ CA 70 plus taxes pour effectuer le prélèvement de 4 échantillons de l'ENV (environ 30 minutes de temps), les frais de livraison des échantillons seront également pris en charge par le projet. Un document avec tous les détails des sites à prélever vous sera envoyé pour chaque ferme.
- **Résultats :** Nous avons envoyé tous les résultats des cultures fécales et des ELISA de la série de prélèvements 2013. Si vous avez des questions, n'hésitez pas à nous écrire.
- **Troupeaux positifs à stabulation libre :** nous sommes à la recherche de troupeaux positifs à stabulation libre pour un projet dirigé par Dre Nathalie Bissonnette qui a pour objectif d'identifier des marqueurs génétiques associés à la résistance et à la susceptibilité de développer cette maladie et d'évoluer au stade clinique. Les analyses seront défrayées et les résultats vous seront envoyés. Si vous suivez de tels troupeaux, s'il vous plaît communiquez avec elle: nathalie.bissonnette@agr.gc.ca.

Remerciements

Au nom de l'équipe de chercheurs, je tiens à vous remercier pour votre collaboration.

Juan Carlos Arango Sabogal

Étudiant au PhD
Département de sciences cliniques
Faculté de médecine vétérinaire
Université de Montréal

Équipe de collaborateurs :

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal : **Gilles Fecteau, Jean-Philippe Roy, Sébastien Buczinski, Vincent Wellemans**

Agence Canadienne d'Inspection des Aliments : **Julie Paré**

Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) : **Geneviève Côté, Olivia Labrecque, Julie-Hélène Fairbrother**

Agriculture et Agroalimentaire Canada, Sherbrooke, Québec : **Nathalie Bissonnette**

Étudiantes à la maîtrise (programme terminé) : **Elizabeth Doré, Saray Rangel**

Dans ce numéro :

- Sensibilité et spécificité de la culture des prélèvements de l'environnement
- Varias

Sensibilité et spécificité de la méthode de culture des prélèvements de l'environnement

La sensibilité (Se) et la spécificité (Sp) sont 2 mesures de performance des tests qui évaluent la capacité de bien classer les individus (ou le troupeau) par rapport à un autre test, dit test de référence (gold standard). Théoriquement, le test de référence est un test qui doit identifier tous les cas positifs, et seulement les cas positifs, mais dans la vraie vie, ceci arrive rarement en raison de la variabilité biologique et de la nature imparfaite des tests (Se et/ou Sp inférieures à 100,0 %).

En général, le diagnostic définitif (technique de référence) de la maladie s'appuie sur la culture et l'identification de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) à partir des fèces (Whittington, 2001). Dans une étude de Collins publiée en 2006, la Se et la Sp de la culture fécale individuelle (CFI) par rapport à la nécropsie (Se et Sp de 100,0 %) était respectivement de 60,0±5,0 % et de 99,9±0,1 %.

Parmi les méthodes de dépistage utilisées pour diagnostiquer la PTB, la méthode de culture des prélèvements de l'environnement (ENV) est la méthode suggérée pour la détermination du statut des troupeaux (Collins, 2006). Les valeurs de Se et Sp de l'ENV par rapport à la CFI, pour l'identification des troupeaux infectés, ont été estimées respectivement à 40,0-81,0 % et 98,6 % (Berghaus 2006, Lombard 2006, Pillars 2009b, Smith 2011, Lavers 2012).

Dans notre étude portant sur la validation de la méthode de l'ENV dans les troupeaux laitiers québécois à stabulation entravée, nous avons également calculé la Se et la Sp. Afin d'analyser la variabilité des résultats dans le temps, nous avons évalué l'impact de la répétition des prélèvements de l'ENV (dans la même ferme et sur les mêmes sites) sur la Se et la Sp de la méthode en calculant nos estimés pour 1 et 2 visites. Notre référence était le statut du troupeau basé sur la définition de cas **(un troupeau a été considéré comme positif si son statut initial avait été déterminé positif par une culture bactérienne de**

MAP ou si un échantillon a été identifié positif à la CFI en cours d'étude). Parmi les 24 troupeaux participants, 20 troupeaux ont été visités en été et à l'automne. Quatre troupeaux ont eu une seule visite à l'automne. Pour les fermes avec 2 résultats disponibles (été et automne), nous avons choisi aléatoirement un des 2 prélèvements pour l'analyse. Nous avons inclus les résultats du prélèvement disponible pour les fermes avec une seule visite. Nos valeurs de Se et Sp pour une et deux visites sont présentées dans les tableaux suivants.

Sensibilité des méthodes de dépistage utilisées dans l'étude (ENV, CFI et ELISA)

Test	1 prélèvement		2 prélèvements	
	N. troupeaux positifs parmi les troupeaux à statut positif (19)	Sensibilité (%)	N. troupeaux positifs parmi les troupeaux à statut positif (16)	Sensibilité (%)
CFI	7	36,8	8	50,0
ENV	6	31,6	7	43,8
ELISA	8*	42,1	12*	75,0

* Au moins 2 vaches séropositives

Spécificité des méthodes de dépistage utilisées dans l'étude (ENV, CFI et ELISA)

Test	1 prélèvement		2 prélèvements	
	N. troupeaux négatifs parmi les troupeaux à statut négatif (5)	Spécificité (%)	N. troupeaux négatifs parmi les troupeaux à statut négatif (4)	Spécificité (%)
CFI	5	N/A**	4	N/A**
ENV	5	100,0	4	100,0
ELISA	4	80,0	3	75,0

** N/A : non applicable. La spécificité ne peut être estimée puisqu'un résultat positif à ce test entraine dans la définition d'un troupeau à statut positif.

