

2m11.3289.5

Université de Montréal

COMPARAISON DU ZIEHL-NEELEN, DE L'IMMUNOHISTOCHIMIE ET DU  
PCR DANS LE DIAGNOSTIC DE LA PARATUBERCULOSE CHEZ LE  
MOUTON

par

JEAN-RENÉ GALARNEAU

Département de pathologie et de microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en sciences vétérinaires  
option pathologie

Août 2004

©Jean-René Galarneau, 2004



SF

607

U54

2005

V.015

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

COMPARAISON DU ZIEHL-NEELSEN, DE L'IMMUNOHISTOCHIMIE  
ET DU PCR DANS LE DIAGNOSTIC  
DE LA PARATUBERCULOSE CHEZ LE MOUTON

présenté par  
JEAN-RENÉ GALARNEAU

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

.....  
Gilles Fecteau, président-rapporteur

.....  
Christiane Girard, directrice de recherche

.....  
Josée Harel, codirectrice de recherche

.....  
Pierre Hélie, membre du jury

## RÉSUMÉ

Classiquement, le diagnostic *post-mortem* de la paratuberculose chez le mouton s'appuie sur les examens macroscopiques et histopathologiques, la démonstration de bactéries acido-alcoolo-résistantes dans les lésions et, si possible, la culture bactérienne des tissus. Trente-deux moutons démontrant une entérite granulomateuse suggestive de paratuberculose et 14 moutons sans évidence histologique d'entérite granulomateuse (contrôles) ont été sélectionnés suite à un examen microscopique détaillé. Utilisant comme étalon de référence d'une infection par *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) les lésions histologiques, cette étude avait pour but de comparer la coloration Ziehl-Neelsen (ZN), l'immunohistochimie (IHC) utilisant un antisérum commercial anti- *Mycobacterium bovis* et l'amplification en chaîne par la polymérase (PCR) basée sur la séquence d'insertion IS900, quant à leur sensibilité et à leur spécificité. Ces méthodes diagnostics ont été appliquées à des échantillons fixés dans la formaline et enrobés dans la paraffine. La sensibilité du ZN, de l'IHC et du PCR fait sur des sections de 60 µm était similaire soit 59%, 56% et 63%, respectivement (différences non statistiquement significatives). Le nombre de cas détecté par le PCR et effectué sur des sections de 10 µm était significativement plus faible que le nombre de cas détecté par le ZN (P=0,008), l'IHC (P=0,02) ou le PCR fait sur des sections de 60 µm (P=0,004). Dans les cas démontrant des lésions paucibacillaires, le ZN et l'IHC démontrèrent une sensibilité similaire, étant positifs dans 42% des cas alors que le PCR effectué sur des sections de 60 µm était légèrement plus sensible, détectant l'agent dans 58% des animaux avec des lésions de paratuberculose. Cette différence n'était cependant pas statistiquement significative.

**Mots clés :** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, paratuberculose, mouton, Ziehl-Neelsen, immunohistochimie, PCR

## Abstract

The *post-mortem* diagnosis of paratuberculosis in sheep is based on histopathologic lesions, demonstration of acid-fast bacteria in lesions and when possible bacterial culture of tissues. Thirty-two sheep without granulomatous enteritis suggestive of paratuberculosis and 14 sheep with no histological evidence of granulomatous enteritis (controls) were selected. Using microscopic lesions as the “gold standard” of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*MAP*) infection, Zielh-Neelsen stain (ZN), immunohistochemistry (IHC) using a commercial anti- *Mycobacterium bovis* antiserum and polymerase chain reaction (PCR) for the IS900 sequence were used on formalin-fixed paraffin-embedded tissue and compared as to their sensibility and specificity. The sensitivity of the ZN, IHC and PCR done on 60 µm thick sections were 59%, 56% and 63%, respectively (differences were not statistically significant). PCR done on 10 µm thick sections detected a significant lower number of cases compared to ZN (P=0.008), IHC (P=0.02) and PCR done on 60 µm thick sections (P=0.004). In cases with paucibacillary lesions, ZN and IHC showed similar sensitivity, being positive in 42% of cases. PCR done on 60 µm thick sections was slightly more sensitive detecting 58% of animals with paratuberculosis lesions but the difference was not statistically significant between these 3 diagnostic methods.

Key words: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, paratuberculosis, sheep, Zielh-Neelsen, immunohistochemistry, PCR

## TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	iii
Abstract .....	iv
Tables des matières .....	v
Liste des tableaux .....	vi
Liste des sigles et abréviations.....	vii
Remerciements .....	viii
Introduction .....	1
Recension de littérature.....	3
1. Introduction.....	3
2. Écologie.....	5
2.1 L'agent pathogène.....	5
2.2 Résistance environnementale.....	7
2.3 Souches bactériennes .....	8
2.4 Espèces susceptibles à l'infection .....	9
2.4.1 Polygastriques .....	9
2.4.2 Monogastriques.....	10
3. Pathogénie.....	10
3.1 Transmission et susceptibilité à l'infection.....	10
3.2 Infection de l'hôte .....	11
3.3 Signes cliniques.....	13
3.4 Lésions .....	13
3.4.1 Lésions macroscopiques.....	13
3.4.2 Lésions microscopiques .....	14
3.5 Paratuberculose et système immunitaire.....	17
4. Diagnostic de la paratuberculose .....	20
4.1 Culture.....	20
4.2 Examen macroscopique et histopathologique.....	22
4.3 PCR.....	24
4.4 Tests immunitaires .....	26
Méthodologie .....	28
1. Sélection des cas .....	28
2. Échantillonnage des tissus.....	28
3. Examen histopathologique .....	28
4. Immunohistochimie .....	29
5. PCR .....	30
6. Méthode statistiques.....	31
Résultats .....	33
Discussion .....	61
Conclusion .....	67
Bibliographie.....	69

## LISTE DES TABLEAUX

		Pages
Table I	Taxonomie mycobactérienne : quelques espèces du genre <i>Mycobacterium</i> .....	6
Table II	Classification des lésions intestinales causées par <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> chez le mouton selon Perez et al. ....	17
Table 3	Grading of ileum and ileocaecal lymph node lesions and results of Ziehl-Neelsen, <i>M. bovis</i> immunohistochemistry and IS900 PCR on 10 µm and 60 µm ileal sections in sheep suspected of paratuberculosis.....	56
Table 4	Number of positive results for the Ziehl-Neelsen, immunohistochemistry and PCR in ileum and ileocaecal lymph node, in relation with histological grade of intestinal lesions.....	58
Table 5	Sensitivity (%) and specificity (%) relative to histopathology for each technique in relation with histological grade of ileal lesions.....	59

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

MAP:	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
MAA :	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>
ZN:	Ziehl-Neelsen
IHC:	Immunohistochimie
PCR:	Polymerase chain reaction, amplification en chaîne par la polymérase
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ARN:	Acide ribonucléique
RFLP:	Restriction fragment length polymorphism, polymorphisme de taille des fragments de restriction
RC:	Récepteurs du complément
RM:	Récepteurs du mannose
RFc:	Récepteurs du fragment Fc des immunoglobulines
Th:	T helper lymphocytes, lymphocytes T de soutien
CMH:	Complexe majeur d'histocompatibilité
IL:	Interleukine
INF:	Interféron
TNF:	Tumor necrosis factor, facteur onconécrosant
IMH:	Immunité à médiation humorale
IMC:	Immunité à médiation cellulaire

## REMERCIEMENTS

Cette étude a été financée par «le fonds du Centenaire», le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, la société des éleveurs de moutons Pur-sang du Québec, la Fédération des producteurs de moutons et d'agneaux du Québec et le Centre d'expertise en production ovine du Québec.

L'auteur remercie sa directrice de recherche, Dre Christiane Girard pour son support et sa compréhension sans borne; Dre Josée Harel, Donald Tremblay, Makeda Semret et Marcel Behr pour leur expertise dans le domaine de la biologie moléculaire; Dre Julie Arsenault pour son support statistique et la révision de l'article; M. et Mmes Jules Deslandes, Line Pépin, Jacinthe Cardin, Bibiane Pépin pour leur support technique; Mme Laurette Tremblay pour la révision du mémoire; Dre Claudine Savard pour son support et son aide dans la rédaction de ce mémoire.

## INTRODUCTION

La paratuberculose (maladie de Johne) est une entérite chronique des ruminants domestiques et sauvages causée par *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*MAP*), une bactérie acido-alcool-résistante.<sup>22</sup> Chez les ovins, l'infection cause un amaigrissement chronique, de l'hypoprotéinémie, de l'œdème sous-cutané, la production de laine de mauvaise qualité et parfois de la diarrhée.<sup>18,22,99</sup> Le diagnostic *post-mortem* de la paratuberculose ovine est établi par la mise en évidence de lésions histopathologiques, la démonstration de bactéries acido-alcool-résistantes dans les lésions et, lorsque possible, par la culture bactérienne des tissus.<sup>23</sup> Bien que la culture bactérienne soit fréquemment considérée comme la méthode diagnostique définitive de la paratuberculose, la croissance de *MAP* est lente, s'étalant généralement sur plus de 6 semaines, et est strictement dépendante de l'ajout d'un facteur exogène: la mycobactine J.<sup>10,18,22,48,87,99,117</sup> De plus, les souches ovines de *MAP* sont réputées comme étant très difficiles à cultiver.<sup>10,24,63,67,70,80,85,99,105,115,121</sup> Dans les premières phases de l'infection expérimentale chez les ovins et caprins, très peu, sinon aucun organisme ne peut être démontré par les colorations acido-alcool-résistantes mais leur nombre augmente progressivement avec le temps.<sup>9,22,96</sup> Dans les dernières phases de la paratuberculose, deux types de lésions peuvent être vus selon l'intensité et le type de réponse immunitaire produites par l'hôte; les lésions « multibacillaires » ou « lépromateuses » sont celles dans lesquelles de nombreuses bactéries sont présentes en opposition aux lésions « paucibacillaires » ou « tuberculoïdes » dans lesquelles très peu de bactéries, sinon aucune, ne peuvent être démontrées.<sup>23,84,86,114</sup> Des tests PCR ciblant la séquence *IS900* (unique à *MAP*) ont été utilisés sur des tissus fixés dans la formaline et enrobés dans la paraffine provenant de bovins, de chevreuils, d'élans, de chèvres, de kudus et de moutons afin de détecter la présence d'ADN de *MAP*.<sup>75,89,119</sup> L'IHC utilisant des anticorps anti-*Mycobacterium* a été utilisée avec succès pour le diagnostic de la paratuberculose bovine, démontrant une sensibilité égale ou légèrement supérieure aux colorations acido-alcool-résistantes, mais n'a pas été utilisée chez les ovins.<sup>13,25,69,86</sup> Selon

plusieurs études, l'IHC serait plus sensible que la coloration ZN pour la détection de *MAP* chez les caprins et ovins atteints de paratuberculose.<sup>82,86,105</sup>

Les pathologistes oeuvrant dans le milieu diagnostique sont souvent incertains de la meilleure technique à utiliser pour confirmer la présence de *MAP* lorsque confrontés à des lésions suggestives de paratuberculose chez le mouton. Nous avons donc tenté de comparer trois méthodes diagnostiques qui utilisent des produits facilement disponibles pour un laboratoire diagnostique standard. Utilisant comme étalon de référence d'une infection par *MAP* les lésions histopathologiques, nous avons comparé la coloration ZN, l'IHC utilisant un antisérum commercial anti-*Mycobacterium bovis* et le PCR basé sur la séquence d'insertion IS900, quant à leur sensibilité et à leur spécificité. Ces méthodes diagnostiques ont été appliquées à des échantillons fixés dans la formaline et enrobés dans la paraffine. Notre hypothèse est que le l'IHC et/ou le PCR devrait se révéler être des méthodes diagnostiques plus sensibles et/ou spécifiques que le ZN qui est la coloration classique pour révéler les bactéries acido-alcool-résistantes.

# RECENSION DE LITTÉRATURE

## 1. INTRODUCTION

La paratuberculose a été décrite pour la première fois en Allemagne en 1895 par Johne et Frothingham comme un cas particulier de tuberculose chez une vache.<sup>56</sup> Il a fallu onze ans pour faire la différence entre la paratuberculose et la tuberculose bovine.<sup>22</sup> En 1912, un Anglais du nom de Tworth a isolé l'agent de la paratuberculose après avoir ajouté une préparation de *Mycobacterium phlei* au milieu de culture. Les postulats de Koch (trouver le même agent pathogène chez chacun des individus malades examinés, isoler l'agent pathogène d'un sujet atteint et faire une culture pure du microorganisme, provoquer la maladie chez des animaux de laboratoire en leur inoculant le microorganisme cultivé, isoler le même agent pathogène chez ces animaux une fois la maladie déclarée) ont été remplis cette même année.<sup>16,22</sup> La mycobactérie en cause a tout d'abord été nommée *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis Johne* puis est apparue officiellement en 1923 dans la première édition du « Bergey's manual of determinative bacteriology » sous le nom de *Mycobacterium paratuberculosis*. Elle est maintenant connue sous l'appellation de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ou *MAP*.

La paratuberculose est répandue mondialement et sa prévalence semble être en croissance dans plusieurs pays.<sup>22,59,104</sup> La prévalence réelle de l'infection par *MAP* est difficile à évaluer et est probablement sous-estimée étant donné la nature insidieuse de la maladie, la réticence à déclarer les cas et la difficulté d'identifier les animaux asymptomatiques.<sup>104,120</sup> De plus, les méthodes utilisées pour évaluer la prévalence varient énormément d'une étude à l'autre (i.e. bactériologie sur pièces prélevées à l'abattoir, bactériologie fécale, sérologie) ce qui rend les comparaisons difficiles.<sup>3,41</sup> Déjà, en 1933, une étude mettait en garde l'industrie bovine américaine

sur la lente mais constante progression de la paratuberculose dans ce pays.<sup>21</sup> Au Danemark, deux études similaires réalisées en 1963 et 1973 et utilisant des échantillons d'abattoir ont démontré une progression de la prévalence de l'infection de 2,3% à 9,8% chez les bovins.<sup>3</sup> Plus récemment, on estimait qu'aux États-Unis, la prévalence d'infection par *MAP* des troupeaux bovins laitiers pourrait atteindre jusqu'à 54% dans certaines régions.<sup>21,57,59,67,78,120</sup> À l'échelle nationale (Etats-Unis), la prévalence d'infection par *MAP* serait de l'ordre de 22% des troupeaux.<sup>59,67,120</sup> Ces taux d'infection sont comparables à ceux rapportés dans d'autres pays comme la Belgique et l'Angleterre.<sup>22,120</sup> Au Canada, une étude de séroprévalence a démontré que dans les Maritimes 16,7% des troupeaux laitiers auraient au moins 2 animaux positifs à *MAP*.<sup>74</sup> Des études en Ontario et dans les Maritimes ont démontré que sur une base individuelle, la séroprévalence d'infection par *MAP* chez les bovins laitiers varierait de 2,6% à 6,1%.<sup>20,74,108,</sup>

Très peu d'études portant sur la prévalence de la paratuberculose ont été faites chez les ovins. On sait cependant que cette maladie affecte les moutons de la plupart des pays incluant les grands pays producteurs tels que l'Australie, la Nouvelle-Zélande, les États-Unis, l'Angleterre et le Canada.<sup>99,117,120</sup> En fait, la Suède est le seul pays qui se dit exempt de paratuberculose.<sup>3</sup> Une étude récente effectuée au Québec estime que le quart des trente troupeaux ovins étudiés était infecté par *MAP* et que la paratuberculose était la cause la plus commune de mortalité d'animaux adultes dans ces troupeaux (31,3 % des mortalités).<sup>2</sup>

L'impact économique de la paratuberculose chez les bovins et les ovins est difficile à évaluer. Les pertes causées par cette maladie sont attribuables à une diminution de productivité et de fertilité, à une augmentation de la susceptibilité à d'autres infections, aux coûts des traitements et des frais de vétérinaire et à la perte de valeur à l'abattoir.<sup>4,21,55</sup> On estime que les pertes encourues par l'industrie agro-alimentaire bovine aux États-Unis seraient de 1,5 milliards par année et de 40 à 277 \$ par année, par vache.<sup>4,51,97</sup>

## 2. ÉCOLOGIE

### 2.1 L'agent pathogène

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* est une mycobactérie. Elle fait donc partie de l'ordre des Actinomycètes, famille des Mycobactériacées, genre *Mycobacterium*.<sup>3,79,84,92</sup> Ce genre contient 85 espèces distribuées en deux groupes, les mycobactéries classiques du complexe de la tuberculose, incluant *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti* et *M. africanum*, et en mycobactéries atypiques.<sup>92</sup> Ces dernières sont subdivisées en mycobactéries à croissance lente, incluant le complexe *M. avium*, et à croissance rapide tel le complexe *M. fortuitum*.<sup>92</sup> Le complexe *M. avium* comprend deux espèces soit *M. intracellulare* et *M. avium* qui est lui-même subdivisé en trois sous-espèces selon les caractéristiques phénotypiques et génétiques des bactéries, soit *M. avium avium* (*MAA*), *MAP* et *M. avium sylvaticum* (Tableau I).<sup>92</sup> *MAP* est un organisme très apparenté génétiquement à *MAA*. En effet, il y aurait plus de 99% d'homologie entre l'acide désoxyribonucléique de ces deux bactéries et la séquence de leur acide ribonucléique ribosomique 16S serait identique.<sup>51,84</sup> Cependant, certaines caractéristiques de culture (*MAP* une croissance plus lente que *MAA* et requiert un milieu enrichi de mycobactine) ainsi que leur pathogénicité permettent de les différencier et de les placer en deux sous-espèces distinctes.<sup>67</sup>

**Tableau I : Taxonomie mycobactérienne : quelques espèces du genre *Mycobacterium***

Complexe de la tuberculose	Mycobactéries atypiques	
- <i>M. tuberculosis</i>	Mycobactéries à	Mycobactéries à
- <i>M. bovis</i>	<u>croissance rapide</u>	<u>croissance lente</u>
- <i>M. microti</i>	Complexe <i>M. fortuitum</i>	Complexe <i>M. avium</i>
- <i>M. africanum</i>	- <i>M. fortuitum</i>	- <i>M. avium</i>
	- <i>M. chelonae</i>	- <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>
	- <i>M. peregrinum</i>	- <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
		- <i>M. avium</i> subsp. <i>sylvaticum</i>
		- <i>M. intracellulare</i>

