

Université de Montréal

**Excrétion nasale et réponse sérologique à *Mycoplasma bovis* chez les génisses de remplacement de 0 à 7 mois d'âge dans 4 troupeaux laitiers au Québec :
Étude de cohortes**

Par
Salima Gasmi

Département de sciences cliniques
Faculté de médecine vétérinaire

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

Octobre 2011

© Salima Gasmi, 2011

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé :

**Excrétion nasale et réponse sérologique à *Mycoplasma bovis* chez les
génisses de remplacement de 0 à 7 mois d'âge dans 4 troupeaux laitiers
au Québec :
Étude de cohortes**

Présenté par :
Salima Gasmi

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Serge Messier, président-rapporteur
David Francoz, directeur de recherche
Gilles Fecteau, codirecteur
Jocelyn Dubuc, membre du jury

RÉSUMÉ

En Amérique du Nord, *Mycoplasma bovis* est le plus pathogène des mycoplasmes retrouvés chez les bovins. Les principales maladies qu'on lui associe (maladies respiratoires, mammites, arthrites septiques et otites moyennes et/ou internes) constituent un défi à l'industrie laitière à cause de la difficulté à les traiter et à les prévenir par une vaccination.

L'objectif principal de ce projet était d'étudier l'excrétion nasale et la réponse sérologique à *M. bovis* chez les génisses de remplacement, entre la naissance et 7 mois d'âge, dans 4 troupeaux laitiers au Québec.

Quatre-vingt-trois paires mère/génisse provenant de 4 cohortes de bovins laitiers étaient prélevées mensuellement (génisses : 0 à 7 mois ; mères : 0, 1 et 5 mois après vêlage). Écouvillons nasaux et échantillons de lait étaient analysés par culture bactériologique et par immunofluorescence indirecte. Les anticorps circulants étaient détectés par le test ELISA.

À la naissance, la prévalence sérologique des génisses était supérieure à celle des mères ($P = 0,01$). La transmission de *M. bovis* aux génisses par le lait et par l'excrétion nasale des mères était faible. L'âge moyen (jour) d'une génisse à sa 1^{ère} excrétion nasale et sa 1^{ère} séroconversion à *M. bovis* était loin de la période néonatale: $77,5 \pm 11,2$ ($n = 22$) et $96,8 \pm 7,4$ ($n = 36$) respectivement.

Conclusion, les vaches adultes n'ont constitué qu'une voie mineure de transmission de *M. bovis* aux génisses, la principale voie de transmission était fort probablement le contact direct ou indirect avec d'autres génisses excrétrices nasales de *M. bovis*.

Mots-clés : *Mycoplasma bovis*, pneumonie, arthrite, mammite, excrétion nasale.

SUMMARY

In North America, *Mycoplasma bovis* is the most pathogenic mycoplasma found in cattle. The main diseases associated with it (respiratory disease, mastitis, septic arthritis and otitis median and/or internal) are a challenge to the dairy industry because of the difficulty to treat them and to prevent them by vaccination.

The principal objective of this project was to study nasal shedding and serological response to *M. bovis* in replacement heifers, between birth and 7 months of age, in four dairy herds in Quebec.

Eighty three pairs cow/heifer in 4 cohorts of dairy cattle were sampled monthly (heifers: 0 to 7 months; cows: 0, 1 and 5 months after calving). Nasal swabs and milk samples were analyzed by bacteriological culture and by indirect immunofluorescence. Circulating antibodies were detected by ELISA test.

At birth, the serologic prevalence of heifers was significantly higher than the serologic prevalence of cows ($P = 0,01$). Transmission of *M. bovis* to heifers in milk and nasal shedding from cows was low. The average age (days) of a heifer for first nasal shedding and first seroconversion to *M. bovis* was far from the neonatal period: $77,5 \pm 11,2$ days ($n = 22$) and $96,8 \pm 7,4$ days ($n = 36$) respectively.

Conclusion, cows were only a minor route of transmission of *M. bovis* to heifers, the main route of transmission was most likely the direct or indirect contact with other heifers shedding *M. bovis* in their upper respiratory tract.