La Se de la méthode de culture à partir de prélèvements de l'ENV sur 2 prélèvements se compare aux valeurs rapportées dans des études précédentes aux États-Unis et au Canada. Il est important de remarquer que les troupeaux participants dans l'étude avaient des faibles prévalences à la CFI (entre 0,0 et 5,6 %, seulement un troupeau avait une prévalence de 28,6 %) ce qui pourrait expliquer le fait que nos estimés soient dans la limite inférieure des valeurs rapportées dans la littérature. La faible prévalence à la PTB semble être une caractéristique des troupeaux québécois.

Selon nous, l'ajout d'un deuxième prélèvement de l'ENV dans la même ferme et sur les mêmes sites pourrait augmenter la sensibilité de la méthode. La variation des résultats dans le temps justifie de maintenir une surveillance constante au fil des années.

Dans notre étude, l'ELISA semble avoir une Se plus élevée que la méthode de l'ENV et la CFI, mais ce test a également classifié comme positif un troupeau où MAP n'a été identifiée ni à l'ENV ni à la CFI. L'ELISA réalisée sur tous les individus adultes du troupeau ne semble pas la méthode de choix pour connaître le statut d'un troupeau à la paratuberculose (il n'est pas économiquement justifiable). Il serait plutôt recommandé pour le diagnostic individuel dans un troupeau infecté (Collins 2006). Cependant, à cause de sa Sp qui peut varier entre 90,0 % et 99,0 %, la probabilité de classer un animal positif lorsqu'il ne l'est pas, est beaucoup plus élevée qu'avec la CFI (Sp=99,9 ±0,1 %).

Varias

- **Questionnaires et recommandations de l'année 2013** : un petit rappel à ceux qui ne nous ont pas fait parvenir le questionnaire ni les recommandations de l'année 2013 ainsi que le suivi des recommandations de l'année 2012. Cette information est très importante pour estimer l'évolution de la maladie en association avec l'incidence.
- **Prélèvements de l'ENV du printemps 2014 par les médecins vétérinaires** : dans les prochaines semaines vous allez recevoir un courriel individuel avec toutes les consignes pour la réalisation et l'expédition de ces prélèvements.
- **Série de prélèvements 2014** : notre saison de prélèvements de cette année sera réalisée en juillet, août et septembre. Nous vous invitons à communiquer cette information à vos clients afin de prévoir une date pour notre visite.

Remerciements

Au nom de l'équipe de chercheurs, je tiens à vous remercier pour votre collaboration.

Juan Carlos Arango Sabogal

Étudiant au PhD

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Université de Montréal

Équipe de collaborateurs :

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal : **Gilles Fecteau, Jean-Philippe Roy, Sébastien Buczinski, Vincent Wellemans**

Agence canadienne d'inspection des aliments : **Julie Paré**

Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) : **Geneviève Côté, Olivia Labrecque, Julie-Hélène Fairbrother**

Agriculture et Agroalimentaire Canada, Sherbrooke, Québec : **Nathalie Bissonnette**

Étudiantes à la maîtrise (programme terminé) : **Elizabeth Doré, Saray Rangel**

Dans ce numéro :

Résumé de la rencontre d'information sur les projets de recherche portant sur la paratuberculose (Saint-Hyacinthe, le 15 septembre de 2014)

Présence :

Gilles Fecteau	Anne-Claire	Brisville	Simon Plaisance
Walter	Verhoef Caroline	Lafontaine	Julie-Hélène Fairbrother
Pierre-Luc	Charbonneau	Isabelle	Maheu Juan-Carlos Arango Sabogal
Vincent Wellemans			

1. Projet de recherche visant à identifier des marqueurs génétiques associés à la paratuberculose bovine (Responsable : Dre Nathalie Bissonnette)

L'information sur le projet a été envoyée le 14 octobre via l'AMVPQ.

2. Introduction (G.F)

Questions soulevées :

Le taux des maladies inflammatoires de l'intestin en Alberta est élevé. Selon le rapport de la fondation canadienne des maladies inflammatoires de l'intestin en 2008, l'incidence de la maladie de Crohn au Canada est de 16.3 nouveaux cas par 100 000 personnes (avec des variations régionales) (http://www.crohnetcolite.ca/atf/cf/%7BFD6848A2-D712-46DD-A8C2-AED7F0F8C545%7D/Burden_IBD_Canada_Report_FR.pdf).

Qu'en est-il des éleveurs, médecins vétérinaires, travailleurs des abattoirs? Le risque occupationnel est bien connu pour des maladies transmises par contact direct ou aérosols, par contre les agents pathogènes entériques ne présentent pas toujours la même association entre exposition occupationnel et la maladie (Behr, 2009).

Une étude conduite aux États-Unis visait à déterminer l'association entre l'exposition au bétail infecté par MAP et les antécédents de MC personnels ou familiales des fermiers (bœuf ou laitier) et des médecins vétérinaires (Qual et coll., 2009). Les auteurs n'ont pas trouvé une association entre l'exposition à la paratuberculose et la MC. Par contre le nombre de cas de la MC était petit et pourrait limiter la puissance de l'étude pour détecter des différences.

Qu'en est-il de la pasteurisation du lait ?

Plusieurs études ont suggéré que MAP peut survivre à la pasteurisation courte (72° C pendant 15 secondes) (Grant, 2009).

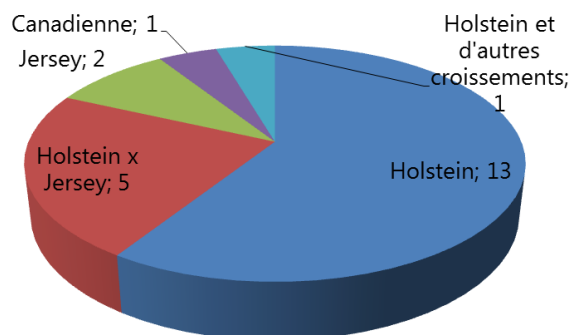
3. Impact des mesures de contrôle sur l'incidence de l'excrétion fécale de MAP dans les troupeaux laitiers québécois (ICA)

3.1. Recommandations ciblées : en moyenne 11 recommandations ont été suggérées par visite par ferme et 5 recommandations par visite par ferme ont été implémentées. **Suggestion :** se limiter à 3 recommandations par visite.