*MAP* est un petit bacille de 0,5 X 1,5 microns, faiblement Gram positif et généralement alcool-acido-résistant bien que certaines souches soient peu ou non acido-alcool-résistantes.<sup>21,41</sup> Il s'agit d'une bactérie à croissance aérobie remarquablement lente (temps moyen de division de 48 heures) et fastidieuse à cultiver.<sup>22,91,92</sup> Au microscope à balayage électronique, ces bactéries forment des amas enchevêtrés dans des filaments intercellulaires.<sup>21</sup> Comme les autres mycobactéries pathogènes, *MAP* a besoin d'un apport en fer pour croître mais contrairement à la presque totalité des mycobactéries, elle est incapable de synthétiser la mycobactine, un sidérophore intimement associé à l'enveloppe cellulaire qui permet de lier et de transporter le fer dans la bactérie.<sup>5,79</sup> On doit donc ajouter la mycobactine au milieu de culture comme facteur de croissance.<sup>22</sup> Cette dépendance à la mycobactine, presque unique parmi les mycobactéries, a longtemps été utilisée pour identifier *MAP* en culture.<sup>22</sup> Le mécanisme par lequel *MAP* réussit à capter le fer *in vivo* est encore nébuleux bien que ce soit vraisemblablement fait via l'élaboration d'exochéline, un agent chélateur du fer excrété par le bacille.<sup>5,22</sup> Une autre caractéristique de ce bacille est la présence de la séquence IS900, une séquence

d'insertion de la famille IS110 qui lui est propre et unique.<sup>29,45,67,110</sup> Les séquences d'insertion sont de petits éléments génétiques mobiles causant des mutations par insertion.<sup>45</sup> La séquence IS900 est présente en 14-18 copies dans chaque bactérie et est à la base des tests diagnostiques par PCR utilisés pour identifier *MAP*.<sup>38,67,84,116</sup> Une autre séquence d'insertion, IS1311, est également retrouvée chez *MAP*, elle est cependant moins spécifique puisqu'on la retrouve également chez *Mycobacterium avium avium*.<sup>116</sup>

Une des caractéristiques de toutes les mycobactéries est qu'elles possèdent une paroi cellulaire de composition et de structure particulières, organisée en couches successives.<sup>92</sup> La composition et l'organisation exactes de ces couches restent cependant l'objet de discussion. La couche profonde serait formée d'une membrane cytoplasmique riche en lipides, la deuxième couche serait composée de peptidoglycans liés à des chaînes d'arabinogalactane (polysaccharides), la troisième couche serait composée d'acide mycolique puis, il y aurait une couche externe de glycopeptidolipides.<sup>92,103,106</sup> Il faudrait ajouter à tout cela une capsule formée de lipoarabinomannane et de lipo-oligosaccharides, présente chez les mycobactéries pathogènes.<sup>92</sup>

## 2.2 Résistance environnementale

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* est un germe très résistant. Il peut survivre dans les fèces de 152 à 246 jours selon les conditions environnementales.<sup>67</sup> Plusieurs facteurs peuvent réduire sa survie dans le sol, notamment l'assèchement du sol, un pH de plus de 7,0 (bien que ce facteur soit remis en question par Jhonson-Ifearulundu puisqu'il manque d'analyse épidémiologique quantitative, en relation avec la paratuberculose<sup>56</sup>), une faible concentration en fer ou un sol imbibé d'urine bovine (l'urine d'herbivore a normalement un pH de plus de 8,0).<sup>21,56,66,67,93</sup> Sa survie dans l'eau semble être encore plus longue, jusqu'à 17 mois à un pH de 7,0.<sup>66</sup> Les mycobactéries sont reconnues comme étant très résistantes à la

chaleur, et parmi celles-ci, *MAP* semble être une des plus résistantes. Cette résistance à la chaleur représente un danger potentiel pour la santé publique puisqu'on a découvert au Royaume-Uni que *MAP* pouvait survivre à la pasteurisation (72 à 74°C pendant 15 secondes ou 72 à 75°C pendant 25 secondes) et se retrouver dans le lait commercial consommé par les humains.<sup>44</sup> Les rayons ultraviolets sont très efficaces pour inactiver de nombreux germes (virus et bactéries) y compris *MAP*.<sup>66,67</sup> Finalement, *MAP* semble résistante à plusieurs désinfectants.<sup>21</sup> On note par exemple qu'elle serait plus résistante aux produits chlorés que la plupart des autres bactéries bien qu'on estime qu'elle serait aussi sensible que *Mycobacterium tuberculosis* aux désinfectants tuberculocides (phénol, glutaraldehyde 2%).<sup>11,66,67</sup>

### 2.3 Souches bactériennes

On a remarqué depuis longtemps que certaines souches de *MAP* sont pigmentées, donnant une couleur jaunâtre à orangée aux colonies et aux lésions intestinales.<sup>22,100</sup> Ces souches semblent avoir une préférence pour l'espèce ovine et une restriction à certaines zones géographiques (Écosse, Angleterre, Îles Féroé, Espagne et Maroc).<sup>100</sup> La difficulté de cultiver certains isolats ovins suggère également l'existence de plusieurs souches.<sup>28</sup> L'identification de deux souches distinctes de *MAP* sur une base génétique a finalement été faite en 1990 en utilisant la technique RFLP sur la séquence d'insertion *IS900*.<sup>28</sup> Ces deux souches ont été nommées souche C (cattle) et souche S (sheep) en regard de leur préférence d'hôte. Cette préférence d'hôte semble cependant relative. Bien que la souche S semble restreinte à l'espèce ovine, la souche C peut infecter de nombreuses espèces.<sup>71,115</sup> Ce constat est utilisé afin d'établir des programmes de contrôle de la paratuberculose. En Australie, par exemple, on utilise des pâturages contaminés par des moutons infectés de paratuberculose pour y faire paître les vaches, puisque la souche S ne peut théoriquement pas les affecter. Malheureusement, l'infection de bovins par l'administration de doses expérimentales massives de *MAP* de souche ovine est

possible et des cas naturels d'infection bovine par des souches ovines sont rapportés.<sup>100,115</sup>

On connaît maintenant des méthodes plus rapides et moins coûteuses pour différencier les souches C et S telles que l'analyse du polymorphisme de la séquence d'insertion IS300 ou l'analyse par PCR de différences dans la séquence d'insertion IS900.<sup>27,116</sup> Il a été récemment proposé que ces deux souches soient nommées type I (souches à croissance lente ayant comme hôte privilégié les moutons) et type II (souches à croissance plus rapide, communément isolées chez les bovins mais ayant une grande diversité d'hôtes possibles) sur une base génétique, établie par des tests tels que l'électrophorèse à champs pulsés sur gel.<sup>100</sup>

## **2.4 Espèces susceptibles à l'infection**

### **2.4.1 Polygastriques :**

La paratuberculose est principalement connue comme étant une maladie des ruminants domestiques (bovins, ovins, caprins) mais a également été diagnostiquée chez une multitude de ruminants d'élevage (cerfs, bisons), de ruminants sauvages (cerfs à queue blanche, cerfs rouges, mouflons, orignaux) ou de pseudo-ruminants (lamas, alpacas, camélidés).<sup>8,21,22,35,66,67</sup> Cette grande diversité d'hôtes pourrait compliquer grandement les programmes de contrôle de la maladie dans les élevages commerciaux étant donné la possibilité de transmission de la maladie entre les animaux sauvages et domestiques.<sup>66</sup> Il existerait peut-être même une différence de susceptibilité entre certaines races ou groupes d'animaux au sein d'une même espèce. Certaines races de bovins de boucherie (Shorthorn et Channel Island) et d'ovins seraient plus susceptibles de développer la paratuberculose tout comme les vaches laitières le seraient plus que les bovins de boucherie.<sup>22,103</sup>

### 2.4.2 Monogastriques :

Certains monogastriques sont susceptibles à l'infection. On sait par exemple que l'administration massive de *MAP* à des chevaux, des porcs et des poulets entraîne la formation de lésions mais sans signe clinique.<sup>6,21,22</sup> L'infection expérimentale de plusieurs espèces d'animaux de laboratoire a été réussie, le hamster se révélant être un bon hôte pour la multiplication de *MAP*.<sup>43</sup> Plus inquiétant pour les programmes de contrôle de la maladie dans les élevages est la découverte, en Écosse, de cas de paratuberculose naturelle chez des lapins vraisemblablement infectés après avoir ingéré des végétaux contaminés par des bovins atteints de paratuberculose.<sup>34,46</sup> On a démontré par la suite, dans cette même région, que des carnivores tels que des renards, des hermines, des belettes et des blaireaux ainsi que de nombreux autres petits animaux sauvages (souris des bois, rats, lièvres bruns, corbeaux) étaient porteurs de *MAP* et pouvaient même développer des lésions.<sup>8,35</sup> Finalement, on sait que les primates peuvent être infectés par *MAP* et que, bien qu'il y ait de nombreux débats autour de cette question, ce germe pourrait être en tout ou en partie à l'origine de la maladie de Crohn chez les humains.<sup>6,19,63,72,81</sup>

## 3. PATHOGÉNIE

### 3.1 Transmission et susceptibilité à l'infection

Bien que la maladie se déclare généralement entre 2 et 5 ans d'âge chez les bovins et après 2 ans chez les ovins, les jeunes sont plus susceptibles à l'infection ce qui implique une longue période subclinique.<sup>3,21,22,49,64,120</sup> L'infection à un âge plus avancé est possible mais demande probablement l'ingestion d'une plus grande quantité de bactéries.<sup>102</sup> La principale voie de transmission de la paratuberculose est féco-orale, à la suite de la contamination des trayons, du colostrum, du lait ou encore par contamination de la nourriture, du sol ou de l'eau.<sup>3,21,22,41,101,102,120</sup> Pendant la période subclinique, de nombreux animaux infectés commencent déjà à excréter de

manière intermittente des bactéries dans l'environnement.<sup>21,22</sup> Cette excrétion peu parfois durer jusqu'à 18 mois avant l'apparition de signes cliniques alors qu'une fois la maladie déclarée, chaque animal malade peut excréter jusqu'à  $5 \times 10^8$  bacilles par jour.<sup>3,21,22</sup> La persistance de la maladie dans un troupeau est donc principalement due à une transmission des adultes aux jeunes.<sup>120</sup> Expérimentalement, l'ingestion d'aussi peu que 10 000 bactéries peut engendrer l'apparition de lésions chez le mouton alors que de  $1 \times 10^8$  à  $5 \times 10^{12}$  bactéries peuvent mener au développement de la maladie chez des bovins ou ovins.<sup>22</sup> Bien que la transmission horizontale soit la voie de transmission la plus fréquente, la transmission verticale est possible.<sup>41</sup> Ce type de transmission, démontré chez les bovins et les ovins, se produirait surtout lorsque la mère est à un stade avancé de la maladie.<sup>66,67,95,120</sup> On estime que le risque de transmission fœtale de *MAP* chez les vaches laitières gravides atteintes de paratuberculose serait de 26,4%.<sup>95</sup> Notons que *MAP* a déjà été isolé à partir de testicules, de semences, de glandes bulbouréthrales, de prostate et de vésicules séminales de bœuf.<sup>21,65,107</sup>

### 3.2 Infection de l'hôte

On croit que la pathogénie de la paratuberculose est similaire chez tous les ruminants.<sup>22</sup> Après ingestion, *MAP* doit survivre aux différents mécanismes de défense non-spécifiques du tractus gastro-intestinal tels que les enzymes gastriques, la compétition avec la flore bactérienne résidente, le mucus et la dilution dans le rumen.<sup>22</sup> Le bacille se rend jusqu'à la partie distale du petit intestin où il est internalisé par les cellules M qui recouvrent les plaques de Peyer et est transmis par transcytose aux macrophages sub- et intraépithéliaux.<sup>76,103</sup> L'addition de sérum bovin anti-*MAP* augmenterait la capture de la bactérie par les cellules M (par formation de complexe immuns et opsonisation) ce qui signifie que les anticorps anti-*MAP* contenus dans le lait de la mère pourraient contribuer à stimuler l'infection des veaux.<sup>22,76,103</sup>

Le macrophage est la cible ultime de *MAP*.<sup>1,103</sup> Cette bactérie peut survivre dans le milieu intracellulaire du macrophage, s'y multiplier et finalement tuer la cellule.<sup>1,103</sup> Les macrophages étant d'efficaces cellules phagocytaires, *MAP* doit donc utiliser plusieurs mécanismes pour éviter la destruction. Tout d'abord, pour être efficaces, les cellules phagocytaires doivent reconnaître et s'attacher à la bactérie, l'engouffrer puis la détruire.<sup>31</sup> La phagocytose peut entre autre être accomplie via les récepteurs du complément (RC), les récepteurs du mannose (RM) ou les récepteurs des fragments Fc des immunoglobulines (RFc). L'entrée de *MAP* via les RC et les RM ne stimule pas l'explosion oxydative et la formation de radicaux libres dans le macrophage.<sup>103</sup> Ces voies d'entrée sont donc probablement privilégiées au détriment de l'entrée via les RFc qui eux, stimulent la formation de radicaux libres très nocifs pour les bactéries.<sup>103</sup> Parmi les mécanismes développés par les mycobactéries pour privilégier l'entrée dans les macrophages via les RC et les RM, on note leur capacité à générer eux-mêmes le C3b (la composante du complément qui sert d'opsonine et qui est un ligand des RC) et la présence d'arabinomannane dans leur paroi cellulaire qui peut interagir avec les RM.<sup>103</sup> Ceci dit, d'autres mécanismes d'entrée dans les macrophages sont connus, notamment via les récepteurs CD14, mais leur importance demeure inconnue.<sup>22</sup> Après son entrée dans le macrophage, *MAP* doit survivre à la destruction intracellulaire. On en sait peu sur les différents mécanismes de cette résistance mais les connaissances obtenues de l'étude d'autres mycobactéries telles *M. tuberculosis* peuvent nous aider à comprendre. Parmi ces mécanismes, la présence d'une paroi cellulaire protectrice joue probablement un rôle majeur.<sup>22</sup> On sait que cette paroi contient du lipoarabinomannane qui tout en diminuant l'activation des macrophages et des lymphocytes T peut aussi aider à récupérer certaines substances cytotoxiques.<sup>103</sup> D'autres composantes de la paroi telles que le facteur inhibiteur des macrophages et le dimycolate-6, 6' de tréhalose (cord factor) peuvent récupérer et/ou inactiver les radicaux libres.<sup>103</sup> Parmi les autres mécanismes connus on note la production de sulphotide pour empêcher la fusion du phagosome et du lysosome, l'évasion de la mycobactérie hors du phagosome et la production de superoxyde dismutase pour inhiber les processus oxydatifs.<sup>22,103</sup>

### 3.3 Signes cliniques

Chez les bovins, les signes classiques de la paratuberculose sont : diarrhée chronique, perte de poids progressive malgré un bon appétit, hypoprotéïnémie avec œdème sous-cutané (souvent dans la région intermandibulaire) et diminution de production lactée.<sup>22,59,66,67,113</sup> La période d'infection subclinique est particulièrement longue et est suivie d'une phase clinique qui varie de quelques semaines à plusieurs mois.<sup>59</sup> La diarrhée peut être constante ou intermittente avec une tendance à s'atténuer en gestation avancée et à réapparaître après la parturition.<sup>21,59</sup> Chez les ovins et caprins, la diarrhée n'est pas être un signe clinique constant comme chez les bovins.<sup>21,23,66,67</sup> Par contre, la perte de poids chronique, l'œdème sous-cutané et la mauvaise qualité de la laine (ovin) peuvent indiquer la présence de la maladie chez un animal.<sup>21,22,41</sup> La diarrhée, la perte de poids et l'hypoprotéïnémie sont dues, à tout le moins en partie, à la malabsorption et à la perte protéique marquée qui résultent de l'infiltration granulomateuse de la paroi intestinale.<sup>22</sup>

### 3.4 Lésions

#### 3.4.1 Lésions macroscopiques

Chez les ruminants, la paratuberculose affecte principalement le tractus digestif et les nœuds lymphatiques mésentériques.<sup>21,84</sup> Les lésions peuvent s'étendre du duodénum au rectum bien qu'elles soient généralement concentrées dans la région de l'iléon distal, où elles se développent en premier lieu.<sup>21,84</sup> On note un épaississement segmentaire à diffus de la paroi intestinale causé par l'infiltrat inflammatoire et à un moindre degré l'œdème.<sup>6,21,22,66,84,99</sup> La muqueuse est épaissie avec formation de replis transverses rapprochés qui ne disparaissent pas lorsque l'intestin est étiré.<sup>6,21,22,23,66,99</sup> Les vaisseaux lymphatiques de la paroi intestinale et du

mésentère peuvent être dilatés, épaissis et proéminents (lymphangite).<sup>6,21,22,23,84</sup> Les nœuds lymphatiques mésentériques sont souvent volumineux, oedémateux et, chez certaines espèces tels que les caprins, peuvent contenir des granulomes.<sup>6,21,22,23,84</sup> Des lésions peuvent parfois être détectées ailleurs que dans le tractus digestif. On peut quelquefois voir de petits granulomes dans le foie de même que de la minéralisation sous-endothéliale de l'aorte et du cœur.<sup>6,22,84</sup> De nombreux changements secondaires aux changements intestinaux peuvent être notés tels que l'œdème sous-cutané, l'atrophie séreuse des graisses, l'émaciation, l'atrophie musculaire et la déshydratation.<sup>22,84</sup> On note certaines particularités chez l'espèce ovine; les lésions intestinales peuvent être plus étendues mais moins sévère chez le ovins que chez les bovins et la paroi intestinale peut prendre une teinte orangée à cuivrée avec certaines souches bactériennes ovines (section 2.3).<sup>6,21,23,106</sup>