Keywords: *Mycoplasma bovis*, pneumonia, arthritis, mastitis, nasal shedding.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	i
SUMMARY.....	ii
TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
REMERCIEMENTS.....	xii
INTRODUCTION	1
RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	2
1. CARACTÉRISTIQUES ET POUVOIR PATHOGÈNE DE <i>M. BOVIS</i>	2
1.1. <i>Absence de paroi</i>	3
1.2. <i>Taille du génome</i>	3
1.3. <i>Variations des antigènes de surface</i>	3
1.4. <i>Transfert de gènes</i>	4
1.5. <i>Persistance</i>	5
1.6. <i>Sensibilité aux antibiotiques</i>	6
2. MALADIES ASSOCIÉES À <i>M. BOVIS</i> ET LEUR IMPORTANCE	7
2.1. <i>Les maladies respiratoires</i>	8
2.2. <i>Les mammites</i>	8
2.3. <i>Les arthrites septiques</i>	9
2.4. <i>Les otites chez les jeunes animaux</i>	10
3. MÉTHODES DE DIAGNOSTIC	11
3.1. <i>Diagnostic clinique</i>	11
3.2. <i>Diagnostic de laboratoire</i>	11
4. LES FACTEURS DE RISQUE	14
4.1. <i>Introduction de nouveaux animaux</i>	14

4.2.	<i>Alimentation des veaux avec du lait contaminé</i>	15
4.3.	<i>La taille du troupeau</i>	16
4.4.	<i>Les facteurs environnementaux</i>	16
4.5.	<i>La gestion du logement</i>	17
4.6.	<i>L'association avec d'autres microorganismes</i>	17
4.7.	<i>Les facteurs liés à l'individu</i>	18
5.	LES MODES DE TRANSMISSION	19
5.1.	<i>Transmission directe</i>	19
5.2.	<i>Transmission indirecte</i>	20
5.3.	<i>Transmission par voie hématogène ou lymphatique</i>	21
6.	PRÉVENTION ET CONTRÔLE	21
6.1.	<i>Métaphylaxie</i>	21
6.2.	<i>Vaccination</i>	22
6.3.	<i>Conduite d'élevage</i>	23
MÉTHODOLOGIE		25
1.	LA POPULATION À L'ÉTUDE	25
1.1.	<i>La sélection des troupeaux</i>	25
1.2.	<i>La sélection des animaux</i>	25
2.	LE QUESTIONNAIRE	26
3.	LES PRÉLÈVEMENTS	26
3.1.	<i>Nature et mode de prélèvement</i>	26
3.2.	<i>Séquence des prélèvements</i>	27
3.3.	<i>Acheminement et conservation</i>	28
4.	LES ANALYSES DE LABORATOIRE	28
4.1.	<i>Analyse bactériologique</i>	28
4.2.	<i>Analyse sérologique</i>	30
5.	LES ANALYSES STATISTIQUES	30
5.1.	<i>Définitions générales</i>	30
5.2.	<i>Définitions et tests statistiques/calculs selon le type d'analyse</i>	31

5.3.	<i>Analyse des concordances</i>	32
5.4.	<i>Analyse de l'âge moyen d'une 1^{ère} excrétion nasale, 1^{ère} séropositivité et 1^{ère} séroconversion à M. bovis chez les génisses</i>	33
5.5.	<i>Analyse de l'intermittence de l'excrétion nasale de M. bovis chez les génisses</i>	33
5.6.	<i>Analyse de la vitesse de survenue de la 1^{ère} excrétion nasale, 1^{ère} séropositivité et 1^{ère} séroconversion à M. bovis chez les génisses</i>	34
EXPOSÉ ET ANALYSE DES RÉSULTATS		36
1.	DESCRIPTION DES TROUPEAUX	36
1.1.	<i>Troupeau A</i>	36
1.2.	<i>Troupeau B</i>	37
1.3.	<i>Troupeau C</i>	37
1.4.	<i>Troupeau D</i>	38
2.	ÂGE MOYEN DES GÉNISSES À LEUR PREMIER PRÉLÈVEMENT.....	39
3.	LES RÉSULTATS BACTÉRIOLOGIQUES.....	40
3.1.	<i>Résultats bactériologiques de culture nasale chez les génisses et chez les vaches adultes</i>	40
3.2.	<i>Résultats bactériologiques du lait de réservoir</i>	41
3.3.	<i>Résultats bactériologiques du lait individuel</i>	41
3.4.	<i>Incidence cumulée de l'excrétion nasale chez les génisses</i>	41
3.5.	<i>Analyse de survie (selon la méthode de Kaplan-Meier) de la vitesse de survenue de la première excrétion nasale de M. bovis chez les génisses</i>	42
3.6.	<i>Âge moyen de survenue de la première excrétion nasale de M. bovis chez les génisses</i>	44
3.7.	<i>Le patron de l'excrétion nasale de M. bovis chez les génisses</i>	44
3.8.	<i>Analyse de la concordance entre le statut des vaches adultes et le statut des génisses pour les résultats de cultures bactériologiques</i>	46
4.	LES RÉSULTATS SÉROLOGIQUES.....	47
4.1.	<i>Résultats sérologiques chez les génisses et chez les vaches adultes</i>	47