3.2. Caractéristique des troupeaux (Figure 1): le nombre de Jersey augmente à travers le Canada.

Figure 2. Caractéristiques des troupeaux participants du projet de recherche

- Taille moyenne des troupeaux: 70 (28 à 227)
- Race:



3.3. Mesures les plus souvent recommandées : les recommandations suggérées par les médecins vétérinaires pour réduire le risque de réintroduction, le risque de transmission dans l'aire de vêlage et pour les génisses avant sevrage, comptaient

pour 70% du total des recommandations (Tableau 1). La dernière colonne représente le nombre de recommandations évaluées (parmi celles recommandées) lors du premier suivi. Les recommandations les plus souvent suggérées sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 4. Recommandations suggérées par section de la ferme

Section de la ferme	Nombre de recommandations	%	Nombre de fermes	Évaluées : premier suivi
Aire de vêlage	60	29.7	18	49
Génisses non sevrées	45	22.3	18	36
Réintroduction	36	17.8	12	24
Génisses sevrées	22	10.9	11	15
Taures	20	9.9	11	16
Vaches en lactation	8	4.0	7	6
Autre	6	2.9	5	6
Vaches tarées	5	2.5	5	4
Total	202	100	-	156

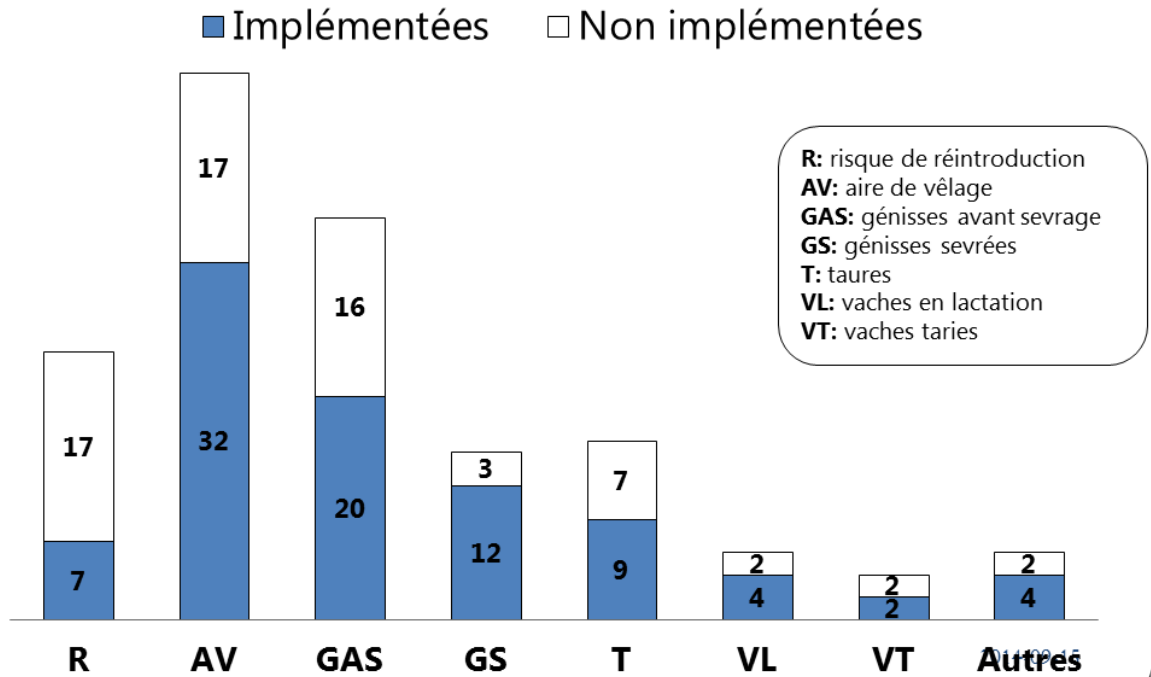
Tableau 5. Recommandations les plus souvent suggérées par les médecins vétérinaires et pourcentage de mise en place de la part des producteurs

Section de la ferme	Recommandations	% de mise en place
Aire de vêlage	Garder les vaches propres (pis, trayons)	83,3 (5/6)
	Administrer colostrum de vaches négatives	75,0 (3/4)
	Garder l'AV propre et sec, utiliser un ponton ou grille pour les vêlages attachés, ajouter de la litière	73,3 (11/15)
	Séparer le veau de la mère moins de 30 min après le vêlage	66,7 (6/9)
Génisses non sevrées	Réduire le contact des génisses avec le fumier de vaches adultes	71,4 (5/7)
	Administrer lactoreplaceur/lait de vaches négatives	54,5 (6/11)
	Garder les abreuvoirs, seaux et biberons propres	54,5 (6/11)
	Changer ou nettoyer les bottes avant de soigner les génisses	42,9 (3/7)
Réintroduction	Exiger des visiteurs port de bottes et survêtements appropriés	50,0 (2/4)
	Toujours s'informer du statut du troupeau d'origine	33,3 (2/6)
	Éviter d'acheter des animaux de sources multiples	25,0 (1/4)
	Contrôler l'accès des visiteurs aux animaux	20,0 (1/5)

	Lavage des mains avant manipulation des animaux	20,0 (1/5)
--	---	------------

Un total de 156 recommandations ont été évaluées par les médecins vétérinaires, dont 90 (57,7%) ont été implémentées par les producteurs. La mise en place était différente selon la section de la ferme (Figure 2).

Figure 3. Mesures implémentées par section de la ferme



Questions soulevées :

Dans la partie « % de mise en place » (Tableau 2), le dénominateur peut reprendre deux fois la même ferme.