### 3.4.2 Lésions microscopiques

Chez les bovins, l'espèce la plus étudiée, les lésions microscopiques de la paratuberculose sont concentrées dans le tractus digestif, principalement l'iléon distal, de même que dans les nœuds lymphatiques mésentériques correspondants.<sup>84</sup> Les lésions initiales se développent sous forme de petits granulomes dans la région interfolliculaire des plaques de Peyer de l'iléon distal, puis s'étendent au reste de la paroi intestinale.<sup>22,86</sup> La lésion classique est une infiltration massive du chorion de la muqueuse par des macrophages spumeux, accompagnés de cellules géantes multinucléées, de lymphocytes et parfois de granulocytes (neutrophiles) s'accumulant dans les cryptes dilatés.<sup>6,21,22,23,84,86</sup> La paroi intestinale est souvent œdémateuse et on peut noter la présence d'hémorragies. Les villosités de la muqueuse sont distendues, atrophiques et souvent fusionnées avec leurs voisines.<sup>6,21,22,23,84</sup> Des ulcérations de la muqueuse sont possibles. Les cryptes sont séparées les unes des autres par l'infiltrat inflammatoire. L'inflammation s'étend souvent à toute la paroi intestinale, incluant la séreuse. On remarque parfois la présence de leucocytes globulaires au sein ou autour des ganglions nerveux myentériques ce qui pourrait

laisser croire à la possibilité d'une composante allergique.<sup>14,22</sup> Les vaisseaux lymphatiques de la paroi intestinale et du mésentère sont distendus et enflammés.<sup>6</sup> Les nœuds lymphatiques mésentériques qui drainent la lésion sont souvent oedémateux et infiltrés de macrophages et de cellules géantes multinucléées qui s'accumulent tout d'abord dans les sinus sous-capsulaires puis s'étendent de manière confluyente à tout le nœud lymphatique.<sup>6</sup> Des lésions microscopiques peuvent aussi être vues dans d'autres organes. On note parfois la présence de granulomes dans le foie et les nœuds lymphatiques environnants de même que la présence de lésions athérosclérotiques dans l'aorte et le cœur avec fibrose intimale et minéralisation.<sup>6,14,21,84,99</sup> Les lésions chez le mouton sont généralement similaires à celles décrites chez les bovins bien que chez les ovins, il semble possible de voir la formation de granulomes avec des centres de nécrose caséuse parfois minéralisés, typiques des lésions caprines.<sup>21,22,23</sup>

Plusieurs méthodes de classification des lésions intestinales ont été proposées.<sup>22</sup> Bien que dans les cas classiques de paratuberculose la muqueuse soit diffusément infiltrée de macrophages spumeux accompagnés d'une quantité moindre de lymphocytes, dans certains cas, la composante lymphocytaire est prépondérante avec quelques amas macrophagiques dispersés. Certains ont qualifié la lésion granulomateuse diffuse classique de « lépromateuse » et la lésion plus lymphocytaire de « tuberculoïde » en rapport avec l'image histologique de l'infection par *M. lepreae* ou *M. tuberculosis*.<sup>22,23,84</sup> Une autre classification est basée sur la quantité de bactéries décelables dans les lésions en utilisant les méthodes de colorations histologiques conventionnelles pour les bactéries acido-alcool-résistantes. On désigne comme « pluribacillaires » les cas où de nombreuses bactéries sont décelables (correspondant aux lésions « lépromateuses ») et « paucibacillaires » les cas où les bactéries sont en faibles quantités ou non observées (correspondant aux lésions « tuberculoïdes »).<sup>22,84</sup> Finalement, une des classifications les plus précises a été développée chez le mouton et représenterait différents stades du développement de la maladie.<sup>23</sup> Cette classification sépare les lésions attribuées à la paratuberculose

en 3 grands groupes et quelques sous-groupes (Table II).<sup>86</sup> Les lésions intestinales de type 1 sont formées de petits granulomes accompagnés de quelques lymphocytes dans la région interfolliculaire des plaques de Peyer. Les lésions de type 2 sont similaires à celles de type 1 mais plus nombreuses et s'étendent dans le chorion de la muqueuse avoisinante. Le type 3 est subdivisé en type 3a, 3b et 3c. Dans le type 3a, les granulomes sont plus nombreux et plus volumineux que dans le type 2 et s'étendent aux villosités qui commencent à prendre du volume. Le type 3b représente la lésion classique de la paratuberculose et est le corollaire des lésions caractérisées comme « lépromateuses » ou « pluribacillaires » décrites ci-haut.<sup>22,86</sup> Finalement le type 3c est le corollaire des lésions décrites comme « tuberculoïdes » ou « paucibacillaires » (donc une infiltration lymphocytaire diffuse avec présence d'amas de macrophages).<sup>22,86</sup> Les lésions de type 3b et 3c sont considérées comme des lésions avancées de la maladie et sont les seules dans lesquelles on peut voir des lésions macroscopiques (outre une légère proéminence des vaisseaux lymphatiques de la séreuse intestinale chez quelques animaux ayant des lésions de type 3a).<sup>86</sup> Bien que les lésions de type 3b soient considérées comme classiques, les lésions de type 3c pourraient être vues jusque dans 30% des cas de paratuberculose clinique chez le mouton.<sup>120</sup> En utilisant les techniques conventionnelles de coloration des bactéries acido-alcool-résistantes, on ne détecte généralement pas de bactérie dans les types 1 et 2, peu ou pas dans les types 3a et 3c mais on en voit énormément dans le type 3b.<sup>22,86</sup>

Table II Classification des lésions intestinales causées par *Mycobacterium avium* subs. *Paratuberculosis* chez le mouton selon Perez et al.<sup>86</sup>

Type de la lésion	Description des lésions
1	Petits granulomes accompagnés de quelques lymphocytes dans la région interfolliculaire des plaques de Peyer
2	Petits granulomes plus nombreux dans les plaques de Peyer qui s'étendent dans le chorion de la muqueuse avoisinante
3a	Granulomes plus nombreux et plus volumineux que dans le type 2 et s'étendent aux villosités. Les villosités commencent à prendre du volume
3b	Lésions intestinales classiques de paratuberculose soit une infiltration massive du chorion de la muqueuse par des macrophages spumeux, accompagnés de cellules géantes multinucléées, de lymphocytes et parfois de granulocytes (neutrophiles) s'accumulant dans les cryptes dilatés. La paroi intestinale est souvent œdémateuse et on peut noter la présence d'hémorragies. Les villosités de la muqueuse sont distendues, atrophiques et souvent fusionnées avec leurs voisines. Des ulcérations de la muqueuse sont possibles. Les cryptes sont séparés les uns des autres par l'infiltrat inflammatoire. L'inflammation s'étend souvent à toute la paroi intestinale, incluant la séreuse.
3c	Lésions tout aussi extensives que les lésions de type 3b mais dominées par une infiltration lymphocytaire diffuse avec présence d'amas de macrophages

### 3.5 Paratuberculose et système immunitaire

On ne peut bien comprendre la pathogénie de la paratuberculose sans bien comprendre les mécanismes immunitaires impliqués. En effet, l'interaction entre *MAP* et le système immunitaire est centrale dans le développement des lésions et de la maladie. Deux mécanismes se côtoient simultanément mais s'opposent : l'immunité à médiation cellulaire et l'immunité à médiation humorale.<sup>3,22,61,88,98,103</sup> Puisque *MAP* est un organisme intracellulaire facultatif, l'immunité à médiation cellulaire est beaucoup plus efficace pour sa destruction, les bacilles étant protégés des mécanismes de défense du milieu extracellulaire tels les

anticorps et le complément.<sup>33,103</sup> Comme expliqué dans la section 3.2, après avoir été internalisé par les cellules M bordant le dôme des plaques de Peyer, *MAP* est transféré aux macrophages sous-jacents et y persiste. Les macrophages ainsi infectés deviennent des cellules présentatrices d'antigène. Les antigènes sont présentés via des complexes d'histocompatibilité de classe I ou II (CMH-I, CMH-II) à diverses populations naïves de lymphocytes T.<sup>12</sup> Les lymphocytes T de type CD4<sup>+</sup>, qui reconnaissent les antigènes présentés via un CMH-II, sont particulièrement importants dans la pathogénie de la paratuberculose et sont subdivisés en Th0, Th1 et Th2.<sup>12,62</sup> Les Th0 sont des lymphocytes CD4<sup>+</sup> naïfs qui peuvent se différencier en Th1 ou Th2 (après avoir lié le complexe antigène-CMH-II) selon le type d'antigène et les cytokines présentes dans le milieu environnant.<sup>12</sup> Les lymphocytes de type Th1 sont des intermédiaires de l'immunité à médiation cellulaire alors que les Th2 sont les intermédiaires de l'immunité à médiation humorale.<sup>12,61</sup> Il est important de savoir que bien que les deux types de réaction immunitaire surviennent simultanément lors d'une infection, elles tendent à se polariser. Premièrement, les macrophages peuvent produire des cytokines qui vont stimuler une sous-classe de lymphocytes et inhiber l'autre, deuxièmement, les cytokines produites par une sous-classe de lymphocytes peuvent être inhibitrices pour l'autre sous-classe ou pour les macrophages.<sup>12,22,112</sup> Les Th1 vont principalement produire de l'IL-2, nécessaire à leur prolifération, de l'IFN-gamma, un puissant inducteur des macrophages essentiel à la destruction des mycobactéries et le TNF-alpha qui aide à recruter des monocytes en circulation alors que les Th2 vont principalement produire de l'IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 pour stimuler la production d'anticorps ou, comme dans le cas de l'IL-10, inhiber l'activation des macrophages.<sup>4,12,33,67,103,112</sup> Finalement, le rôle des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (cytotoxiques) n'est pas clair, certains croient qu'il serait limité à une fonction de régulation dans la paratuberculose alors que d'autres croient qu'une réaction cytotoxique forte en début d'infection est nécessaire pour tuer les macrophages incapables de tuer *MAP* (infectés de manière persistante).<sup>22,33</sup>

Le type de lymphocytes présents dans les plaques de Peyer de l'iléon pourrait expliquer la propension des lésions à se retrouver dans cette région. En effet, on sait que chez les jeunes ruminants les plaques de Peyer de l'iléon sont composées de grands follicules lymphoïdes constitués de lymphocytes B (IMH) et de très peu de zones interfolliculaires composées de lymphocytes T (1-2% de lymphocytes T).<sup>22,94</sup> Ces plaques de Peyer seraient donc un terreau fertile pour la prolifération de *MAP* dans un environnement où l'IMC est faible. Avec l'âge, il y a involution des plaques de Peyer ce qui pourrait expliquer la plus faible susceptibilité des adultes à l'infection.<sup>103</sup>

Il est maintenant bien établi que lors de paratuberculose, il y a une transition d'une réaction immunitaire à médiation cellulaire forte dans les premiers stades de la maladie vers une réaction à médiation humorale dans les stades plus avancés.<sup>3,22,61,88,98,103</sup> Les causes exactes de cette transition sont mal comprises mais cette transition semble liée à une perte de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, menant à une perte de l'inhibition de la réplication mycobactérienne intra-macrophagienne.<sup>62</sup> L'animal infecté en très jeune âge développerait initialement une réponse immunitaire à médiation cellulaire qui pourrait éliminer l'agresseur (probablement la situation la plus fréquente) ou le tenir en échec pour une longue période de temps.<sup>22,84,86</sup> Les lésions microscopiques de type 1, très minimes, représentent probablement la situation d'un animal avec une IMC forte.<sup>86</sup> Les lésions de type 2 et 3a représentent probablement une progression de l'infection due à un affaiblissement de l'IMC.<sup>86</sup> Les lésions de type 3b avec leurs nombreux macrophages gorgés de bactéries mais peu de lymphocytes (paratuberculose classique) s'observeraient lors de l'écroulement de l'IMC au profit de l'IMH alors que les lésions de type 3c, avec leur peu de macrophages, leurs rares bactéries et leur infiltrat lymphocytaire massif représenteraient un état de forte IMC mais tout de même sans capacité de contenir l'infection.<sup>15,86</sup>

#### 4. Diagnostic de la paratuberculose

Bien que le diagnostic *ante mortem* de la paratuberculose en phase avancée de la maladie ne soit pas considéré comme difficile, la détection d'animaux infectés mais ne démontrant pas de signe clinique, peu être problématique.<sup>63,84</sup> Le but ultime de la recherche sur les méthodes diagnostiques de la paratuberculose serait de trouver une méthode fiable qui pourrait détecter le plus tôt possible l'infection par *MAP*, ce qui n'est pas encore réalisé.<sup>36</sup> En effet, la phase subclinique prolongée de la maladie, pendant laquelle les animaux peuvent excréter des bactéries dans leurs fèces et ainsi contaminer l'environnement, est un obstacle à l'élaboration de programmes de contrôle ou d'éradication.<sup>84</sup> On compte deux grands groupes de méthodes diagnostiques de la paratuberculose, les méthodes visant à mettre en évidence le germe et les méthodes visant à mettre en évidence une réponse immunitaire à l'infection.<sup>67</sup> La discussion qui suit sur les différentes méthodes diagnostiques portera surtout sur les méthodes applicables dans le diagnostic *post-mortem* de l'infection. Finalement, il faut aussi mentionner que la comparaison de données provenant d'études différentes est rendue difficile par la grande diversité des méthodes, de l'expérience variable des différents laboratoires (particulièrement pour la culture) et surtout par le fait que de nombreuses études ne tiennent pas compte du stade de la maladie chez l'animal évalué.<sup>120</sup>

##### 4.1 Culture

La culture bactérienne de *MAP* à partir d'échantillons fécaux ou de tissus est pratiquée depuis près de cent ans. Il s'agit d'une méthode diagnostique définitive (spécificité de 100%) pour le diagnostic de la paratuberculose.<sup>3,84</sup> La croissance de cette mycobactérie en milieux artificiels est cependant fastidieuse et lente. Il faut généralement de 8 à 16 semaines pour pouvoir détecter les colonies bactériennes avec les techniques classiques et on recommande de garder les milieux 6 mois avant de déclarer la culture négative.<sup>3,52,84,89,98</sup> Plusieurs milieux de culture peuvent être utilisés

notamment le milieu au jaune d'œuf d'Herrold (qui serait à prioriser pour les échantillons provenant de bovins), le milieu Lowenstein-Jensen modifié (qui serait plus efficace pour les échantillons ovins) et le milieu Middlebrook.<sup>26,58,83,117</sup> Étant donné que les échantillons renferment généralement une population bactérienne mixte (i.e. fèces, intestins) et que *MAP* croît très lentement, il faut préalablement tenter d'éliminer des échantillons les microorganismes autres que *MAP*, concentrer *MAP* et, dans certaines techniques, ajouter des antibiotiques au milieu de culture pour éviter son envahissement par d'autres bactéries.<sup>26,83</sup> La méthode classique demande une reculture sur milieu avec ou sans mycobactine exploitant ainsi la dépendance intrinsèque de cette mycobactérie à ce produit chélateur du fer, pour en faire l'identification.<sup>22,118</sup> Certaines méthodes plus sophistiquées ont été développées afin de réduire le temps de culture, notamment le système BACTEC radiométrique qui permet de réduire le temps de culture à 5-8 semaines.<sup>26,52,66,118</sup> La croissance lente et les multiples étapes requises pour la préparation des échantillons rendent la culture de *MAP* relativement dispendieuse (27.50 \$ à 55.00 \$ par échantillon au Canada), surtout à l'échelle de troupeaux.<sup>3,26</sup>

La sensibilité de la culture de *MAP* est difficile à établir puisqu'il n'y a pas d'étalon de référence.<sup>84</sup> Chez un animal donné, la sensibilité de la culture à partir d'un échantillon de fèces peut être bonne si l'animal est en phase avancée de la maladie (beaucoup de bactéries sont excrétées dans les fèces et de manière continue) mais elle semble être faible chez les animaux asymptomatiques.<sup>120</sup> On estime généralement que la sensibilité de la culture fécale des souches C de *MAP* varie de 35% à 50%.<sup>3,84</sup> Les souches S seraient encore plus difficiles à cultiver.<sup>10,24,63,67,70,80,85,99,105,115,121</sup> Dans une étude australienne du début des années 90, les auteurs n'avaient réussi à cultiver *MAP* à partir de fèces et de tissus (jejunum, ileon, cecum, noeuds lymphatique mésentériques) que chez 8% de 50 moutons avec des signes cliniques et des lésions (macroscopiques et histologiques) compatibles avec la paratuberculose.<sup>18</sup> Cette faible sensibilité fut remarquée même lorsqu'il y avait présence d'une grande quantité de bactéries acido-alcool-résistantes dans les

fèces et les tissus (histologiquement ou lors d'une impression sur lame).<sup>18</sup> Certains croient que la culture de tissus (i.e. intestins prélevés à la nécropsie ou par biopsie) serait plus sensible que la culture de fèces puisque les animaux infectés mais qui n'excrètent pas de bactéries, ainsi que les animaux ayant une faible charge bactérienne seraient plus susceptibles d'être détectés en utilisant des tissus.<sup>117,120</sup> On estime que les échantillons qui devraient être récoltés pour culture lors d'une nécropsie sont l'iléon, le jéjunum, le cecum, le nœud lymphatique iléocœcal ainsi qu'un nœud lymphatique mésentérique.<sup>67</sup>

#### 4.2 Examens macroscopique et histopathologique

L'examen histologique, et à un moindre degré l'examen macroscopique, sont importants dans le diagnostic *post-mortem* de la paratuberculose.<sup>54</sup> L'examen macroscopique basé sur l'observation de lésions n'est pas très sensible et spécifique mais peut donner de précieux indices sur la présence de paratuberculose chez un animal, particulièrement lorsque les lésions sont bien développées (types 3b et 3c). Il est également bien reconnu que les lésions macroscopiques chez les moutons sont observées moins fréquemment que chez les bovins.<sup>18</sup> L'examen histopathologique, quant à lui, est beaucoup plus sensible et spécifique que l'examen macroscopique.<sup>18</sup> Il n'existe pratiquement pas d'agent pathogène connu autre que *MAP* pour engendrer les lésions classiques de paratuberculose (type 3b) chez les bovins et les ovins. Le diagnostic se complique cependant avec les cas moins classiques ou moins sévères. En effet, la présence d'un petit granulome dans la région interfolliculaire des plaques de Peyer (lésion de grade 1) pourrait être attribuée à beaucoup d'autres causes qu'une infection par *MAP* (corps étranger ou parasites). Lorsque l'on suspecte qu'une lésion peut être attribuée à *MAP*, il est important de tenter de mettre en évidence l'agent pathogène.