4.2.	<i>Incidence cumulée des génisses séropositives</i>	47
4.3.	<i>Analyse de survie (selon la méthode de Kaplan-Meier) de la vitesse de survenue du premier cas séropositif à M. bovis chez les génisses</i>	48
4.4.	<i>Âge moyen de survenue de la première séropositivité à M. bovis chez les génisses</i>	50
4.5.	<i>Analyse de la concordance entre les statuts sérologiques mère/génisse à M. bovis pour le premier mois après la naissance des génisses</i>	50
5.	LES RÉSULTATS DE SÉROCONVERSION	51
5.1.	<i>Incidence cumulée des génisses séroconverties</i>	51
5.2.	<i>Analyse de survie (selon la méthode de Kaplan-Meier) de la vitesse de survenue de la première séroconversion chez les génisses</i>	52
5.3.	<i>Âge moyen de survenue de la première séroconversion à M. bovis chez les génisses</i>	54
6.	LES RÉSULTATS DE L'ANALYSE DE LA CONCORDANCE DU STATUT SÉROCONVERSION/BACTÉRIOLOGIE À <i>M. BOVIS</i> CHEZ LES GÉNISSES	55
	DISCUSSION GÉNÉRALE	56
1.	ÉTUDE DE LA CONCORDANCE ENTRE L'EXCRÉTION NASALE ET LA SÉROCONVERSION À <i>M. BOVIS</i> CHEZ LES GÉNISSES	56
2.	CHOIX DES INDICATEURS ÉPIDÉMIOLOGIQUES DANS L'ÉTUDE DE LA DYNAMIQUE DE TRANSMISSION DE <i>M. BOVIS</i> CHEZ LES GÉNISSES	58
3.	ÉTUDE DE LA DYNAMIQUE DE TRANSMISSION DE <i>M. BOVIS</i>	58
4.	LE MODÈLE DE TRANSMISSION DE <i>M. BOVIS</i>	61
5.	LES PROPORTIONS DES RÉSULTATS POSITIFS DE CULTURES NASALES ET DES RÉSULTATS SÉROLOGIQUES.....	62
6.	DESCRIPTION DU PATRON DE L'EXCRÉTION NASALE DE <i>M. BOVIS</i>	63
7.	LES LIMITES DE L'ÉTUDE	64
	CONCLUSION	65
	BIBLIOGRAPHIE	66

ANNEXES	I
ANNEXE I.....	I
COMPOSITION DU MILIEU HAYFLICK	I
ANNEXE II.....	II
<i>Principe du test ELISA</i>	II
<i>Calcul du seuil de positivité</i>	II
<i>Interprétation des résultats</i>	III
ANNEXE III.....	IV
<i>Le questionnaire</i>	IV