Il faut revoir les recommandations après 5ans ?

La même ferme peut changer plusieurs fois de statut (par rapport aux recommandations) au cours de l'étude

Lors de la visite d'échantillonnage de JCAS, celui-ci revalide-t-il si les recommandations sont suivies ?

Non, ceci n'est pas dans le protocole et cela risquerait de mettre un biais dans l'étude. C'est l'évaluation des médecins vétérinaires qui est importante.

3.4. Description des cas : nous avons eu un total de 31 nouveaux cas entre 2011 et 2013, dont 27 animaux de la cohorte avant (nées avant la date d'adhésion de la ferme au programme volontaire) et 4 de la cohorte après. Voici la distribution des cas par race: Holstein 19 (61,3%), Jersey 7 (22,6%) et Ayrshire 5 (16,1%).

Question soulevée :

On remarque 16,1% d'Ayrshire, cela veut-il dire qu'elles sont plus susceptibles?

Non, on ne peut pas dire cela car elles sont toutes du même troupeau et il faudrait faire des analyses supplémentaires.

3.5. Incidence de l'excrétion fécale (cas par 100 vaches-an) :

Toutes les vaches confondues : 0.7 cas par 100 vaches-an.

Incidence par cohorte : l'incidence chez les vaches nées avant la date d'adhésion de la ferme au programme volontaire était de 0.8 cas par 100 vaches-an tandis que l'incidence chez les vaches nées après était de 0.3 cas par 100 vaches-an. Cela équivaut dans un troupeau de 100 vaches, à peu près de 1 cas par an pour les animaux nés avant et à 1 cas par trois ans pour les animaux nés après.

3.6. Incidence et âge moyen à l'évènement par cohorte de naissance :

Les vaches ont été groupées dans 10 catégories selon l'année de naissance par rapport à la date d'adhésion de la ferme au programme volontaire (Tableau 3). Par exemple les vaches des groupes -5, -4, -3, -2 et -1 sont des vaches nées respectivement 5, 4, 3, 2 et 1 ans avant la date d'adhésion de la ferme au programme volontaire. Les vaches du groupe 0 sont des vaches nées la même année de l'adhésion de la ferme. Les vaches des groupes 1, 2, 3 et 4 sont des vaches nées respectivement 1, 2, 3 et 4 ans après la date d'adhésion. Le tableau 3 résumé l'âge moyen (au prélèvement de l'année 2013 ou à l'excrétion fécale, ce qui arrive en premier) ou et l'incidence pour chacun des groupes. Les données du tableau 3 sont illustrées dans la figure 3.

Tableau 6. Incidence de l'excrétion fécale par an de naissance par rapport à la date d'adhésion de la ferme au programme volontaire.

Année de naissance	Nombre de vaches par groupe	Âge moyen (en 2013 ou à l'excrétion fécale de MAP)	Incidence (cas par 100 animaux-an)
-5	109	9.0	0.5
-4	84	7.3	1.1
-3	135	6.2	1.1
-2	197	5.2	0.8
-1	257	4.7	1.0
0	298	3.8	0.6
1	302	3.6	0.2
2	217	3.2	0
3	125	2.7	0
4	38	3.9	0
Total	1762	-	-

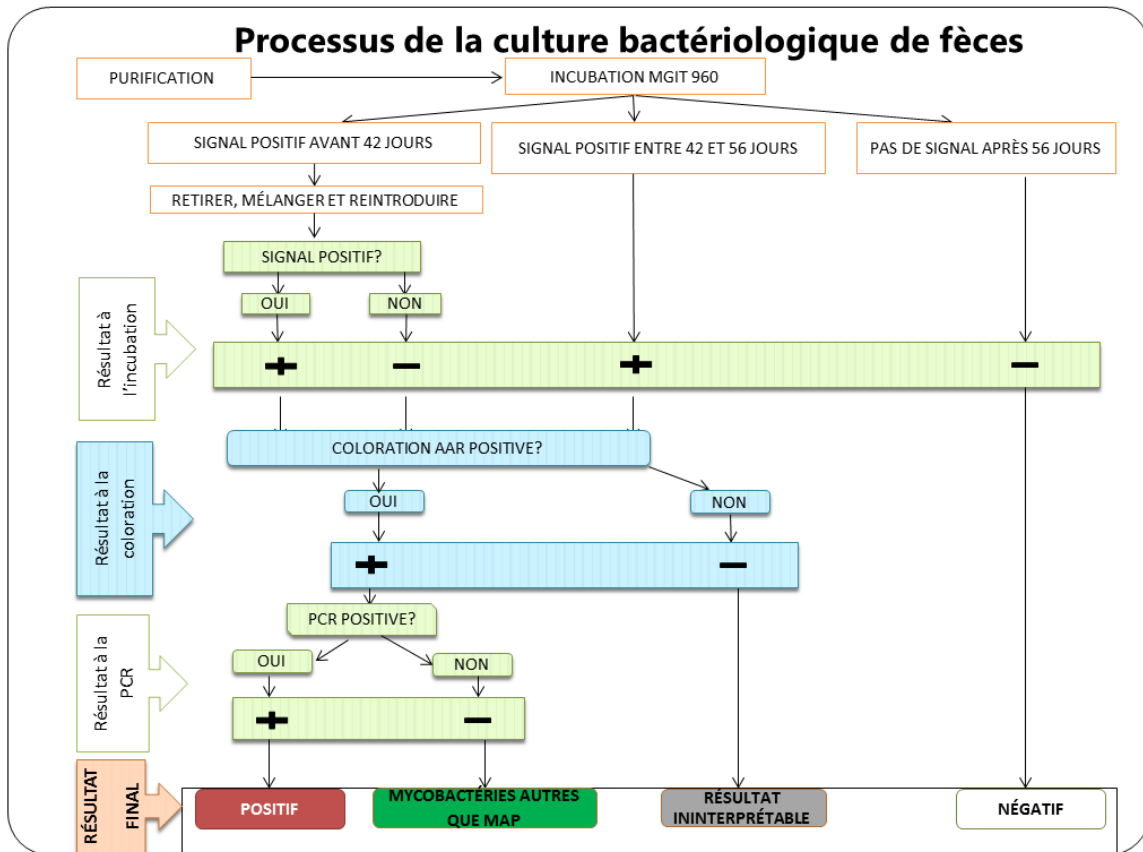
Résumé :