Comme mentionné à la section 2.1, *MAP* est une bactérie acido-alcoolorésistante : bien qu'elle soit théoriquement Gram positive, on doit utiliser des

colorations spéciales pour la mettre en évidence puisque l'épaisse capsule empêche la coloration Gram de fonctionner. La technique la plus utilisée est le ZN qui repose sur le principe que la carbol fuchine crée des liens acide-stables dans le milieu interne de la bactérie ainsi qu'avec les résidus d'acide mycolique de la couche lipidique externe, ce qui bloque la sortie de la fuchine prise à l'intérieur de la cellule.<sup>7</sup> La paroi cellulaire du bacille doit donc être intacte pour bien prendre la coloration ZN.<sup>13,25</sup> On a déjà démontré l'existence de forme spéciale de *MAP*, dépourvue de paroi cellulaire (sphéropastes), qui ne prend pas la coloration ZN.<sup>53,111</sup> Le ZN n'est pas très spécifique puisque de nombreuses bactéries sont acido-alcool-résistantes (*Mycobacterium bovis*, *Nocardia*, *Corynebacterium* ou *Rhodococcus*).<sup>13,25,98,105</sup> La sensibilité du ZN est limitée par le nombre de bactéries présentes dans un échantillon et le temps passé par le pathologiste à les chercher dans les tissus. On estime que 10<sup>6</sup> bactéries/gramme de tissus seraient nécessaires pour la détection de bactéries colorées par cette méthode.<sup>105</sup> Dans une étude comparant la sensibilité du ZN et de l'IHC chez les bovins, le ZN a détecté 25 animaux sur 32 atteints de paratuberculose (confirmés par culture bactérienne ou détection d'une sonde *IS900*) alors que l'IHC en avait détecté 29.<sup>13</sup> Certains ont proposé que les lames colorées par le ZN, chez un animal donné, soient examinées pour un temps minimum de 30 minutes avant de les déclarer négatives.<sup>17</sup>

Dans un effort pour augmenter la spécificité et la sensibilité de la détection de *MAP* sur des préparations histologiques, plusieurs recherches ont été conduites afin d'identifier *MAP* par des techniques immunohistochimiques. Il s'agit d'utiliser des anticorps monoclonaux ou polyclonaux qui vont lier, le plus spécifiquement possible, un ou des antigène(s) de *MAP* sur une coupe histologique.<sup>90</sup> Cette technique dépend donc de la reconnaissance d'épitopes et non pas des propriétés biochimiques comme le ZN.<sup>13</sup> Les anticorps sont marqués par un colorant fluorescent ou une enzyme afin de pouvoir les visualiser.<sup>90</sup> La sensibilité et la spécificité de cette technique dépendent évidemment de l'antisérum (anticorps) utilisé et de la technique.

Chez les bovins, une étude comparant des anticorps polyclonaux produits (chez des lapins) à partir d'administration de *MAP* vivants, de *MAP* tués à la chaleur ou de protéines de la paroi cellulaire de *MAP*, a démontré que les anticorps produits à partir de protéines de la paroi cellulaire produisaient le test immunohistochimique le plus spécifique et sensible.<sup>98</sup> L'IHC compte de nombreux avantages. Elle serait plus sensible que le ZN chez les bovins et les caprins.<sup>13,25</sup> Dans une étude effectuée sur des échantillons bovins (biopsies intestinales et nœuds lymphatiques), le ZN aurait permis de détecter *MAP* dans 8 échantillons sur 16, l'IHC faite à l'aide d'anticorps polyclonaux aurait permis la détection de *MAP* dans 12 échantillons sur 16 et l'IHC à partir d'anticorps monoclonaux aurait permis la détection de *MAP* dans 14 échantillons sur 16.<sup>25</sup> L'IHC serait plus spécifique que le ZN puisqu'elle est basée sur la reconnaissance d'épitope antigénique et non sur des propriétés biochimiques comme le ZN, les bactéries positives au ZN telles *Nocardia*, *Corinebacterium* ou même d'autres mycobactéries telle *Mycobacterium bovis* ont donc moins de chance d'être positives par l'IHC.<sup>13,25</sup> Finalement, l'IHC permet de visualiser l'antigène en même temps que les lésions histologiques et permet de marquer *MAP* même si sa paroi cellulaire est endommagée ou même absente (les antigènes d'une paroi cellulaire digérée par les macrophages pourraient réagir avec les anticorps).<sup>13,25,85,98,105</sup> Parmi les désavantages, notons qu'il s'agit d'une technique plus laborieuse que le ZN, que les antisérums spécifiques à *MAP* ne sont pas largement distribués commercialement et que cette technique peut être négative s'il n'y a qu'un très petit nombre de bactéries dans le tissu examiné.<sup>13,105</sup>

### 4.3 PCR

Comme mentionné plus tôt (voir section 2.1), la séquence d'insertion IS900 est considérée comme étant unique à *MAP*. Cette séquence d'insertion a permis d'élaborer de nombreux tests diagnostiques basés sur la méthode PCR, qui permet de synthétiser et d'amplifier *in vitro* une séquence de nucléotides donnés.<sup>77</sup> En ciblant des oligonucléotides spécifiques à *MAP* au sein de la séquence IS900 on peut détecter

spécifiquement la présence de cette dernière dans une multitude d'échantillons incluant des cultures bactériennes, des fèces, du lait ou des tissus (frais ou formolés).<sup>30,47,66,67,89,111</sup> Un des grands avantages de cette technique par rapport à la culture est sa rapidité, puisque les résultats sont obtenus en environ 3 jours, ce qui est beaucoup plus rapide que la culture bactérienne (bien que ces temps soient similaires à ceux pour faire des lames immunohistochimiques ou colorées par le ZN).<sup>30,104</sup> L'application du PCR directement sur des colonies bactériennes provenant de culture est relativement facile (sensibilité et spécificité de près de 100%) mais l'application de la méthode sur des tissus ou pire sur des échantillons fécaux se révèle plus problématique.<sup>67,84</sup> On note, par exemple, une diminution de sensibilité du PCR due aux nombreuses composantes inhibitrices présentes dans un échantillon de fèces.<sup>30,39,40,51,66,67,84</sup> Plusieurs études ont tenté d'estimer la sensibilité du PCR sur des échantillons fécaux et de la comparer à la culture bactérienne mais les résultats sont souvent très différents d'une étude à l'autre, certaines concluant que la culture est plus sensible que le PCR alors que d'autres semblent démontrer le contraire.<sup>26,47,51,68,70</sup> Des efforts sont faits pour tenter d'augmenter la sensibilité du PCR. On a amélioré la technique proprement dite par le développement de techniques de double PCR (PCR-niché), de PCR avec capture par hybridation et de PCR fluorescent.<sup>39,40,70</sup> Certains ont aussi cherché à développer de meilleures méthodes d'extraction de l'ADN telles que l'utilisation des billes magnétisées couplées à un antisérum (techniques immunomagnétiques) ou la capture d'une séquence d'ADN qui lierait l'ADN bactérien.<sup>67,68,84</sup> Ces nouvelles techniques d'extraction de l'ADN seraient très prometteuses, permettant même de détecter aussi peu que 10 bacilles par 200 mg de fèces.<sup>60</sup> Outre l'inhibition par les constituants de l'échantillon, d'autres facteurs peuvent influencer la sensibilité du PCR. La fixation des tissus dans la formaline cause une fragmentation de l'ADN et la formation de liens entre l'ADN et certaines protéines, ce qui pourrait entraîner l'apparition de résultats faussement négatifs si le temps de fixation est trop grand.<sup>75,119</sup> On recommande de ne pas fixer les tissus plus de 24 heures pour avoir de bons résultats.<sup>89</sup> Le long temps d'entreposage

des tissus enrobés dans la paraffine pourrait également réduire la sensibilité du PCR.<sup>75,119</sup>

De récentes découvertes nous obligent à demeurer prudents sur la spécificité des tests basés sur la séquence *IS900*. En effet, certaines mycobactéries, probablement environnementales, semblent avoir des séquences similaires à la séquence *IS900* et seraient détectables avec certains tests PCR développés pour *MAP*.<sup>32</sup> L'utilisation de séquences d'amorces bien ciblées semblerait cependant éliminer ce problème de faux-positif.<sup>109</sup>

D'autres séquences, moins utilisées car moins spécifiques, tirées de l'ARN ribosomal 16S, de la séquence d'insertion *IS300* ou du gène *hspX*, peuvent également servir à établir un test PCR.<sup>38,66,71,107,116</sup>

#### 4.4 Tests immunologiques

Il existe deux grandes catégories de tests basés sur la réaction immunitaire, les tests sérologiques et les tests évaluant l'immunité à médiation cellulaire. Trois tests sérologiques ont été validés (bovins, ovins, caprins) soit l'immunodiffusion sur gel agar (AGID), la fixation du complément (FC) et l'ELISA.<sup>26,66,67,67</sup> Les principaux avantages de ces tests sont qu'ils sont peu coûteux, rapides et faciles à exécuter.<sup>3</sup> Ces tests servent à détecter la présence d'anticorps en circulation, ils sont donc plus sensibles en phase avancée de la maladie lorsque l'infection est bien établie (souvent avec signes cliniques) et que l'immunité à médiation humorale (Th2) prend le dessus sur l'immunité à médiation cellulaire (Th1).<sup>3,26,84,87,120</sup> Il faut cependant mentionner que ce dernier énoncé, qui fait figure de dogme, semble être remis en question dans certains articles récents qui tendraient à démontrer que les tests sérologiques pourraient détecter les bovins récemment infectés.<sup>61,112</sup> Le plus sensible des trois tests serait l'ELISA, dont la sensibilité varie de 15 à 90% selon qu'il s'agit d'un animal en phase subclinique ou avec des signes cliniques.<sup>26,84,104,120</sup> Ces tests

sont surtout utilisés à l'échelle du troupeau pour déterminer s'il y a infection ou non.<sup>3,67,120</sup> Outre la sensibilité très variable, un autre problème des tests sérologiques est que *MAP* possède de nombreux antigènes en commun avec d'autres mycobactéries présentes dans l'environnement, ce qui peut mener à des résultats faux-positifs.<sup>3,84</sup> Dans le but d'améliorer la spécificité du test ELISA, on pré-absorbe l'échantillon de sérum avec des extraits de *Mycobacterium phlei* afin de retirer les anticorps responsables des réactions croisées.<sup>3,26,37,84</sup>

Afin de détecter les animaux en phase subclinique, des tests visant à évaluer la réponse immunitaire à médiation cellulaire ont été développés. Deux tests sont principalement utilisés, le test intradermique mesurant l'hypersensibilité retardée et un test sur plasma détectant le relâchement d'interféron-gamma par les lymphocytes T sensibilisés mis en contact avec un antigène spécifique.<sup>84,88,120</sup> Le test intradermique utilise soit la johnine ou la protéine purifiée dérivée aviaire.<sup>88</sup> Il s'agit d'un vieux test qui ne semble pas très sensible ou spécifique.<sup>3,73,84</sup> Le test de l'interféron-gamma serait un des seuls tests sanguins pouvant détecter les animaux récemment infectés par *MAP*. Ce test semble cependant également avoir une faible spécificité, qui serait liée à la présence de réaction croisée avec des mycobactéries de l'environnement.<sup>67,84</sup> De plus, ce test est dispendieux et peu pratique pour l'utilisation à grande échelle.<sup>67,84</sup>

# MÉTHODOLOGIE

## 1. Sélection des cas

Des tissus ont été échantillonnés afin de trouver des animaux présentant des lésions de paratuberculose dans le but de comparer trois méthodes diagnostiques; le ZN, l'IHC et le PCR. Au total, 46 moutons adultes ont été inclus dans cette étude. Trente-deux d'entre eux présentaient une entérite granulomateuse suggestive de paratuberculose à l'examen histopathologique. Vingt de ces animaux ont été sélectionnés après l'examen histopathologique de 485 moutons réformés de sources variables (plusieurs troupeaux). Douze cas ont été sélectionnés à partir des archives de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. Enfin, 14 moutons sans évidence histologique d'entérite granulomateuse, sélectionnés au hasard à partir des 485 animaux de réforme, ont été utilisés comme contrôles négatifs.

## 2. Échantillonnage des tissus

Pour les cas sélectionnés à partir des 485 animaux, un segment d'iléon (10 à 15 cm proximale à la valve iléocæcal), la valve iléocæcal et le nœud lymphatique iléocæcal ont été prélevés. Les informations concernant la procédure exacte de prélèvement des 12 cas archivés n'étaient pas disponibles, mais ils contenaient toujours un segment d'iléon.

## 3. Examen histopathologique

Les tissus ont été fixés dans la formaline neutre tamponnée à 10%, traités de façon standard, enrobés dans la paraffine, coupés à 4 µm, et colorés à l'hématoxyline-éosine-safran de même que par la technique ZN (pour la démonstration des bactéries acido-alcool-résistantes). Un système de gradation a été utilisé pour caractériser les

lésions intestinales.<sup>86</sup> Ce système divise les lésions en 3 grandes catégories. Dans la catégorie 1, de petits granulomes sont situés exclusivement dans les régions interfolliculaires des plaques de Peyer. Dans la catégorie 2, de plus gros granulomes sont présents dans les régions interfolliculaires des plaques de Peyer avec quelques petits granulomes dispersés dans le chorion de la muqueuse. Les lésions de la catégorie 3a sont similaires à celles de la catégorie 2, mais les granulomes du chorion sont plus gros, plus nombreux et distendent les villosités. Ces 3 premières catégories ne sont pas associées avec des lésions macroscopiques. Dans la catégorie 3b, il y a une infiltration transmurale, diffuse et sévère de la muqueuse par des macrophages et des cellules géantes multinucléées avec distension, atrophie et fusion des villosités. Les lésions de la catégorie 3c sont similaires à celles de la catégorie 3b, mais les lymphocytes prédominent, les macrophages et les cellules géantes multinucléées étant regroupées en amas parmi les lymphocytes. La présence (1) ou l'absence (0) d'inflammation granulomateuse dans le nœud lymphatique iléocœcal a également été notée. Le nombre d'organismes observés dans le cytoplasme des macrophages et des cellules géantes par la coloration ZN a été gradé 0 (aucune bactérie détectée), 1 (quelques rares bactéries dispersées), 2 (quelques amas de bactéries) ou 3 (nombreuses bactéries). Chaque animal a subi un examen histologique, les lésions ont été gradées et le nombre de bactéries a été évalué à l'aveugle par deux évaluateurs indépendants (JRG, CG).

#### **4. Immunohistochimie**

Une coloration immunohistochimique a été effectuée sur les sections d'iléon et de nœud lymphatique des 46 animaux. Deux sections successives de 4  $\mu\text{m}$  de chaque tissu ont été effectuées. Ces sections ont été montées sur des lames recouvertes de poly-L-lysine, séchées à 37°C (18 h), déparaffinées par immersion de 5 min dans une solution de toluène, déshydratées dans des bains d'alcool de moins en moins concentrés et incubées pendant 5 min à 37°C dans une solution de tampon salin Tris (tris buffer, pH 7,6). Par la suite, les lames ont été prétraitées à la trypsine

0,1% dans la solution de tampon salin Tris (tris buffer, pH 7,6) contenant 0,1% de  $\text{CaCl}_2$  pour 20 min à 37°C puis rincées trois fois pour 5 min dans le tampon salin phosphaté froid (PBS). L'activité endogène de la peroxydase a été bloquée par une incubation de 30 min dans le peroxyde d'hydrogène 3% dilué dans le méthanol suivie de trois rinçages de 5 min dans le PBS. Pour réduire le « bruit de fond », les tissus ont été incubés avec du sérum caprin normal à 5%, à la température de la pièce, pendant 20 min. La moitié des sections (une de chaque paire) a été incubée durant 60 min à la température de la pièce avec un anticorps commercial polyclonal primaire anti-*M. bovis* préparé chez le lapin, dilué à 1:4000. L'autre moitié a été incubée avec du PBS (contrôles négatifs). Les lames ont été rincées 2 fois pendant 5 min dans le PBS, puis incubées à la température de la pièce pendant 45 min avec un anti-sérum secondaire de chèvre biotinylé anti-lapin. À l'aide d'une trousse commerciale, une solution pour complexe peroxydase avidine-biotine (ABC) a été préparée selon les instructions du fabricant et appliquée aux sections durant 45 min. À l'exception de l'incubation avec le sérum normal, toutes les incubations ont été suivies par des rinçages dans le PBS à la température de la pièce dans une chambre humide. L'aminoéthylcarbazole (AEC) a été utilisé comme chromogène puis les sections ont été contre-colorées avec de l'hématoxyline de Mayer. Un contrôle positif était inclus dans chaque expérience. Le nombre d'organismes dans le cytoplasme des macrophages et cellules géantes multinucléées démontré par IHC a été gradé de la même façon qu'avec le ZN.