- Nos résultats préliminaires montrent une réduction de l'incidence de l'excrétion fécale chez les animaux nés après la date d'adhésion des fermes au programme volontaire
- Les recommandations pour réduire le risque de transmission autour de la période néonatal étaient les plus souvent suggérées par les MVP et les plus facilement implémentées par les producteurs
- Les producteurs n'ont pas appliqué la plupart des recommandations pour réduire le risque de réintroduction de MAP aux fermes

4. Identifications de troupeaux laitiers infectés par MAP : diagnostic par la culture de l'environnement standardisée (ICA)

4.1. Laboratoire : ajout d'une information relative au processus de l'obtention d'un résultat lors de la CFI (Figure 3).

Figure 3. Processus de la culture bactériologique de fèces pour la détection de *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*



Questions soulevées :

Il faut bien souligner que la configuration « AVANT 42J » signifie en fait, « bien avant » et est une détection assez rapide. Souvent beaucoup plus tôt que 42 jours.

Y a-t-il une différence entre le processus de décontamination pour les CFI et ENV?

Comme nous assumons qu'il a plus de microorganismes indésirables ou contaminants dans les ENV que dans les CFI, la concentration en AB des ENV est augmentée. Mais, si on augmente trop la concentration en AB, on risque de nuire au développement de MAP.

Il n'existe pas beaucoup de Mycobactéries autres que MAP qui ont poussé jusqu'à présent.

4.2. Stratégie d'échantillonnage (Tableau 4)

Tableau 4. Stratégie d'échantillonnage de l'environnement pour la détection de troupeaux infectés par *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*

Fermes positives à l'ENV	Sites					
	Fosse	Écureur	Veaux	Bottes	Malades	Maigres
A		+		+		
B	+					
C*	+	+		+	+	
D*	+	+	+	+	+	+
E						+
F				+	+	
G	+					
H					+	
Fermes positives par site	4	3	1	4	4	2

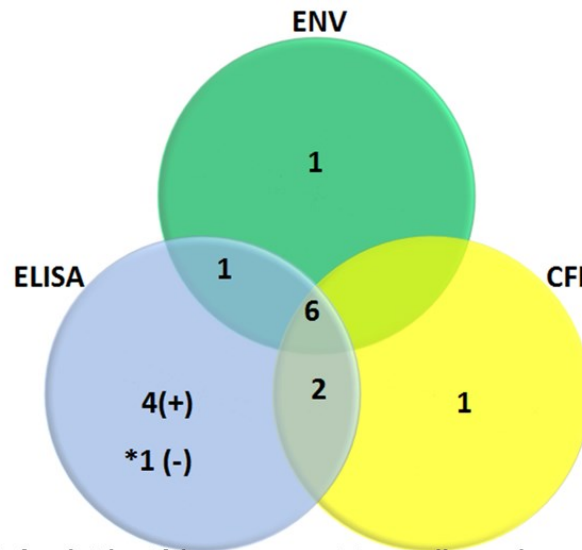
* Fermes positives aux 2 prélèvements

Question soulevée :

Pour la contamination du site « veaux », celle-ci vient des veaux, des bottes ou des autres vaches ?

4.3. Troupeaux infectés confirmés positifs par les méthodes de dépistage utilisées sur 2 prélèvements (Figure 4)

Figure 4. Troupeaux infectés confirmés positifs par les méthodes de dépistage utilisées sur 2 prélèvements (n=15)



*Ferme non infectée identifiée comme positive par l'ELISA (2 vaches séropositives)

Note: 4 troupeaux infectés n'ont pas été identifiés par aucune des méthodes de dépistage 2014-09-15

Question soulevée :

Il serait intéressant de savoir si les 4 troupeaux positifs à l'ELISA uniquement ont beaucoup d'échantillons contaminés en CFI ou en ENV ?

Réponse :

Tableau 5. Pourcentage de résultats non interprétable ou contaminés issus de l'environnement et individuels de 4 fermes positives à l'ELISA.

Troupeaux positifs seulement à l'ELISA	% d'échantillons contaminés			
	Été		Automne	
	Individuel	Environnement	Individuel	Environnement
1	24.3	18.2	57.6	0
2	39.1	0	93.0	66.7
3	95.1	55.6	65.1	0
4	0	0	1.6	11.1

Conclusions et discussion

L'ENV est une méthode intéressante, économique et non invasive pour la détection des troupeaux infectés dans les conditions du Québec. Elle est spécifique, également elle détecte facilement les troupeaux fortement infectés.

La meilleure stratégie semble être la combinaison de la fosse, l'écurie et le groupe de vaches malades et/ou maigres.

La répétition des prélèvements semble augmenter la sensibilité ainsi que la certitude d'être négatif ou à faible prévalence lors des résultats négatifs consécutifs

5. 12^{ème} Colloque international sur la paratuberculosis

Dans le mois de juin dernier de 300 personnes (entre chercheurs en médecine vétérinaire et humaine, médecins vétérinaires praticiens, conseillers et étudiants) provenant de plus de 30 pays se sont réunies en Italie pour le colloque international sur la paratuberculose. Plusieurs défis ont été identifiés, notamment la difficulté de développer des tests et vaccins efficaces, la réduction des subventions pour la recherche et des programmes de contrôle ainsi que l'augmentation de l'évidence d'association de MAP avec plusieurs maladies chez l'humain.

Des directions de recherche ont été également proposées : la sélection génétique des animaux résistants à MAP, la motivation des producteurs, l'amélioration des tests diagnostiques pour déterminer le statut du troupeau (échantillonnage de l'environnement et la PCR), le développement des nouveaux tests diagnostiques pour la détection précoce, l'utilisation des techniques moléculaires pour étudier la dynamique de la maladie entre troupeaux et l'utilisation des outils épidémiologiques pour gérer l'incertitude et la variabilité des tests diagnostiques, les méthodes d'échantillonnage et les budgets limités dans les projets de recherche.

Il a été suggéré d'envoyer la Méta-analyse portant sur l'association de MAP avec la MC chez l'humain: association, mais pas causalité.

[Can J Public Health](#). 2008 Mar-Apr;99(2):145-55.

The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* spp. paratuberculosis: a systematic review.

Waddell LA1, Rajić A, Sargeant J, Harris J, Amezcua R, Downey L, Read S, McEwen SA.

Abstract

BACKGROUND:

The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) has been debated for almost a century because of similarities between Johne's Disease (JD) in cattle and Crohn's disease (CD) in humans. Our objective was to evaluate scientific literature investigating the potential association between these two diseases (MAP and CD) and the presence of MAP in retail milk or dairy products using a qualitative systematic review.

METHOD:

The search strategy included 19 bibliographic databases, 8 conference proceedings, reference lists of 15 articles and contacting 28 topic-related scientists. Two independent reviewers performed relevance screening, quality assessment and data extraction stages of the review.

RESULTS:

Seventy-five articles were included. Among 60 case-control studies that investigated the association between MAP and CD, 37 were of acceptable quality. Twenty-three studies reported significant positive associations, 23 reported non-significant associations, and 14 did not detect MAP in any sample. Different laboratory tests, test protocols, types of samples and source populations were used in these studies resulting in large variability among studies. Seven studies investigated the association between CD and JD, two challenge trials reported contradictory results, one cross-sectional study did not support the association, and four descriptive studies suggested that isolated MAP is often closely related to cattle isolates. MAP detection in raw and pasteurized milk was reported in several studies.

CONCLUSIONS:

Evidence for the zoonotic potential of MAP is not strong, but should not be ignored. Interdisciplinary collaboration among medical, veterinary and other public health officials may contribute to a better understanding of the potential routes of human exposure to MAP.

Remerciements

Au nom de l'équipe de chercheurs, je tiens à vous remercier pour votre collaboration.

Juan Carlos Arango Sabogal

Étudiant au PhD

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Université de Montréal

Équipe de collaborateurs :

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal : **Gilles Fecteau, Jean-Philippe Roy, Sébastien Buczinski, Vincent Wellemans**

Agence canadienne d'inspection des aliments : **Julie Paré**

Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) : **Geneviève Côté, Olivia Labrecque, Julie-Hélène Fairbrother**

Agriculture et Agroalimentaire Canada, Sherbrooke, Québec : **Nathalie Bissonnette**

Étudiantes à la maîtrise (programme terminé) : **Elizabeth Doré, Saray Rangel**



Dans ce numéro :

- Déterminer la probabilité qu'une vache soit infectée par la paratuberculose en fonction de leur résultat à l'ELISA sur le sérum et de la prévalence du troupeau à la culture fécale individuelle.
- Varias

Déterminer la probabilité qu'une vache soit infectée par la paratuberculose en fonction de leur résultat à l'ELISA sur le sérum et de la prévalence du troupeau à la culture fécale individuelle.

L'interprétation des résultats au test ELISA est traditionnellement dichotomique (positif ou négatif) en fonction du seuil choisi. L'approche par rapports de vraisemblance (ou « likelihood ratios » en anglais) permet d'utiliser les valeurs continues (ou numériques) rapportées par les laboratoires (c'est-à-dire les valeurs S/P) pour déterminer la probabilité diagnostique du test (la probabilité que l'animal soit infecté).

Collins et collaborateurs nous présentent dans leur article « Interprétation d'un test ELISA commercial pour la paratuberculose bovine en utilisant les rapports de vraisemblance (« likelihood ratios ») » une façon pratique pour déterminer la probabilité d'infection d'une vache en fonction de : 1) son résultat au test ELISA-sérum et 2) la prévalence du troupeau (tableau 1). Les conclusions de cet article ne sont valides que pour les troupeaux laitiers confirmés infectés par MAP par au moins une culture fécale positive provenant d'un animal né et élevé à la ferme (c'est-à-dire prévalence plus grande que zéro).

Vous recevez chaque année des résultats individuels à la culture fécale et à l'ELISA sur le sérum (valeurs S/P aussi) des troupeaux que vous suivez et qui sont actuellement dans notre projet de recherche. Vous avez alors dans ces rapports l'information nécessaire pour appliquer cette approche. Nous pensons que cela pourrait être un outil intéressant pour prendre des décisions visant le contrôle de la maladie.

Tableau 7. Effet de la prévalence intra-troupeau et des résultats individuels à l'ELISA (valeurs S/P) sur la probabilité d'infection à *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (adapté de Collins et collaborateurs, 2002).

Résultat à l'ELISA (valeur S/P)	Probabilité d'infection selon la prévalence intra-troupeau à MAP				
	Prévalence intra-troupeau				
	1%	5%	10%	20%	25%
5	1	3	6	13	17
20	9	35	53	72	77
30	19	55	72	85	89
70	57	87	93	97	98
200	92	98	99	100	100

À partir de ce tableau on peut constater qu'au fur et à mesure que la prévalence à l'intérieure du troupeau augmente, la probabilité qu'un animal soit infecté augmente aussi, peu importe leur résultat (valeur S/P) à l'ELISA. On observe également que pour les animaux avec un résultat à l'ELISA autour de 5, la probabilité d'infection peut aller de 1% jusqu'à 17% selon que la prévalence intra-troupeau soit estimée de 1% ou 25%.