## 5. PCR

Les sections d'iléon fixées dans la formaline et enrobées dans la paraffine ont été coupées à des épaisseurs de 10  $\mu\text{m}$  (PCR-10) et 60  $\mu\text{m}$  (PCR-60) puis traitées de la façon suivante. La paraffine a tout d'abord été extraite par l'ajout de toluène (2 x 1 ml); après centrifugation à 13 200 g pour 5 min, les granules ont été rincés deux fois dans l'éthanol 100% puis, après séchage, 1 ml de solution de digestion tampon (50 mM Tris-HCL; pH 8,5, 1mM EDTA, 0,5% Tween 20, 20  $\mu\text{g/ml}$  protéinase K) a

été ajouté avant d'incuber la mixture 3 h à 56°C.<sup>33</sup> Après incubation, 500 µl de l'échantillon ont été mélangés avec 500 µl de tampon de dégradation (5 M guanidium thiocyanate, 22 mM EDTA, 0,05 M Tris-HCL, pH 6,4, 0,65% Triton X-100) et incubés à 70°C pour 1 h. Cinquante µl d'une poudre de terre diatomacée 20% ont ensuite été ajoutés et le tout a été incubé 10 min à la température de la pièce. Suite à l'incubation, les échantillons ont été rincés deux fois avec 500 µl de solution tampon (5,5 M guanidium thiocyanate, 0,1 M Tris-HCL; pH 6,4), deux fois dans de l'éthanol 70% et une fois dans l'acétone. Les granules ont ensuite séché à 56°C pendant 15 min et ont été dissoutes dans 75 µl d'eau.<sup>50</sup> L'amplification a été effectuée dans des volumes de réaction de 50 µl contenant 5 µl d'ADN extrait, de la solution tampon pour PCR (10 mM Tris-HCL; pH 9,0, 1,5 mM MgCL<sub>2</sub>, 50 mM KCL), 200 mM dNTP, 25 pmol de chaque amorce et 2,5 U de polymérase d'ADN *Taq*. Les amorces de PCR IS900 L1 (5'- GATCGCCTTGCTCATCGCTGCCG- 3') et IS900R1 (5'- GATCGGAACGTCGGCTGGTCAGG-3') sont tirées de séquences publiées d'ADN de la séquence d'insertion IS900 et flanquent un segment interne d'IS900 de 217-pb (Genbank/EMBL, numéro d'accèsion X16293). Le PCR a été effectué dans un cycleur thermique à ADN Touchgene. Après une dénaturation initiale de 2 min à 94°C, 35 cycles de dénaturation (94°C, 30 sec), fusion des amorces (65°C, 30 sec), et d'extension (72°C, 30 sec) ont été faits. La réaction s'est terminée par une extension de 7 min à 72°C. Les amplicons de 217-pb ont été détectés visuellement sur un gel agar 1% coloré avec du bromure d'éthidium. Chaque échantillon a été fait en double.

## 6. Méthodes statistiques

Tous les résultats des tests ont été rapportés de façon dichotomique comme étant positifs ou négatifs. Pour la présentation des données, la sensibilité relative à l'histopathologie a été calculée pour les cas de toutes catégories confondues et pour chacune des catégories. La spécificité relative à l'histopathologie a été calculée en utilisant des moutons contrôles. Le test statistique Cochran Q pour les variables binaires a été utilisé pour comparer les résultats du ZN, de l'IHC, du PCR-10 et du

PCR-60 simultanément. Tous les cas ont été inclus avec un niveau alpha significatif de 0,05. Des comparaisons pairées ont été effectuées avec le test McNemar exact. La version 8 de SAS a été utilisée pour l'analyse statistique. Aucune statistique n'a été effectuée pour la sensibilité des résultats des grades histologiques et pour la spécificité puisque plusieurs variables ne comportaient pas au moins 1 individu.

## RÉSULTATS

### ARTICLE

Jean-René Galarneau, Josée Harel, Donald Tremblay, Makeda Semret , Marcel Behr,  
Julie Arsenault, Christiane Girard

**Comparison of Ziehl-Neelsen, immunohistochemistry and PCR in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue in the diagnosis of paratuberculosis in sheep**

**Comparison of Ziehl-Neelsen, immunohistochemistry and PCR in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue in the diagnosis of paratuberculosis in sheep**

Jean-René Galarneau<sup>1</sup>, Josée Harel<sup>1</sup>, Donald Tremblay<sup>1</sup>, Makeda Semret<sup>2</sup>, Marcel Behr<sup>2</sup>, Julie Arsenault<sup>1</sup>, Christiane Girard<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

<sup>2</sup> McGill University Health Centre, Montréal, Québec, Canada, H3G 1A4

Correspondance : Jean-René Galarneau, Faculté de médecine vétérinaire, Département de pathologie et microbiologie, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6

## Abstract

The *post-mortem* diagnosis of paratuberculosis in sheep is based on microscopic lesions, demonstration of acid-fast bacteria in lesions and if possible bacterial culture of tissues. Thirty-two sheep with granulomatous enteritis suggestive of paratuberculosis and 14 sheep with no histological evidence of granulomatous enteritis (controls) were used in the study. Using microscopic lesions as the “gold standard” for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*MAP*) infection, Ziehl-Neelsen stain (ZN), immunohistochemistry (IHC) using a commercial anti-*Mycobacterium bovis* antiserum and PCR for the *IS900* sequence were used on formalin-fixed paraffin-embedded tissue and their sensitivity and specificity were estimated and compared. The sensitivity of the ZN, IHC and PCR done on 60 µm thick sections were 59%, 56% and 63%, respectively (differences were not statistically significant). The sensitivity of the PCR done on 10 µm thick sections was lower (statistically significant) for the detection of *MAP* infection when compared to ZN ( $P=0.008$ ), IHC ( $P=0.02$ ) and PCR done on 60 µm thick sections ( $P=0.004$ ). In cases with paucibacillary lesions, ZN and IHC showed similar sensitivity being positive in 42% of cases. PCR done on 60 µm thick sections was slightly more sensitive detecting 58% of animals with paratuberculosis lesions but the difference was not statistically significant.

## Introduction

Paratuberculosis (Johne's disease) is a chronic enteritis of domestic and wild ruminants caused by the acid-fast bacteria *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*MAP*).<sup>8</sup> In sheep the infection causes chronic weight loss, hypoproteinemia, subcutaneous oedema, poor fleece quality and sometime diarrhea.<sup>6,8,32</sup> The *post-mortem* diagnosis of paratuberculosis in sheep is based on microscopic lesions, demonstration of acid-fast bacteria in lesions, and when possible, bacterial culture of tissues.<sup>9</sup> Although bacterial culture is often considered the "gold standard" for diagnosis of paratuberculosis, growth of *MAP* on mycobacterial media is slow, generally taking more than 6-8 weeks and growth of *MAP* is strictly dependent on the supplementation of culture medium with an exogenous factor, Mycobactin J.<sup>4,6,8,19,28,29,32,37</sup> In addition, sheep strains are reputedly even more difficult to cultivate than other strains.<sup>4,6,8,19,28,29,32,37</sup> Histologically in the first stage of the experimental infection in sheep and goats very few or no organism can be demonstrated by acid-fast staining but their number increases progressively with time.<sup>3,8,31</sup> In the late stage of the disease two types of lesion can be identified, depending on the intensity and the type of immune response produced by the host. The "multibacillary" or "lepromatous" lesions are those in which numerous bacteria can be seen in opposition to the "paucibacillary" or "tuberculoid" lesions in which very few bacteria, if any, can be demonstrated.<sup>9,27</sup> Polymerase chain reaction (PCR) assays targeting *MAP*-unique IS900 sequence have been used on formalin-fixed and paraffin-embedded tissues of cattle, deer, elk, goat, kudu and sheep to detect the presence of *MAP* DNA.<sup>24,30,38</sup> Immunohistochemistry (IHC) using different anti-*Mycobacterium* antibodies has been used with success for diagnosis of bovine paratuberculosis and showed a similar or greater sensitivity than acid-fast staining but has rarely been used in sheep.<sup>5,11,23,27</sup> Immunohistochemistry was reported as being more sensitive than Ziehl-Neelsen (ZN) stain for detection of *MAP* in goats and sheep with paratuberculosis.<sup>25,27,33</sup> Pathologists working in diagnostic laboratories are often uncertain about the technique to be used to confirm

the presence of *MAP* in lesions suggestive of paratuberculosis. In this study, we compared three diagnostic methods to confirm *MAP* infection, which used products accessible to any diagnostic laboratory. Using microscopic lesions as “gold standard” of *MAP* infection, ZN stain, IHC using a commercial anti-*M. bovis* antiserum and PCR for IS900 sequence were performed on formalin-fixed paraffin-embedded tissue obtained from sheep, with the goal of comparing the sensibility and specificity of these assays in the diagnosis of sheep paratuberculosis.

## Materials and methods

*Animals.* A total of 46 adult sheep were included in this study. Thirty-two of them had a granulomatous enteritis suggestive of paratuberculosis on histopathological examination. Twenty animals were selected after histopathological examination of 485 culled sheep originating from various herds. Twelve cases were selected from the archives of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal. In addition, 14 sheep with no histological evidence of granulomatous enteritis were randomly selected from the 485 culled animals as negative controls.

*Sampling of tissues.* For cases selected from the 485 culled animals, a segment of ileum (10 to 15 cm proximal to the ileocaecal valve), the ileocaecal valve and the ileocaecal lymph node were collected and fixed in 10% neutral-buffered formalin. Information concerning the exact sampling procedure of the 12 archived cases was not available but they always included a segment of ileum.

*Histopathological examination.* Tissues were fixed in 10% neutral-buffered formalin, routinely processed, embedded in paraffin, sectioned at 4  $\mu\text{m}$ , and stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES) and with ZN for demonstration of acid-fast bacteria.

A grading system was used to categorize intestinal lesions.<sup>27</sup> This system divides lesions in 3 broad categories. In category 1, small granulomas are located exclusively in the interfollicular area of the Peyer's patches. In category 2, larger granulomas are present in the interfollicular area of the Peyer's patches with some small scattered granulomas in the lamina propria of the mucosa. Lesions in subcategory 3a closely resemble category 2 but granulomas in the lamina propria are larger, more numerous and expend the villi. In subcategory 3b, there is a severe and diffuse infiltration of the mucosa by macrophages and giant cells with fewer lymphocytes which often extend to the whole intestinal wall. There is expansion, blunting and fusion of mucosal villi. In subcategory 3c, the lesions are similar to those of category 3b but lymphocytes largely predominate with multifocal aggregates of macrophages and giant cells. Lesions of categories 1, 2 and 3a are not associated with gross lesion. The presence

(1) or absence (0) of granulomatous inflammation in the ileocaecal lymph node was also noted. The number of acid-fast bacilli in the cytoplasm of macrophages and giant cells revealed by ZN in the intestines and lymph nodes was graded as 0 (no bacteria detected), 1 (rare scattered bacteria), 2 (some clusters of bacteria) and 3 (numerous bacteria). Each animal was histologically examined, graded for lesions and the number of bacteria was blindly evaluated by two independent observers (JRG, CG).

*Immunohistochemistry.* Immunohistochemical staining was performed on the ileum and the ileocaecal lymph node of the 46 animals. Two serial sections of each tissue were cut at 4 µm, mounted on poly-L-lysine-coated glass slides, dried at 37 C for 18 h, deparaffinized by a 5 min immersion in toluene, dehydrated through graded alcohol baths and incubated 5 min at 37 C in Tris buffer (pH 7,6). This was followed by pre-treatment with 0,1% trypsin in Tris buffer (pH 7,6) with 0,1% CaCl<sub>2</sub> for 20 min at 37 C and three 5 min rinses in cold phosphate-buffered saline (PBS). Endogenous peroxidase was blocked by 30 min incubation in 3% hydrogen peroxide diluted in methanol followed by three 5-min PBS rinses. Non-specific staining of tissue sections was blocked using 5% normal goat serum with incubation at room temperature for 20 min. Half of the sections (one of each pair) were then incubated 60 min at room temperature with commercial polyclonal primary anti-*Mycobacterium bovis*<sup>a</sup> antibody diluted at 1:4000 and the other half was incubated with PBS (negative controls). Slides were rinsed 2 times for 5 min in PBS, and then incubated at room temperature for 45 min with biotinylated goat anti-rabbit secondary anti-serum. An avidin-biotin peroxidase complex (ABC) commercial kit<sup>b</sup> prepared as specified by the manufacturer was applied to the sections for 45 min. Except for the incubation with normal serum, all incubations were followed by washes in PBS and were done at room temperature in a moist chamber. Aminoethylcarbazole<sup>c</sup> (AEC) was used as chromagen and sections were counterstained with Mayer's hematoxylin. A positive control was included in each experiment. The number of organisms in the cytoplasm of macrophages and giant cells revealed by IHC was graded as already mentioned for ZN.

*PCR:* Formalin-fixed, paraffin-embedded ileal tissue cut into 10  $\mu\text{m}$  (PCR-10) and 60  $\mu\text{m}$  (PCR-60) thick sections was processed in following manner. Paraffin was first extracted by the addition of toluene (2 x 1 ml); after centrifugation at 13200 g for 5 min, the pellet was washed twice with 100% ethanol and, after drying, 1 ml digestion buffer (50 mM Tris-HCl; pH 8,5, 1 mM EDTA, 0,5% Tween 20, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  proteinase K) was added before the mixture was incubated for 3 h at 56 C.<sup>34</sup> After incubation, 500  $\mu\text{l}$  of the samples were mixed with 500  $\mu\text{l}$  of lysis buffer (5 M guanidium thiocyanate, 22 mM EDTA, 0,05 M Tris – HCl; pH 6,4, 0,65% Triton X-100) and incubated at 70 C for 1 h. A volume of 50  $\mu\text{l}$  of 20% diatomaceous earth powder was then added and incubated for 10 min at room temperature. Following incubation, the samples were washed twice with 500  $\mu\text{l}$  washing buffer (5,5 M guanidium thiocyanate, 0,1 M Tris-HCl; pH 6,4), twice in 70% ethanol and once in acetone. The pellet was then dried at 56 C for 15 min and dissolved in 75  $\mu\text{l}$  of water.<sup>20</sup>

Amplification was performed in 50  $\mu\text{l}$  reaction volumes containing 5  $\mu\text{l}$  of the DNA extraction, PCR buffer (10 mM Tris-HCl; pH 9,0, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM KCl), 200  $\mu\text{M}$  each dNTP, 25 pmol of each primers and 2,5 U *Taq* DNA polymerase<sup>d</sup>. PCR primers IS900L1 (5'- GATCGCCTTGCTCATCGCTGCCG- 3') and IS900R1 (5'- GATCGGAACGTCGGCTGGTCAGG-3') were derived from the published DNA sequence of IS900 and flank a 217-bp internal segment of IS900 (Genbank/EMBL accession number X16293).<sup>18</sup> PCR was performed on a Touchgene gradient DNA thermal cycler<sup>e</sup>. After an initial denaturation of 2 min at 94 C, 35 cycles of denaturation (94 C, 30 sec), primer annealing (65 C, 30 sec), and extension (72 C, 30 sec) were done and the reaction was terminated by a final extension of 7 min at 72 C. Amplicons of 217 bp were detected by visualization on 1% agarose gels stained with ethidium bromide. Each sample was made in duplicate.

*Statistical methods.* All test results were dichotomized as positive or negative. To present data, sensitivity relative to histopathology was estimated for cases of any histological grade and for those of each grade. Specificity relative to histopathology was calculated using control sheep. The Cochran Q test statistic for binary related

variables was used to compare results of ZN, IHC, PCR on 10  $\mu\text{m}$  and PCR on 60  $\mu\text{m}$  thick sections techniques simultaneously. All cases were included, and an alpha level of 0,05 was set as the level of significance. Pair wise comparisons were done using the McNemar exact test. SAS version 8 was used for statistical analysis. No statistics were computed for sensitivity results by histological grade and for specificity since many variables had less than 2 nonmissing levels.

## RESULTS

*Histopathology, Ziehl-Neelsen and immunohistochemistry.* Results of histopathological evaluation, ZN staining and IHC are shown in table 1. Microscopic intestinal lesions varied from small and discrete granulomatous foci in Peyer's patches to severe diffuse transmural granulomatous enteritis. The majority of cases were categorized as 3b and 3c, representing 78% of the suspected cases of paratuberculosis (table 2). The 3b category had the higher number of cases with 41% of suspected sheep. Granulomatous inflammation was present in the lymph nodes of 66% of the sheep with suspected paratuberculosis. Lymph nodes from animals with ileal lesions categorized as 3b and 3c were frequently involved (19/23 animals).

Using IHC with anti-*Mycobacteriu bovis* antiserum, macrophages in areas of granulomatous enteritis showed multiple dark and prominent punctate staining interpreted as mycobacterial antigen and a light diffuse staining in the cytoplasm. In each of the 3b grade intestinal lesions, acid fast bacteria and *MAP* antigen were successfully demonstrated. Five out of 12 (42%) intestinal lesions classified as 3c had some clusters or numerous bacteria demonstrated by ZN and were also positive for the presence of mycobacterial antigen by IHC. In categories 1, 2 and 3a only one sheep with grade 2 lesions had acid fast bacteria demonstrated by the ZN but was negative by IHC.

*Sensitivity and specificity of MAP PCR.* Using the DNA extraction and PCR methods outlined above, we were able to detect at least 10 picomoles of DNA, as seen by the consistent presence of the expected 217 bp band.

*Detection of MAP by PCR in intestinal tissues.* Results of PCR are shown in table 1 and their relation to intestinal histological grading shown in table 2. When PCR was done on 10 µm section (PCR-10), 34% of all paratuberculosis cases were positive for the presence of *MAP* DNA. More specifically, lesions graded as 3b were positive in 11/13 (85%) of cases, while those in the 1, 2, 3a or 3c were all negative. When PCR was performed on thicker 60 µm sections (PCR-60), two additional 3b cases (13/13) and 7 cases classified as 3c (7/12) were detected. PCR was positive (PCR-10 and

PCR-60) in one control case that showed no histopathologic changes and was negative with ZN and IHC.

*Statistical analysis results.* The overall sensitivity and specificity of diagnostic techniques used in this study relative to histopathology are shown in Table 3. There was a significant difference between diagnostic methods (Cochran  $Q=20$  3df,  $P<0,001$ ). Pair wise comparisons showed that the PCR-10 significantly detected a lower number of cases compared to ZN ( $P=0,008$ ), IHC ( $P=0,0156$ ) and PCR-60 ( $P=0,004$ ). Other pair wise comparisons were not statistically significant (all  $P\geq 0,05$ ).

## Discussion

The purpose of this study was to examine and compare the sensitivity and specificity of three *post-mortem* diagnostic methods of sheep paratuberculosis: ZN staining for acid-fast bacteria, IHC using commercially available anti-*Mycobacterium bovis* antibody and PCR for the IS900 sequence of *MAP*.

When comparing diagnostic tests the ideal situation is to definitively establish the health status of an animal with respect to the disease in question with a gold standard test. The difficulty with paratuberculosis in sheep is that this kind of true gold standard test does not exist. Numerous researchers think that bacterial culture of feces or tissue should be the gold standard to compare diagnostic methods for paratuberculosis due to its high specificity (100%), but this diagnostic method has drawbacks.<sup>1,26</sup> One of the major drawbacks is the poor sensitivity of bacterial culture. It is estimated that sensitivity of bacterial culture on bovine feces range from 35 to 50%, sheep strain of *MAP* being even harder to culture.<sup>1,4,22,26</sup> When dealing with *post-mortem* material in sheep, histologic examination is highly sensitive, sometimes more than bacterial culture. In a study in which lambs were experimentally infected with *MAP*, 100%, 30% and 15% of infected lambs were detected by histological examination, bacterial culture on tissues or bacterial culture on feces, respectively.<sup>21</sup> In another study, histological examination has been reported as being a highly sensitive diagnostic procedure in sheep with clinical signs of paratuberculosis even when bacteria were very few (paucibacillary type of lesion), showing a sensitivity of 100% and 93% in the ileum and mesenteric lymph node, respectively.<sup>9</sup> In subclinical paratuberculosis in goats and sheep, histopathologic examination produced evidence of infection in more animals than bacteriologic culture (in sheep, histological examination detected 49,4% of infected animals, bacterial culture on mesenteric lymph node and ileum detected 38% of infected animals).<sup>27,31</sup> We, as others before us, decided to use histological examination

as our gold standard.<sup>10,29</sup> This diagnostic method allow us to use archived (fixed) cases, which could not have been done with bacterial culture.

To increase the number of animals with paratuberculosis lesion, animals included in this study were from two different sources; reformed animals and archived tissues from the faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal (presented at necropsy for various causes). Grouping together these animals was not considered to represent a problem since the ultimate goal of this study was to compare diagnostic methods and not to establish the incidence of paratuberculosis in a given group.

The study of paratuberculosis in cattle and sheep has shown that there is a wide range of severity and aspect of intestinal lesions depending on numerous factors such as the age of the subject at infection, the degree of the cellular immunity of the host and possibly also the virulence of the *MAP* strain.<sup>7,8,27,29</sup> Intestinal lesions classified as grade 1, 2 and 3a were generally negative by all 3 methods (bacteria was shown by ZN in only one animal). This is not surprising as these lesions are thought to occur early in the course of infection, while the animal is not clinically ill and possibly reflect a strong cellular immunity limiting the proliferation of *MAP*.<sup>7,8,27,29</sup> Tissues classified as 3b represent the classical paratuberculosis lesions. As expected, the 3 methods were positive in all of these cases. These lesions are histologically characterized by a diffuse severe granulomatous infiltration of the lamina propria of the mucosa with lesser involvement of the wall of the intestine, the mesenteric lymphatic vessels and mesenteric lymph nodes. These lesions were named "multibacillary" in view of the great number of acid-fast bacteria when stained by ZN.<sup>8,27</sup> The pathogenesis of these lesions is related with a loss of cellular immunity and a rise of an ineffective humoral immunity, which can explain the massive proliferation of *MAP*.<sup>27,29</sup> This is reflected by the scant lymphocytic infiltrate leading to better survival of the bacteria in macrophage.<sup>13</sup> Animals with grade 3c intestinal lesions are believed to be in a state of partial resistance to the infection, with a

relatively strong cell-mediated immunity; this is reflected by a diffuse infiltration of the lamina propria by numerous lymphocytes with scattered granulomatous foci.<sup>29</sup> These lesions are also called “paucibacillary” because generally few to no bacteria are demonstrated by acid-fast staining.<sup>9,27</sup> For this category, in this study, ZN and IHC showed similar sensitivities being positive in 42% of the cases. In general, fewer bacteria were detected in the ileocaecal lymph node comparatively to the ileum with those 2 methods. PCR-60 detected 58% of animals with grade 3c paratuberculosis lesions, however the difference was not statistically significant between these 3 diagnostic methods.

There was a marked increase in sensitivity when the PCR was done on 60 µm sections comparatively to PCR done on 10 µm sections. This increase in sensitivity can be explained by the increase in the number of bacteria in the 60µm sections. Attempts to demonstrate mycobacterial sequences from tissues without detectable acid-fast organisms are reported to be rarely successful.<sup>9,24</sup> The PCR amplifies nucleotide sequences from the IS900 sequence unique to *MAP*, which is found in 15-20 copies in every *MAP* cell.<sup>14,36</sup> This would have a significant impact in cases classified as 3c, where numbers of bacteria are generally low and lesions segmental. It is possible that doing PCR on fresh tissues would further increase the sensitivity on type 3c lesions, as degradation of DNA may occur during the processes of fixation and paraffin embedding.<sup>24</sup>

In a similar retrospective study done on paraffin-embedded tissues of cattle with paratuberculosis, *MAP* was detected in 90% of tissues by PCR, while ZN was positive in 86% and IHC was positive in 100%.<sup>23</sup> These rates were comparable to those found in our study, particularly for the cases classified as 3b. To our knowledge, there are no other published reports comparing the sensitivities of these various diagnostic tests on more challenging 3c cases in sheep.

In terms of specificity, the ZN is the least specific of the three methods used. The ZN method relies on the ability of carbol fuchsin to bind to the interior of the cell membrane and to be retained by the cell wall.<sup>2</sup> Positive staining can be demonstrated in the presence of *Mycobacterium* as well as other bacteria like *Nocardia* and occasionally *Corynebacterium*.<sup>5,33</sup> Vegetal material can produce a focal granulomatous inflammation in the lamina propria and can be stained by ZN although a thorough histological examination will identify the vegetal material.<sup>5,31</sup> Even using polyclonal anti-*Mycobacterium bovis* antibody which can not differentiate between *MAP* and other mycobacteria, the IHC is considered more specific than the ZN.<sup>5,31</sup> A previous study done on bovine cases of paratuberculosis has shown that the commercially available antibodies used in the present study did not stain vegetal material and recognized surface antigens of *Mycobacterium* spp, making it a more specific for this species of bacteria than the ZN staining which relies on biochemical properties.<sup>5</sup> However, a study using commercial polyclonal antibodies to antigens of *MAP* showed that false-positive results could occur with some Gram-positive bacteria and fungi.<sup>17</sup> Immunohistochemistry is also more expensive and more time-consuming than the ZN. The PCR is the more specific of the three methods because it is using the IS900 sequence which is to this day *MAP*-unique, although it is now known that some rare mycobacteria of environmental origin can possess an IS900-like sequence.<sup>12,15,16,35</sup> The only way to differentiate those mycobacteria would be to sequence the amplicon, which was not done in the study. Disadvantages of this technique remain its cost, the fact that it is not widely available and the possibility of false positive results.

One control (negative control) animal was positive when PCR was done either on 10 or 60  $\mu\text{m}$  thick sections of ileum. The causes of this positive result remain uncertain. One possible explanation is that this animal was truly infected by *MAP* without detected histopathologic lesion. This possibility is slim but real since the gold standard used is not 100% sensible and sanitary status of paratuberculosis in the herds of these animals is not known. Another possibility is contamination of the sample at sampling or during PCR manipulation, which seems improbable in view of the constant result.

In conclusion, although the advantage of IHC, in terms of demonstration of mycobacteria in the lesions suggestive of paratuberculosis or in specificity for *MAP*, was not confirmed, ZN, IHC and PCR done on 60  $\mu\text{m}$  thick sections are valid methods of confirming the presence of mycobacteria in lesions suggestive of paratuberculosis in sheep, particularly in those classified as 3c.

## Sources and manufacturers

- a. Dako corp., Carpinteria, CA.
- b. Vector laboratories, Burlingame, CA.
- c. Vector laboratories, Burlingame, CA.
- d. Amersham Biosciences, Piscataway, NJ.
- e. Techne, Princeton, NJ.

## References

1. Bakker D, Wilemsen PTJ, Van Zijderveld FG: 2000, Paratuberculosis recognized as a problem at last: a review. *Vet Q* 22: 200-204.
2. Barksdale L. Kim KS: 1977, *Mycobacterium*. *Bacteriol Rev* 41: 217-372.
3. Begara-McGorum I, Wildblood LA, Clarke CJ, et al: 1998, Early immunopathological events in experimental ovine paratuberculosis. *Vet Immunol Immunopath* 63: 265-287.
4. Benazzi S, elHamidi M, Schliesser T: 1996, Paratuberculosis in sheep flocks in Morocco: a serological, microscopical and culture survey, *J Vet Med B* 43: 213-219.
5. Brees DJ, Reimer SB, Cheville NF, et al: 2000, Immunohistochemical detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine tissue sections. *J Vet Diag Invest* 12: 60-63.
6. Carrigan MJ, Seaman JT: 1990, The pathology of Johne's disease in sheep. *Aust Vet J* 67: 47-50.
7. Chiodini RJ, van Kruiningen HJ, Merkal RS: 1984, Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet* 74: 218-262.
8. Clarke CJ: 1997, The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J Comp Pathol* 116: 217-261.

9. Clarke CJ, Little D: 1996, The pathology of ovine paratuberculosis - gross and histological changes in the intestine and other tissues. *J Comp Pathol* 114: 419-437.
10. Clarke CJ, Patterson AP, Armstrong KE, Low JC : 1996, Comparison of the absorbed ELISA and agar gel immunodiffusion test with clinicopathological findings in ovine clinical paratuberculosis, *Veterinary record* 139: 618-621.
11. Coestsier C, Havaux X, Mattelard F et al: 1998, Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected tissues by new species-specific immunohistological procedures. *Clin Diag Immunol* 5: 445-451.
12. Cousins DV, Whittington R, Marsh I, et al.: 1999, Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable by IS900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis. *Mol Cell Probes* 13: 431-442.
13. Coussins PM: 2001, *Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system. *Anim Health Res Rev* 2: 141-161.
14. Ellingson JL, Bolin CA, Stabel JR: 1998, Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis. *Mol Cell Probes* 12: 133-142.
15. Englund S, Ballagi-Pordany A, Bolske G, et al: 1999, Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 33: 163-171.

16. Englund S, Bolske G, Johansson KE: 2002, An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium spp.* other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. FEMS Microbiol Lett 209: 267-271.
17. Geisel O, Netter F, Hermanns W: 1994, Specificity of the immunohistochemical demonstration of mycobacterial antigens. Zentralbl Veterinarmed B 41: 548-553.
18. Green EP, Tizard ML, Moss Mt, et al: 1989, Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. Nucleic Acids Res 17: 9063-9073.
19. Gwozdz JM, Reichel MP, Murray A, et al: 1997, Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine tissues and blood by the polymerase chain reaction. Vet Microbiol 57: 233-244.
20. Harel J, Forget C: 1995, DNA probe and polymerase chain reaction procedure for the specific detection of *Serpulina hyodysenteriae*. Mol Cell Probes 9: 111-119.
21. Kurade NP, Tripathi BN, Rajukumar K, Parihar NS :2004, Sequential development of histologic lesions and their relationship with bacterial isolation, fecal shedding, and immune responses during progressive stages of experimental infection of lambs with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Vet Pathol 41: 378-387.
22. Manning EJB, Collins MT: 2001, *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis Rev. Sci. Tech. Int. Epiz. 20:133-150.

23. Massone AR, Martin AA, Ibargoyen GS, Gimeno EJ: 1990, Immunohistochemical methods for the visualization of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine tissues. *Zentralbl Veterinarmed B* 37: 251-253.
24. Miller JM, Jenny AL, Payeur JB: 2002, Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium avium* organisms in formalin-fixed tissues from culture-negative ruminants. *Vet Microbiol* 87: 15-23.
25. Navarro JA, Bernabe A, Gomez MA, et al: 1991, Mycobacterial antigen detection by immunohistochemistry in goat paratuberculosis. *Zentralbl Veterinarmed B* 38: 231-237.
26. Olsen I, Sigurdardottir OG, Djonne B: 2002, Paratuberculosis with special reference to cattle, a review, *Vet Q* 24: 12-28.
27. Perez V, Marin JFG, Badiola JJ: 1996, Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J Comp Pathol* 114: 107-122.
28. Perez V, Tellechea J, Badiola JJ, et al: 1997, Relation between serologic response and pathologic findings in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am J Vet Res* 58: 799-803.
29. Perez V, Tellechea J, Corpa JM, et al: 1999, Relation between pathologic findings and cellular immune responses in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am J Vet Res* 60: 123-127.

30. Plante Y, Remenda BW, Chelack BJ, Haines DM: 1996, Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by the polymerase chain reaction. *Can J Vet Res* 60: 115-120.
31. Sigurdardottir OG, Press CMcL, Saxegaard F, Evensen O: 1999, Bacterial isolation, immunologic response, and histopathological lesions during the early subclinical phase of experimental infection of goat kids with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Pathol* 36: 542-550.
32. Stehman SM: 1996, Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract* 12: 441-455.
33. Thorensen OF, Falk K, Evensen O: 1994, Comparison of immunohistochemistry, acid-fast staining, and cultivation for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. *J Vet Diagn Invest* 6: 195-199.
34. Turner PC, Bailey AS, Cooper RJ, Morris DJ: 1993, The polymerase chain reaction for detecting adenovirus DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue obtained *post mortem*. *J Infect* 27: 43-46.
35. Vary PH, Andersen PR, Green E, et al: 1990, Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *J Clin Microb* 28: 933-937
36. Whittington R, Marsh I, Choy E, Cousins D: 1998, Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species. *Mol Cell Probes* 12: 349-358.

37. Whittington RJ, Marsh I, McAllister S, et al: 1999, Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *J Clin Microbiol* 37: 1077-1083
  
38. Whittington RJ, Reddacliff L, Marsh I, Saunders V: 1999, Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded intestinal tissue by IS900 polymerase chain reaction. *Austr Vet J* 77: 392-397.

**Table 3** Grading of ileum and ileocaecal lymph node lesions and results of Ziehl-Neelsen, *M. bovis* immunohistochemistry and IS 900 PCR on 10 µm and 60 µm ileum sections in sheep suspected of paratuberculosis

Case	Grading		ZN		IHC		PCR-10	PCR-60
	Ileum	L. N.	Ileum	L. N.	Ileum.	L. N.	Ileum	Ileum
1	1	0	0	0	0	0	-	-
2	1	0	0	0	0	0	-	-
3	1	0	0	0	0	0	-	-
4	2	1	0	0	0	0	-	-
5	2	0	2	0	0	0	-	-
6	2	0	0	0	0	0	-	-
7	3a	0	0	0	0	0	-	-
8	3b	1	3	2	3	2	+	+
9	3b	1	3	0	3	1	+	+
10	3b	1	3	1	3	2	-	+
11	3b	0	3	0	3	0	+	+
12	3b	NA *	3	NA *	3	NA *	+	+
13	3b	1	3	1	3	1	+	+
14	3b	1	3	3	3	3	+	+
15	3b	1	3	2	3	2	+	+
16	3b	1	3	1	3	0	+	+
17	3b	1	3	2	3	2	+	+
18	3b	1	3	1	2	0	-	+
19	3b	1	3	1	3	0	+	+
20	3b	1	3	2	3	2	+	+
21	3c	1	0	0	0	0	-	+

Case	Grading		ZN		IHC		PCR-10	PCR-60
	Ileum	L. N.	Ileum	L. N.	Ileum.	L. N.	Ileum	Ileum
22	3c	1	0	0	0	0	-	-
23	3c	1	0	0	0	0	-	-
24	3c	1	0	0	0	0	-	-
25	3c	1	2	1	2	0	-	+
26	3c	1	0	0	0	0	-	-
27	3c	0	0	0	0	0	-	-
28	3c	0	2	0	2	0	-	+
29	3c	0	3	0	3	0	-	+
30	3c	1	2	1	2	1	-	+
31	3c	NA *	2	NA *	2	NA *	-	+
32	3c	1	0	0	0	0	-	+
CTR 1	0	0	0	0	0	0	-	-
CTR 2	0	0	0	0	0	0	-	-
CTR 3	0	0	0	0	0	0	-	-
CTR 4	0	0	0	0	0	0	-	-
CTR 5	0	0	0	0	0	0	-	-
CTR 6	0	0	0	0	0	0	-	-
CTR 7	0	0	0	0	0	0	-	-
CTR 8	0	0	0	0	0	0	-	-
CTR 9	0	0	0	0	0	0	-	-
CTR10	0	0	0	0	0	0	-	-
CTR11	0	0	0	0	0	0	-	-
CTR12	0	0	0	0	0	0	-	-
CTR13	0	0	0	0	0	0	-	-
CTR14	0	0	0	0	0	0	+	+

\* : Non available

CTR : Control

**Table 4.** Number of positive results for the Ziehl-Neelsen, immunohistochemistry and PCR in ileum and ileocaecal lymph node, in relation with histological grade of intestinal lesions

	Histological grading of intestinal lesions				
	1	2	3a	3b	3c
Histopathology of ileum (n=32)	3	3	1	13	12
Histopathology of lymph node (n=30)	0	1	0	11*	8*
ZN on ileum	0	1	0	13	5
ZN on lymph node	0	0	0	13	5
IHC on ileum	0	0	0	13	5
IHC on lymph node	0	0	0	8*	1*
PCR on ileum (10 $\mu$ m)**	0	0	0	11	0
PCR on ileum (60 $\mu$ m)**	0	0	0	13	7

\* One subject with no available lymph node

\*\* One control animal was also positive

**Table 5.** Sensitivity (%) and specificity (%) relative to histopathology for each technique in regard to histological grade of ileal lesions

	Sensitivity						Specificity
	All cases	1	2	3a	3b	3c	No lesion
	(n=32)	(n=3)	(n=3)	(n=1)	(n=13)	(n=12)	(n=14)
ZN	59 <sup>a</sup>	0	33	0	100	42	100
IHC	56 <sup>a</sup>	0	0	0	100	42	100
PCR-10	34 <sup>b</sup>	0	0	0	85	0	93
PCR-60	63 <sup>a</sup>	0	0	0	100	58	93

<sup>ab</sup> McNemar Exact test,  $p < 0.05$

## **Acknowledgements**

This work was financed by “Le fonds du Centenaire”, the Ministère de l’Agriculture, des Pêcheries et de l’Alimentation du Québec, the Société des éleveurs de moutons Pur-Sang du Québec, the Fédération des producteurs de moutons et d’agneaux du Québec, and the Centre d’expertise en production ovine du Québec.