Voici un exemple pour utiliser ces résultats.

Admettons les résultats hypothétiques suivants à l'ELISA-sérum de 3 vaches dans un troupeau avec une prévalence de 5%:

Tableau 8. Résultats hypothétiques à l'ELISA sur le sérum pour le diagnostic de *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*.

Vache ID	Résultat à l'ELISA	
	Valeur S/P	Interprétation (selon IDEXX)
1	32.05	Négatif
2	78.96	Douteux
3	123.90	Positif

À partir du tableau 1, nous constatons que le résultat à l'ELISA de la vache 1 est proche de 30. Donc, la probabilité d'infection pour les animaux avec des résultats proches de cette valeur est autour de 55% pour une prévalence intra-troupeau de 5%. De même, on peut déterminer que les probabilités des vaches 2 et 3 se trouvent respectivement autour de 87% et de 98%.

Dans ce même troupeau, toutes les vaches ayant un résultat ELISA inférieure à 5 ont une très faible probabilité (3%) d'être infectées.

L'article inclut une formule pour des calculs plus précis.

Conclusions :

- La méthodologie proposée par les auteurs de l'article met en relation les valeurs S/P de l'ELISA avec la prévalence du troupeau pour déterminer la probabilité d'infection d'un animal.
- Cela semble un outil intéressant afin de prendre des décisions à la ferme pour contrôler la maladie.
- Cette méthodologie ne s'applique que pour les troupeaux laitiers infectés. Également il faut connaître la prévalence intra-troupeau à la culture fécale (testage de tous les animaux).

Varias

- **Fin des prélèvements saison 2014** : La saison de prélèvements 2014 est déjà finie et avec un grand succès. Encore merci pour votre collaboration et pour votre implication auprès des 14 producteurs qui continuent dans le projet. On espère compter sur vous pour la saison 2015.

Remerciements

Au nom de l'équipe de chercheurs, je tiens à vous remercier pour votre collaboration. Également, je vous souhaite un joyeux temps de fêtes et une excellente année 2015.

Juan Carlos Arango Sabogal
Étudiant au PhD
Département de sciences cliniques
Faculté de médecine vétérinaire
Université de Montréal

Équipe de collaborateurs :

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal : **Gilles Fecteau, Jean-Philippe Roy, Sébastien Buczinski, Vincent Wellemans**

Agence Canadienne d'Inspection des Aliments : **Julie Paré**

Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) : **Geneviève Côté, Olivia Labrecque, Julie-Hélène Fairbrother**

Agriculture et Agroalimentaire Canada, Sherbrooke, Québec : **Nathalie Bissonnette**

Étudiantes à la maîtrise (programme terminé) : **Elizabeth Doré, Saray Rangel**

Dans ce numéro :

- Mise à jour sur les programmes de contrôle de la paratuberculose dans le monde.
- Varias

Mise à jour sur les programmes de contrôle de la paratuberculose dans le monde (Tiré du 4^e forum sur la paratuberculose, Italie 2014).

Dans le monde, environ 15 pays participent activement à la recherche sur la paratuberculose. À chaque 2 ans, les leaders des programmes de contrôle de ces pays se rencontrent lors du forum mondial du colloque international sur la paratuberculose. Le but de cette rencontre est de partager leurs expériences, les améliorations effectuées et les leçons à retenir des programmes de contrôle dans leurs pays respectifs. Je vous présente un résumé comparatif des aspects les plus importants des programmes dans le monde (http://www.paratuberculosis.info/images/paratbforum/proc_pf_2014.pdf).

Origine des programmes :

Même si plusieurs pays ont effectué des efforts pour diagnostiquer la maladie pendant plusieurs décennies, les **programmes de contrôle structurés** ont été lancés seulement **dans les années 2000**, sauf quelques exceptions. En **Australie**, le programme de contrôle est en marche depuis **plus de 20 ans**. Par contre, dans d'autres pays comme la Nouvelle-Zélande et la Slovénie, le programme est en train de se développer. Un **point commun** pour l'origine de ces programmes dans le monde est **l'augmentation de la prévalence**, mais certains pays comme **l'Italie et l'Irlande** possèdent des **motivations particulières** pour le contrôle de la maladie. En Italie, les **exportations annuelles** de fromage parmesan s'élèvent à **13 millions d'euros** et environ **15% de la demande mondiale en lait** de remplacement pour les **enfants** provient de l'Irlande. Dans ces 2 cas, les marchés sont

sensibles à la présence de MAP dans le lait et le risque zoonotique potentiel que cela représente.

Dans la plupart des pays, les programmes ont commencé à partir d'**initiatives transdisciplinaires** impliquant les producteurs, l'industrie, les organisations de santé animale, les médecins vétérinaires et le gouvernement. La gestion des programmes implique également **l'action conjointe de ces parties prenantes** avec l'accompagnement des universités.

Participation :

La participation des producteurs dans les programmes de contrôle est très variable d'un pays à l'autre et même parmi les régions dans un pays. Elle **dépend fortement** de l'implication des responsables des programmes et **des médecins vétérinaires**. Les programmes canadien et belge ont des taux de participation des plus élevés (**35%**) (**22% au Québec**) dépassés seulement par le sud de l'Australie (95%) et suivis par le Danemark (27%), l'Irlande (10%), les États-Unis (9%) et la France (4%).

La participation au programme est **volontaire dans la plupart des pays** à l'exception de l'Autriche (la stratégie adoptée par les autorités se limite à rapporter les cas cliniques), l'Allemagne (maladie à déclaration obligatoire (MADO), obligation de réformer les animaux positifs, traitement spécial des nouveau-nés, obligation de ne pas acheter des sujets de remplacements ou faire des achats contrôlés et de ne pas épandre du fumier dans les champs), l'Italie (MADO, les pays acheteurs du parmesan exigent l'absence de cas cliniques), la Norvège (MADO, pays exempt de MAP en théorie, vise à réduire le risque d'introduction par les importations du bétail, le contact avec des troupeaux caprins ou le partage d'équipement), les Pays-Bas (les entreprises transformatrices du lait exigent la participation des clients et un certain statut) et la République-Tchèque (programme couvert par la loi).

Objectifs :

Dans la plupart des pays, les programmes visent **la sensibilisation, l'éducation, la diminution de la prévalence, la garantie d'innocuité des produits d'origine animale et la diminution des pertes économiques**. Particulièrement, en République-Tchèque, suite à

une histoire de mesures de contrôle inefficaces (réforme des animaux positifs, et ce même sans signes cliniques; mesures strictes de contrôle que les producteurs n'appliquaient pas), l'objectif du nouveau programme était d'attirer de nouveau l'attention des producteurs vers le contrôle de la maladie.

Piliers :

La plupart de programmes se basent sur **l'éducation des producteurs, le dépistage des troupeaux (visant l'obtention d'un statut), l'analyse de risque et les pratiques de régie**. Certains programmes possèdent des **particularités**; par exemple le **programme australien** inclut un « **score laitier** » et un **plan en 3 étapes** pour les veaux. Le premier vise à **assurer le commerce de sujets à faible risque** en donnant un statut aux animaux afin d'augmenter la confiance des producteurs lors des achats des remplacements. Le dernier vise à réduire le risque de contamination des jeunes sujets. En **République-Tchèque** les piliers sont la **notification des cas**, l'implantation des mesures et la **restriction au commerce** des troupeaux positifs. En **Allemagne**, **l'assurance lors des achats** fait partie des piliers du programme avec les mesures d'hygiène, le dépistage et les réformes.

L'analyse de risque et les **bonnes pratiques de régie** sont des composants essentiels de tous les programmes de contrôle structurés. Particulièrement, 2 pays (Royaume-Uni et l'Irlande) sont à l'avant-garde en rendant disponible **électroniquement** les formulaires (d'inscription, les questionnaires et les recommandations) ainsi que toute l'information du programme (<http://www.myhealthyherd.co.uk/myhealthyherd-modules/johnes-control/> <http://www.animalhealthireland.ie/page.php?id=30>). Également, les médecins vétérinaires et les producteurs peuvent avoir accès en ligne aux résultats des tests et mouvements d'animaux.

Dépistage :

Les stratégies de dépistage sont très variables. Les tests les plus utilisés sont **la sérologie individuelle (lait ou sang), la PCR (fèces), la culture de l'environnement et la culture fécale individuelle**. La **fréquence** des tests varie également entre annuelle (Belgique, Italie), biannuelle (Allemagne) ou 4 fois par année (Danemark). Normalement, le diagnostic

chez les **animaux positifs à la sérologie est confirmé** par la culture fécale (Hollande, Allemagne, États-Unis) ou PCR (Belgique). Au **Royaume-Uni**, la stratégie de dépistage cible les **vaches avec la probabilité la plus élevée d'être positives** (vieilles, CCS élevé et diminution de la production laitière).

Défis universels :

- Augmenter la **participation** (notamment des troupeaux à faible prévalence) et maintenir le programme dans les préoccupations des producteurs.
- Démontrer la valeur des programmes (notamment de la **prévention** : troupeaux à risque, mais où l'infection n'a pas été démontrée).
- La compréhension de la maladie : **l'interprétation des résultats** (possibilité de résultats variables dans le temps en raison de la performance des tests) et le risque d'introduction de MAP lors des **achats**.
- Un résultat **néгатif** à un test ne veut pas dire que le troupeau est exempt, mais est plutôt à **faible risque**.

Leçons :

- Les programmes volontaires sont un bon exemple de mise en œuvre des **mesures de biosécurité ciblées** pour le contrôle des maladies entériques contagieuses.
- La **stratégie de contrôle** doit être en accord avec les **ressources** et satisfaire les **objectifs** du producteur (les recommandations doivent être simples).
- Dépistage : tester et réformer **n'éradique pas** la maladie; il est crucial de **communiquer adéquatement la signification d'un résultat positif** à un test et de **ne pas prendre des décisions basées sur un résultat individuel**; le dépistage à **répétitions** et sur plusieurs années augmente la confiance envers le statut du troupeau.
- L'implication et la formation des **médecins vétérinaires** sont essentielles pour la **réussite** des programmes (recrutement, crédibilité, communication avec les producteurs); la collaboration entre les médecins vétérinaires et les producteurs est la clé du succès.

- Il est possible **d'obtenir (et garder) un statut à faible risque** après avoir commencé dans le programme comme troupeau à risque moyen ou élevé.

Varias

- **Dernière année** : notre projet de recherche entre dans le dernier droit. Comme l'année passée, nous aimerions avoir (en plus de notre visite habituelle de l'automne) **les prélèvements de l'environnement au printemps**. Nous sollicitons votre collaboration pour les réaliser. Vous allez recevoir dans un autre courriel les procédures pour le prélèvement, l'expédition et le montant forfaitaire qui vous sera fourni.

Remerciements

Au nom de l'équipe de chercheurs, je tiens à vous remercier pour votre collaboration.

Juan Carlos Arango Sabogal

Étudiant au PhD

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Université de Montréal

Équipe de collaborateurs :

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal : **Gilles Fecteau, Jean-Philippe Roy, Sébastien Buczinski, Vincent Wellemans**

Agence Canadienne d'Inspection des Aliments : **Julie Paré**

Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) : **Geneviève Côté, Olivia Labrecque, Julie-Hélène Fairbrother**

Agriculture et Agroalimentaire Canada, Sherbrooke, Québec : **Nathalie Bissonnette**

Étudiantes à la maîtrise (programme terminé) : **Elizabeth Doré, Saray Rangel**