## DISCUSSION

Le but de cette étude était d'examiner et de comparer la sensibilité et la spécificité de trois méthodes diagnostiques *post-mortem* de la paratuberculose ovine facilement disponibles pour un laboratoire diagnostique moyen : la coloration ZN classique pour les bactéries acido-alcool-résistantes, l'IHC utilisant des anticorps commerciaux anti-*Mycobacterium bovis* disponibles commercialement et le PCR utilisant la séquence d'insertion IS900. Enfin, nous avons comparé la sensibilité et la spécificité des ces techniques selon les différents grades de lésions histologiques.

Lorsque l'on veut comparer des méthodes diagnostiques, la situation idéale est d'avoir un test qui permet d'établir de façon définitive le statut des animaux inclus dans l'étude en relation avec la maladie investiguée, c'est ce que l'on appelle un étalon de référence. Un problème avec la paratuberculose chez le mouton est qu'un tel étalon de référence n'existe pas. Plusieurs chercheurs croient que la culture bactérienne sur des fèces ou des tissus, de part sa grande spécificité (100%), devrait être l'étalon de référence.<sup>3,84,85,89</sup> La culture bactérienne présente cependant plusieurs problèmes tels le temps requis (un minimum de 6 semaines) ainsi que sa faible sensibilité.<sup>3,52,84,89,98</sup> On estime que la sensibilité de la culture bactérienne à partir de fèces bovine varie de 35 à 50%, les souches ovines de *MAP* étant encore plus difficiles à cultiver.<sup>3,10,67,84</sup> Lorsque l'on utilise des échantillons prélevés en *post-mortem* chez des moutons, l'examen histologique est très sensible, voir plus sensible que la culture bactérienne. Dans une étude où la paratuberculose était induite expérimentalement chez des agneaux, l'examen histologique a détecté 100% des animaux infectés, la culture bactérienne à partir de tissus 30% et la culture bactérienne à partir de fèces 15%.<sup>63</sup> Dans une autre étude, l'examen histologique a été décrit comme étant une méthode diagnostique très sensible chez les moutons présentant des signes cliniques de paratuberculose, même lorsque très peu de bactéries pouvaient être démontrées (lésions de type paucibacillaire).<sup>23</sup> Dans cette

étude l'examen histologique a démontré une sensibilité de 100% lorsque des échantillons d'iléon étaient examinés et de 93% lorsqu'il s'agissait des nœuds lymphatiques mésentériques.<sup>23</sup> Lors de paratuberculose subclinique chez le mouton et la chèvre, l'examen histopathologique démontre plus fréquemment la présence d'une infection que la culture bactérienne (chez les moutons l'examen histologique a permis de détecter 49,4% des animaux infectés alors que la culture bactérienne à partir d'iléon ou de nœud lymphatique mésentérique a permis d'en détecter 38%).<sup>86,96</sup> Nous avons décidé d'utiliser les lésions histopathologiques comme étalon de référence d'une infection par *MAP*. En effet, comme d'autres auteurs, nous croyons que les lésions histopathologiques sont une bonne alternative à la culture bactérienne comme étalon, particulièrement chez les ovins.<sup>24,48,63,86,88,96,99</sup> De plus, cette méthode diagnostique nous permet d'utiliser des échantillons archivés (fixés dans la formaline) ce qui n'aurait pu être fait avec la culture bactérienne.

Pour augmenter le nombre d'animaux avec des lésions de paratuberculose, l'échantillonnage a été effectué à partir de deux sources; des animaux réformés ainsi que des animaux provenant des archives de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal (présentés à la salle de nécropsie pour des raisons variées). Le regroupement d'animaux provenant de deux sources différentes n'a pas été considéré comme étant une source de biais puisque le but ultime de cette étude était de comparer la sensibilité et la spécificité de méthodes diagnostiques et non pas d'établir l'incidence de la paratuberculose dans un groupe donné.

L'étude de la paratuberculose bovine et ovine a démontré qu'il existe un grand spectre d'aspect et de sévérité des lésions intestinales qui dépendent de nombreux facteurs comme l'âge du sujet lors de l'infection, la force de l'immunité à médiation cellulaire de l'hôte et possiblement la virulence de la souche de *MAP*.<sup>21,22,64,86,88</sup> Les trois méthodes diagnostiques ont donné des résultats négatifs lorsque appliquées aux lésions de grade 1, 2 ou 3a sauf chez un animal avec des lésions de grade 2 (le ZN a démontré la présence de bactéries). Ces résultats étaient prévisibles puisque l'on

considère que ces lésions surviennent tôt dans le développement de l'infection, lorsque l'animal n'est pas cliniquement malade et que l'immunité à médiation cellulaire est forte et limite la prolifération de *MAP*.<sup>21,22,86,88</sup> Il est également possible que ces lésions ne soient pas attribuables à une infection par *MAP* mais plutôt à d'autres causes d'inflammation granulomateuse comme les parasites ou les corps étrangers.<sup>6,96</sup> Cette possibilité est cependant faible puisque aucune trace de parasite ou de corps étranger n'a été découverte dans ces lésions.

Les tissus classés 3b représentent des lésions de paratuberculose classique.<sup>22,86</sup> Comme anticipé, les trois méthodes diagnostiques ont donné des résultats positifs sur tous ces cas. Ces lésions étaient histologiquement caractérisées par une infiltration granulomateuse diffuse et sévère du chorion et à un moindre degré du reste de la paroi intestinale, des vaisseaux lymphatiques mésentériques et des nœuds lymphatiques mésentériques. Elles appartenaient à la catégorie « multibacillaire » de par le grand nombre de bactéries acido-alcool-résistantes démontrées par la coloration ZN.<sup>22,86</sup> La grande quantité de bacilles dans ces lésions pourrait être expliquée par une immunité à médiation cellulaire affaiblie couplée à une stimulation de l'immunité à médiation humorale inefficace contre cette bactérie intracellulaire.<sup>86,87</sup> La faible quantité de lymphocytes dans ces lésions renforce cette théorie et pourrait expliquer la meilleure survie de *MAP* dans les macrophages puisque les lymphocytes Th1 peuvent stimuler l'activité microbicide du macrophage.<sup>33,62,103</sup>

Les animaux avec des lésions intestinales de grade 3c seraient dans un état de résistance partielle à l'infection, avec une immunité à médiation cellulaire relativement forte d'où l'infiltration diffuse du chorion de la muqueuse par de nombreux lymphocytes accompagnés de foyers granulomateux dispersés.<sup>88</sup> Ces lésions peuvent aussi être nommées « paucibacillaires » puisqu'il y a généralement peu ou pas de bactéries démontrables à la coloration ZN.<sup>22,86</sup> Dans notre étude, le ZN et l'IHC ont démontré une sensibilité similaire de 42% lorsque appliqués à des tissus

démontrant des lésions gradées 3c, tandis que le PCR-60 a démontré une sensibilité de 58%. Cette augmentation apparente de la sensibilité avec le PCR-60 n'était cependant pas statistiquement significative.

En général, autant avec le ZN que l'IHC, plus de bactéries étaient démontrables dans l'iléon que dans le nœud lymphatique iléocœcal.

Nous avons noté une hausse marquée de la sensibilité lorsque le PCR était fait sur des sections de 60  $\mu\text{m}$  comparativement au PCR fait sur des sections de 10  $\mu\text{m}$ . En effet, 62% des échantillons avec des lésions histologiques de paratuberculose ont été détectés par le PCR-60 alors que le PCR-10 n'en a détecté que 34%. Ceci peut être expliqué par les difficultés à amplifier des séquences mycobactériennes lorsque l'examen des tissus ne démontre pas la présence d'organismes acido-alcoolorésistants.<sup>23,75</sup> Dans le cas de la paratuberculose, le PCR amplifie une séquence de nucléotide de la séquence *IS900* qui se retrouve en 15-20 copies dans chaque bacille.<sup>38,67,84,116</sup> On peut donc présumer que de plus nombreuses bactéries, donc une plus grande quantité d'ADN bactérien, étaient présentes dans les sections de 60  $\mu\text{m}$ , ce qui expliquerait la plus grande sensibilité du PCR-60 comparativement au PCR-10. Cette observation pourrait avoir un impact significatif lorsqu'un investigateur veut confirmer la présence de *MAP* par PCR sur un cas de type 3c, puisque les bactéries y sont peu nombreuses et les lésions segmentaires. Dans notre étude aucun cas de type 3c n'avait été détecté avec le PCR-10 mais 7 cas sur une possibilité de 12 l'ont été avec le PCR-60.

Dans une étude rétrospective effectuée sur des tissus bovins enrobés dans la paraffine, *MAP* a été détecté dans 90% des tissus par PCR tandis que le ZN était positif dans 86% des cas et l'IHC dans 100% des cas.<sup>69</sup> Cette étude ne faisait cependant pas la distinction entre les différents grades histopathologiques. Ces taux de détections étaient comparables à ceux trouvés dans notre étude sur la paratuberculose ovine, particulièrement chez les sujets avec des lésions de grade 3b.

À notre connaissance, il n'y a pas de rapport publié qui compare spécifiquement la sensibilité de ces méthodes diagnostiques sur des sujets ovins avec des lésions de type 3c contenant très peu de bacilles.

Pour ce qui est de la spécificité, le ZN est la moins spécifique des trois méthodes testées. La coloration ZN repose sur le principe que la carbol fuchine crée des liens acide-stables dans le milieu interne de la bactérie ainsi qu'avec les résidus d'acide mycolique de la couche lipidique externe ce qui bloque la sortie de la fuchine prise à l'intérieur de la cellule.<sup>7</sup> De nombreuses bactéries sont acido-alcoolorésistantes et donc démontrables par le ZN (i.e. *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*).<sup>13,98,105</sup> De plus, les végétaux peuvent produire des lésions granulomateuses focales dans le chorion de la muqueuse et être colorées par le ZN, mais un bon examen histopathologique peut facilement identifier les débris végétaux.<sup>13,96</sup> La technique immunohistochimique utilisée dans cette étude repose sur la liaison entre des anticorps polyclonaux anti-*Mycobacterium bovis* et des antigènes de *MAP* sur une coupe histologique.<sup>90</sup> Le choix de l'utilisation d'anticorps anti-*Mycobacterium bovis* et non anti-*MAP* était motivé par l'impossibilité de trouver des anticorps commerciaux anti-*MAP*. Le principal inconvénient de ce choix est que l'utilisation de ces anticorps ne permet pas de faire la différence entre les différentes espèces mycobactériennes, néanmoins, l'IHC est tout de même considérée plus spécifique que le ZN.<sup>13,96</sup> En effet, une étude précédente faite sur des cas de paratuberculose bovine a démontré que les anticorps commerciaux que nous avons utilisés ne réagissent pas avec les débris végétaux et reconnaissent un antigène de surface de l'espèce *Mycobacterium*, ce qui en fait une méthode diagnostique plus spécifique que la coloration ZN qui repose sur des propriétés biochimiques.<sup>13</sup> Il faut cependant ajouter que la spécificité des anticorps polyclonaux n'est pas parfaite : ainsi une étude sur la spécificité d'anticorps commerciaux anti-mycobactériens a démontré qu'il y avait possibilité de réactions croisées avec certaines bactéries Gram-positives et certains champignons.<sup>42</sup> Il faut également noter qu'il y a d'autres désavantages à utiliser l'IHC plutôt que le ZN tels les coûts plus élevés et le temps de

préparation plus long. Le PCR utilisant la séquence IS900 est certainement la méthode la plus spécifique des trois puisque cette séquence est reconnue comme étant unique à *MAP*, bien qu'il soit connu que de rares mycobactéries environnementales puissent posséder des séquences très similaires.<sup>29,32,45,67</sup> Pour pouvoir faire la différence avec ces mycobactéries environnementales il aurait fallu faire le séquençage de l'amplicon, ce qui n'a pas été tenté dans cette étude. Parmi les désavantages du PCR, on note le coût plus élevé, la faible disponibilité de ce test et la possibilité de faux positifs (le PCR est tellement sensible que les risques de contamination de l'échantillon ou de contamination-croisée lors des manipulations doivent être pris en considération).<sup>40</sup>

De toute l'étude, la seule méthode diagnostique qui a démontré un résultat positif dans un animal contrôle négatif est le PCR (autant le PCR-10 que le PCR-60). La cause exacte de ce résultat positif demeure incertaine. Parmi les causes possibles, on note la possibilité que cet animal ait été vraiment infecté par *MAP* sans que des lésions histopathologiques n'aient été détectées. En effet, puisque l'étalon de référence choisi n'a pas une sensibilité parfaite (impossible à trouver dans le cas de la paratuberculose) et que nos animaux contrôles proviennent de troupeaux au statut sanitaire inconnu, il demeure une mince possibilité que certains de ces animaux soient atteints de paratuberculose peu développée. Une autre possibilité est que cet échantillon ait été contaminé lors de l'échantillonnage ou lors des manipulations PCR, cette dernière hypothèse semble cependant improbable étant donné la constance des résultats.

## CONCLUSION

Lorsqu'un pathologiste clinicien est mis en présence de lésions compatibles avec la paratuberculose ovine il se doit d'essayer de mettre en évidence l'agent étiologique. En effet, un nouveau diagnostic de paratuberculose dans un troupeau a des conséquences graves puisque l'animal malade a potentiellement excrété *MAP* (un organisme très résistant) dans l'environnement, ce qui constitue une menace pour le reste du troupeau.

Nous avons donc essayé de comparer trois méthodes diagnostiques *post-mortem* rapides quant à leur sensibilité à mettre *MAP* en évidence et quant à leur spécificité. Le ZN, l'IHC et le PCR sont trois méthodes diagnostiques valides pour démontrer la présence de *MAP* dans des tissus fixés dans la formaline et enrobés dans la paraffine. Elles ont toutes trois démontré une sensibilité similaire, les différences n'étant pas statistiquement significatives.

Pour cette étude nous avons décidé d'utiliser des anticorps commerciaux anti-*Mycobacterium bovis*, facilement disponibles pour tout laboratoire diagnostique. Ce choix était motivé par notre volonté de comparer des tests facilement disponibles pour un laboratoire diagnostique vétérinaire moyen et par l'impossibilité de trouver des anticorps commerciaux anti-*MAP*. Le principal inconvénient de ce choix est que les anticorps utilisés ne sont pas totalement spécifiques à *MAP*. Il pourrait être intéressant, dans une étude ultérieure, d'appliquer les anticorps utilisés dans cette étude à une gamme de bactéries acido-alcool-résistantes dans le but de mieux évaluer la spécificité de ces anticorps. De plus, si des anticorps commerciaux anti-*MAP* étaient rendus disponibles dans l'avenir, il serait très intéressant de vérifier si la sensibilité et la spécificité de ces nouveaux anticorps seraient supérieures à celles démontrées dans notre étude.

Le PCR-60 a détecté deux animaux suspectés de paratuberculose de plus que le ZN ou l'IHC mais cette apparente augmentation de la sensibilité n'était pas statistiquement significative. Nous avons démontré que l'échantillon utilisé pour faire le PCR pouvait influencer la sensibilité du test. En effet, nous avons noté une hausse marquée de la sensibilité lorsque le PCR était fait à partir de sections de 60µm en comparaison au PCR fait à partir de sections de 10µm. Cette hausse était particulièrement importante lorsque le PCR était pratiqué sur des animaux démontrant des lésions de grade 3c, soit des lésions bien développées mais recelant peu de bactéries. Dans l'avenir il serait intéressant de vérifier si nous pourrions encore augmenter la sensibilité du PCR appliqué aux lésions de grade 3c en utilisant des tissus frais, puisqu'il peut y avoir dégradation de l'ADN durant le processus de fixation et d'enrobage dans la paraffine.<sup>75,119</sup>

## BIBLIOGRAPHIE

1. Alzuherri HM, Little D, Clarke CJ: Altered intestinal macrophage phenotype in ovine paratuberculosis, *Res Vet Sci* **63**: 139-143, 1997
2. Arsenault J: Prévalence et impact du maedi-visna, de la lymphadénite caséuse et de la paratuberculose chez les ovins du Québec, 3. Paratuberculose, mémoire de maîtrise, Faculté des études supérieures de l'université de Montréal: 183-185
3. Bakker D, Willemsen PTJ, Van Zijderveld FG: Paratuberculosis recognized as a problem at last: a review, *Vet Q* **22**: 200-204, 2000
4. Bannantine JP, Stabel JR: Killing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* within macrophages, *Microbiol* **2**: 1-12, 2002
5. Barclay R, Ratledge C: Iron-binding compounds of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, and Mycobactin-dependent *M. paratuberculosis* and *M. avium*, *J Bacteriol* **153**: 1138-1146, 1983
6. Barker IK, Van Dreumel AA, Palmer N. The alimentary system, in: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N, pathology of domestic animals, Fourth edition, Boston, Academic Press: 247-252, 1993
7. Barksdale L, Kim KS: *Mycobacterium*, *Bacteriol rev* **41**: 217-372, 1977
8. Beard PM, Daniels MJ, Henderson D and al: Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland, *J Clin Microbiol* **39**: 1517-1521, 2001
9. Begara-McGorum I, Wildblood LA, Clarke CJ, et al: Early immunopathological events in experimental ovine paratuberculosis, *Vet Immunol Immunopathol* **63**: 265-287, 1998

10. Benazzi S, elHamidi M, Schliesser T: Paratuberculosis in sheep flocks in Morocco: a serological, microscopical and culture survey, *J Vet Med B* **43**: 213-219, 1996
11. Best M, Sattar SA, Springthorpe VS, Kennedy ME: Efficacies of selected disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis*, *J Clin Microbiol*: 2234-2239, 1990
12. Bochler PN, Slauson DO: Inflammation and repair of tissue, in: Mechanisms of disease, a textbook of comparative general pathology, Third Edition, Philadelphia. Mosby, Inc, 140-245, 2002
13. Brees DJ, Reimer SB, Cheville NF, Florance A, Thoen CO: Immunohistochemical detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine tissue sections, *J Vet Diagn Invest* **12**: 60-63, 2000
14. Buergelt CD, Hall C, Mc Entee K, Duncan JR: Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle, *Vet Pathol* **15**: 196-207, 197
15. Burrells C, Clarke CJ, Colston A and al: A study of immunological responses of sheep clinically-affected with paratuberculosis (Johne's disease) the relationship of blood, mesenteric lymph node and intestinal lymphocyte responses to gross and microscopic pathology, *Vet Immunol Immunopathol* **66**: 343-358, 1998
16. Campbell NA, Mathieu R: Bactéries et maladies, dans: Biologie, Edition du nouveau pédagogique Inc, Drumundville, 528-529

17. Carbonel P: Histopathological diagnosis of Johne's disease, *Aust Vet J* **76**: 499, 1998
18. Carrigan MJ, Seaman JT: The pathology of Johne's disease in sheep, *Aust Vet J* **67**: 47-50, 1990
19. Chamberlin W, Graham DY, Hulten K, El-Zimaity MT, Schwartz MR, Naser S, Shafran I, El-Zaatari AK: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as one cause of Crohn's disease, *Aliment Pharmacol Ther* **15**, 337-346, 2001
20. Chi J, VanLeeuwen JA, Weersink A, Keefe GP: Management factors related to seroprevalences to bovine viral-diarrhoea virus, bovine-leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* in dairy herds in the Canadian Maritimes, *Prev Vet Med* **55**, 57-68, 2002
21. Chiodini CJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS: Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects, *Cornell Vet* **74**: 218-262, 1984
22. Clarke CJ: The pathology and the pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species, *J Comp Path* **116**: 217-261, 1997
23. Clarke CJ, Little D: The pathology of ovine paratuberculosis: gross and histological changes in the intestine and other tissues, *J Comp Path* **114**: 419-437, 1996
24. Clarke CJ, Patterson AP, Armstrong KE, Low JC: Comparison of the absorbed ELISA and agar gel immunodiffusion test with clinicopathological findings in ovine clinical paratuberculosis, *Vet Rec* **139**: 618-621, 1996

25. Coetsier C, Havaux X, Mattelard F and al: Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected tissues by new species-specific immunohistological procedures, Clin Diagn Lab Immunol **5**: 446-451, 199
26. Collins MT: Diagnosis of paratuberculosis, Vet Clin North Am Food Anim Pract **12**: 357-371, 1996
27. Collins DM, DeZoete M, Cavaignac SM: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from cattle and sheep can be distinguish by a PCR test based on a novel DNA sequence difference, J Clin Microbiol **40**: 4760-4762, 2002
28. Collins DM, Gabric DM, DeLisle GW: Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization, J Clin Microbiol **28**: 1591-1596, 1990
29. Collins DM, Gabric DM, DeLisle GW: Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*, FEMS Microbiol Lett **51**: 175-178, 1989
30. Collins DM, Hilbink F, West DM, Hosie BD, Cooke MM, DeLisle GW: Investigation of *Mycobacterium paratuberculosis* in sheep by faecal culture, DNA characterization and the polymerase chain reaction, Vet Rec **133**: 599-600, 1993
31. Cotran RS, Kumar V, Collins T: Acute and chronic inflammation, In: Robbins Pathologic basis of disease, Sixth Edition, Philadelphia, WB Saunders, 50-88, 1999

32. Cousins DV, Whittington R, Marsh I and al: Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable by IS900 polymerase chain reaction : implications for diagnosis, Mol Cell Probe **14**: 431-442, 1999
33. Coussens PM: *Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system, Anim Health Res Rev **2**: 141-161, 2001
34. Daniels MJ, Henderson D, Greig A, Stevenson K and al: The potential role of wild rabbits *Oryctolagus cuniculus* in domestic ruminants, Epidemiol Infect **130**: 553-559, 2003
35. Daniels MJ, Hutchings MR, Beard PM and al: Do non-ruminant wildlife pose a risk of paratuberculosis to domestic livestock and vice versa in Scotland?, J Wildlife Dis **39**: 10-15, 2003
36. DeLisle GW: Can Johne's disease be eradicated from sheep in Australia?, Aust Vet J **75**: 336, 1997
37. Dubash K, Shulaw WP, Bech-Nielsen S, Stills HF, Slemmons RD: Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay licensed by the USDA for use in cattle for diagnosis of ovine paratuberculosis, J Vet Diagn Invest **7**: 347-351, 1995
38. Ellingson JLE, Bolin CA, Stabel JR : Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis, Mol Cell Probe **12**: 133-142, 1998
39. Englund S, Ballagi-Pordany A, Bolske G, Johansson KE: Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Diagn Microbiol Infect Dis **33**: 163-171, 1999

40. Englund S, Bolske G, Ballagi-Pordany A, Johansson KE: Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue samples by single, fluorescent and nested PCR based on the IS900 gene, *Vet Microbiol* **81**: 257-271, 2001
41. Gay JM, Sherman DM: Factors in the epidemiology and control of ruminant paratuberculosis, *Vet Med* **87**: 1133-1140, 1992
42. Geisel O, Netter F, Hermanns W: Specificity of the immunohistochemical demonstration of mycobacterial antigens, *Zentralbl Veterinarmed B* **41**: 548-553, 1994
43. Gilmour NJ: Recent research on Johne's disease, *Vet Rec* **77**: 1322-1326, 1965
44. Grant IR, Ball HJ, Rowe M T: Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom, *Appl Environ Microbiol* **68**: 2428-2435, 2002
45. Green EP, Tizard MLV, Moss MT and al.: Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*, *Nucleic Acids Research* **17**: 9063-9073, 1989
46. Greig A, Stevenson K, Perez V, Pirie AA, Grant JM, Sharp JM: Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), *Vet Rec* **140**: 141-143, 1997
47. Guillou JP, Karoui C, Henault S, Thorel MF: Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in faecal samples, pathological samples and formalin-fixed,

- paraffin-embedded tissues, by polymerase chain reaction, Proceedings of 4<sup>th</sup> international colloquium on paratuberculosis, 41-46: July 17-21, 1994
48. Gwozdz JM, Reichel MP, Murray A, Manktelow West DM, Thompson KG: Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine tissues and blood by the polymerase chain reaction, Vet Microbiol **57**: 233-244, 1997
  49. Hagan WA: Age as a factor in susceptibility to Johne's disease, Cornell vet **28**: 34-40, 1938
  50. Harel J, Forget C: DNA probe and polymerase chain reaction procedure for the specific detection of *Serpulina hyodysenteriae*, Mol Cell Probes **9**: 111-119, 1995
  51. Harris NB, Barletta RG : *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine, Clin Microbiol Rev **14**: 489-512, 2001
  52. Hietala SK : The options in diagnosing ruminant paratuberculosis, Vet Med **87**: 1122-1132, 1992
  53. Hines ME, Styler EL: Preliminary characterization of chemically generated *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cell wall deficient forms (spheroplasts), Vet Microbiol **95**: 247-258, 2003
  54. Huda A, Jensen HE: Comparison of histopathology, cultivation of tissues and rectal contents, and interferon-gamma and serum antibody responses for the diagnosis of bovine paratuberculosis, J Comp Path **129**: 259-267, 2003
  55. Hutchinson LJ: Economic impact of paratuberculosis, Vet Clin North Am Food Anim Pract **12**: 373-381, 1996

56. Johnson-Ifeorunlu Y, Kaneene JB: Relationship between soil type and *Mycobacterium paratuberculosis*, JAVMA **210**: 1735-1740, 1997
57. Johnson-Ifeorunlu Y, Kaneene JB: Distribution and environmental risk factors for paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan, Am J Vet Res **60**: 589-596, 1999
58. Juste RA, Marco JC, DeOcariz CS, Aduriz J J: Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*, Vet Microbiol **28**: 385-390, 1991
59. Kennedy DJ, Benedictus G: Control of *Mycobacterium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species, Rev sci tech Off int Epiz **20**: 151-179, 2001
60. Khare S, Ficht TA, Santos RL and al: Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and realtime PCR, J Clin Microbiol **42**: 1075-1081, 2004
61. Koets A, Rutten V, deBoer M and al: Differential changes in heat shock protein-, lipoarabinomannan-, and purified protein derivative-specific immunoglobulin G1 and G2 isotype responses during bovine *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection, Infect Immun **69**: 1492-1498, 2001
62. Koets A, Rutten V, Hoek A and al: Progressive bovine paratuberculosis is associated with local loss of CD4+ T cells, increased frequency of  $\gamma\delta$ T cells, and related changes in T-Cell function, Infect Immun **70**: 3856-3864, 2002

63. Kurade NP, Tripathi BN, Rajukumar K, Parihar NS: Sequential development of histologic lesions and their relationship with bacterial isolation, fecal shedding, and immune responses during progressive stages of experimental infection of lambs with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Vet Pathol* **41**: 378-387, 2004
64. Larsen AB, Merkal RS, Cutlip RC: Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*, *Am J Vet Res* **36**: 255-257, 1975
65. Larsen AB, Stalhein OHV, Hughes DE, Appell LH, Richards WD, Himes EM : *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull, *JAVMA* **179**: 169-171, 1981
66. Manning EJB: *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: a review of current knowledge, *J Zoo Wildlife Med* **32**: 293-304, 2001
67. Manning EJB, Collins MT: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis *Rev. Sci. Tech. Int. Epiz.* **20**:133-150, 2001
68. Mason O, Marsh IB, Whittington RJ: Comparison of immunomagnetic bead separation-polymerase chain reaction and faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep faeces, *Aust Vet J* **79**: 497-500, 2001
69. Massone AR, Martin AA, Ibargoyen GS, Gimeno EJ: Immunohistochemical methods for the visualization of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine tissues. *Zentralbl Veterinarmed B* **37**: 251-253, 1990

70. Marsh IB, Whittington RJ: Progress towards a rapid polymerase chain reaction diagnostic test for the identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces, *Mol Cell Probe* **15**: 105-118, 2001
71. Marsh I, Whittington R, Cousins D: PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311, *Mol Cell Probe* **13**: 115-126, 1999
72. McClure HM, Chiodini RJ, Anderson DC and al: *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a colony of stumptail macaques (*Macaca artoides*), *J Infect Dis* **155**: 1011-1019, 1987
73. McDonald W L, Ridge S E, Hope A F, Condron R J: Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in young cattle, *Aust Vet J* **77**: 113-119, 1999
74. McNab WB, Meek AH, Duncan JR, Martin SW, Van Dreumel AA: An epidemiological study of paratuberculosis in dairy cattle in Ontario: study design and prevalence estimates, *Can J Vet Res* **55**(3), 246-251, 1991
75. Miller JM, Jenny AL, Payeur JB: Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium avium* organisms in formalin-fixed tissues from culture-negative ruminants. *Vet Microbiol* **87**: 15-23, 2002
76. Momotani E, Whipple DL, Thiermann AB, Cheville NF: Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet Pathol* **25**: 131-137, 1988

77. Morel G, Raccurt M: PCR in: PCR/RT-PCR *in situ*, light and electron microscopy, Portland, CRC Press, 2002
78. Motiwala AS, Strother M, Amonsin A and al : Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: evidence for limited strain diversity, strain sharing, and identification of unique targets for diagnosis, J Clin Microbiol **41**: 2015-2026, 2003
79. Murray PR and al: *Mycobacterium*: general characteristics, isolation, and staining procedures, In: Manual of clinical microbiology, 8<sup>th</sup> Edition, Vol 1, Amer Society for Microbiology, Washington, 532-584, 2003
80. Muskens J, Bakker D, deBoer J, VanKeulen L: Paratuberculosis in sheep: its possible role in the epidemiology of paratuberculosis in cattle, Vet Microbiol **78**: 101-109, 2001
81. Naser AS, Ghobrial F, Romero C, Valentine JF: Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease, Lancet **364**, 1039-1044, 2004
82. Navarro JA, Bernabe A, Gomez MA, et al: Mycobacterial antigen detection by immunohistochemistry in goat paratuberculosis. Zentralbl Veterinarmed B **38**: 231-237, 1991
83. Nielsen SS, Kolmos B, Christoffersen AB: Comparison of contamination and growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on two different media, J Appl Microbiol **96**: 149-153, 2004
84. Olsen I, Sigurdardottir OG, Djonne B: Paratuberculosis with special reference to cattle, a review, Vet Q **24**: 12-28, 2002

85. Paolicchi FA, Vagnozzi A, Morsella CG and al: Paratuberculosis in red deer (*Cervus elaphus*): an immunohistochemical study, J Vet Med B **48**: 313-320, 2001
86. Perez V, Garcia Marin JF, Badiola JJ: Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep, J Comp Path **114**: 107-122, 1996
87. Perez V, Tellechea J, Badiola JJ, Gutierrez M, Garcia Marin JF: Relation between serologic response and pathologic findings in sheep with naturally acquired paratuberculosis, AJVR **58**: 799-803, 1997
88. Perez V, Tellechea J, Corpa M, Gutierrez M, Garcia Marin F: Relation between pathologic findings and cellular immune responses in sheep with naturally acquired paratuberculosis, AJVR **60**: 123-127, 1999
89. Plante Y, Remenda BW, Chelack BJ, Haines DM: Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by the polymerase chain reaction, Can J Vet Res **60**: 115-120, 1996
90. Polak JM, Van Noorden SV: Requirement for immunocytochemistry, In: Introduction to immunocytochemistry, Second Edition, Springer, Oxford, 11-31, 1997
91. Quinn PJ and al.: *Mycobacterium* species, In: Veterinary microbiology and microbial disease, Blackwell science ltd, Oxford, 97-105
92. Rastogi N, Legrand E, Sola C: The Mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis, Rev sci tech Off int Epiz **20**: 21-54, 2001

93. Riond JL: Animal nutrition and acid-base balance, *Eur J Nutr* **40**:245-254, 2001
94. Schaible UE, Collins HL, Kaufmann SH: Confrontation between intracellular bacteria and the immune system, *Adv Immunol* **71**: 267-377, 1999
95. Seitz SE, Heider LE, Heuston WD and al: Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*, *J Am Vet Med Assoc* **194**: 1423-1426, 1989
96. Sigurdardottir OG, Press CMcL, Saxegaard F, Evensen O: Bacterial isolation, immunologic response, and histopathological lesions during the early subclinical phase of experimental infection of goat kids with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Vet Pathol* **36**: 542-550, 1999
97. Stabel JR: Symposium: biosecurity and disease, Johne's disease: a hidden threat, *J Dairy Sci* **81**: 283-288, 1998
98. Stabel JR, Ackermann MR, Goff JP: Comparison of polyclonal antibodies to three different preparations of *Mycobacterium paratuberculosis* in immunohistochemical diagnosis of Johne's disease in cattle, *J Vet Diagn Invest* **8**: 469-473, 1996
99. Stehman SM: Paratuberculosis in small ruminants, deer, and south American camelids, *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **12**: 441-455, 1996
100. Stevenson K, Hughes VM, de Juan L, Inglis NF, Wright F, Sharp JM: Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of

- Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, J Clin Microbiol **40**: 1798-1804, 2002
101. 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 **56**: 1322-1324, 1995
  102. Sweeney RW: Transmission of paratuberculosis, Vet Clin North Am Food Anim Pract **12**: 305-312, 1996
  103. Tessema MZ, Koets AP, Rutten VPMG, Gruys E: How does *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* resist intracellular degradation?, Vet Quart **23**: 153-162, 2001
  104. Thoen CO, Haagsma J: Molecular techniques in the diagnosis and control of paratuberculosis in cattle, JAVMA **209**: 734-737, 1996
  105. Thoresen OF, Falk K, Evensen O: Comparison of immunohistochemistry, acid-fast staining, and cultivation for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in goats, J Vet Diagn Invest **6**: 195-199, 1994
  106. Valentin-Weigand P, Goethe R: Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in ruminants: still more questions than answers, Microbes infect **1** : 1121-1127, 1999
  107. Van Der Giessen JWB, Haagsma J, Haring RM, Gaastra W, Van Der Zeijst BAM: Amplification of 16S rRNA sequences to detect *Mycobacterium paratuberculosis*, J Med Microbiol **36**: 255-263, 1992

108. VanLeeuwen JA, Keefe GP, Tremblay R, Power C, Wichtel JJ: Seroprevalence of infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, bovine leukemia virus, and bovine viral diarrhea virus in maritime Canada dairy cattle, *Can Vet J* **42**(3): 193-198, 2001
109. Vansnick E, DeRijk P, Vercammen F and al: Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, *Vet Microbiol* **100**: 197-204, 2004
110. Vary PH, Andersen PR, Green E, Hermon-Taylor J, McFadden JJ: Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in John's disease, *J Clin Microbiol* **28**: 933-937, 1990
111. Wall S, Kunze ZM, Sabor S and al: Identification of spheroplast-like agents isolated from tissues of patients with Crohn's disease and control tissues by polymerase chain reaction, *J Clin Microbiol* **31**: 1241-1245, 1993
112. Waters WR, Miller JM, Palmer MV and al: Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of calves, *Infect Immun* **71**: 5130-5138, 2003
113. Whitlock RH, Buergelt C: Preclinical manifestation of paratuberculosis (including pathology), *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **12**: 345-356, 1996
114. Whittington RJ, Fell S, Walker D and al: Use of pooled fecal culture for sensitive and economic detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in flocks of sheep, *J Clin Microbiol* **38**: 2550-2556, 2000

115. Whittington RJ, Hope AF, Marshall DJ, Taragel CA, Marsh I: Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia, J Clin Microbiol **38**: 3240-3248, 2000
116. Whittington R, Marsh I, Choy E, Cousins D: Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species, Mol Cell Probe **12**: 349-358, 1998
117. Whittington RJ, Marsh I, McAllister S and al: Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep, J Clin Microbiol **37**: 1077-1083, 1999
118. Whittington RJ, Marsh I, Turneer MJ and al: Rapid detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in clinical samples from ruminants and in spiked environmental samples by modified BACTEC 12B radiometric culture and direct confirmation by IS900 PCR, J Clin Microbiol **36**: 701-707, 1998
119. Whittington RJ, Reddacliff L, Marsh I, Saunders V: Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded intestinal tissue by IS900 polymerase chain reaction, Aust Vet J **77**: 392-397, 1999
120. Whittington RJ, Sargent ESG: Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in animal populations, Aust Vet J **79**: 267-278, 2001

121. Whittington RJ, Taragel CA, Ottaway S, Marsh I, Seaman J, Fridriksdottir V: Molecular epidemiological confirmation and circumstances of occurrence of sheep (S) strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cases of paratuberculosis in cattle in Australia and sheep and cattle in Iceland, *Vet Microbiol* **79**: 311-322, 2001