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : <i>Durée de survie de M. bovis dans le milieu extérieur</i>	5
Tableau II : <i>Âge moyen des génisses (en jour) à leur premier prélèvement pour les différents troupeaux et pour l'ensemble des troupeaux</i>	39
Tableau III : <i>Proportions des prélèvements positifs à M. bovis et à M. spp. en culture nasale (chez les génisses et chez les vaches adultes) par rapport au nombre total des prélèvements effectués pendant toute la période de l'étude</i>	40
Tableau IV : <i>Incidence cumulée des génisses diagnostiquées excrétrices nasales de M. bovis par 100 veau-mois de la naissance à l'âge de 7 mois</i>	41
Tableau V : <i>Âge moyen en jour de survenue de la première excrétion nasale chez les génisses diagnostiquées excrétrices nasales de M. bovis de la naissance à 7 mois d'âge</i>	44
Tableau VI : <i>Résultats de la concordance entre le statut des vaches adultes (en lait et culture nasale) et le statut des génisses (en culture nasale) à M. bovis de toute la période de l'étude</i>	46
Tableau VII : <i>Proportions des prélèvements sérologiques positifs à M. bovis (chez les génisses et chez les vaches adultes) par rapport au nombre total des prélèvements effectués durant la période d'étude</i>	47
Tableau VIII : <i>Incidence cumulée des génisses diagnostiquées séropositives à M. bovis par 100 veau-mois de la naissance à l'âge de 7 mois</i>	48
Tableau IX : <i>Âge moyen en jour de survenue du premier cas séropositif chez les génisses diagnostiquées séropositives à M. bovis de la naissance à 7 mois d'âge</i>	50
Tableau X : <i>Résultats de la concordance entre le statut des génisses et le statut des mères pour les résultats sérologiques à M. bovis pour le premier mois après la naissance</i>	51
Tableau XI : <i>Incidence cumulée des génisses séroconverties contre M. bovis par 100 veau-mois de la naissance à l'âge de 7 mois</i>	52
Tableau XII : <i>Âge moyen de survenue de la 1^{ère} séroconversion contre M. bovis des génisses diagnostiquées séroconverties à M. bovis dans les troupeaux A, B et D</i>	54
Tableau XIII : <i>Résultats de la concordance entre le statut de séroconversion et le statut bactériologique à M. bovis des génisses de la naissance à l'âge de 7 mois</i>	55

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Colonies de <i>M. bovis</i> vues au microscope (grossissement 40 X).....	2
Figure 2 : Comparaison des courbes de survie cumulées (selon la méthode de Kaplan-Meier) de la vitesse de survenue de la première excrétion nasale chez les génisses dans les 3 troupeaux A, B et D.....	43
Figure 3 : Répartition temporelle des résultats positifs en culture nasale chez les génisses diagnostiquées excrétrices nasales de <i>M. bovis</i> dans les troupeaux A, B et D (n=22).....	45
Figure 4 : Comparaison des courbes de survie cumulées (selon la méthode de Kaplan-Meier) de la vitesse de survenue du 1 ^{er} cas séropositif entre les 4 troupeaux.....	49
Figure 5 : Comparaison des courbes de survie (selon la méthode de Kaplan-Meier) de la vitesse de survenue de la première séroconversion contre <i>M. bovis</i> chez les génisses dans les troupeaux.....	53

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ac : Anticorps

ACP : Amplification en chaine par polymérase

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ag : Antigène

BRS : Bovine respiratory syncytial

BVD : Bovine Viral Diarrhoea

Cfu : Colony forming units

CHUV : Centre hospitalier universitaire vétérinaire

DO : Densité optique

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

ICE : Integrative conjugative elements

ID : Numéro d'identification

INSA : Institut national de santé animale

Ltée : Limitée

Max : Maximum

Min : Minimum

NAHMS : National Animal Health Monitoring System

Nbre : Nombre

PBS : Phosphate buffered saline

PI3 : Parainfluenza type 3

PPLO : Pleuropneumonia-like organism

Je dédie ce mémoire à ma famille

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, David Francoz, pour m'avoir donné la chance de travailler sur ce projet et pour son encadrement rigoureux.

Je remercie également mon codirecteur de recherche, Gilles Fecteau pour son encouragement et ses conseils.

Merci aux membres de mon comité-conseil et aux membres du jury d'évaluation de ce travail.

Merci à Olivia Labrecque, Geneviève Côté et Jean-Philippe Roy pour leur collaboration au projet.

Merci à Guy Beauchamp pour son aide avec les statistiques.

Merci à Julie Arsenault pour ses conseils en épidémiologie.

Merci aux techniciens de la Faculté de médecine vétérinaire.

Merci au Programme de soutien à l'innovation en agroalimentaire du Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec pour la contribution financière.

INTRODUCTION

En Amérique du Nord, qui est indemne de pleuropneumonie contagieuse bovine (causée par *M. mycoides mycoides* de type petite colonie), *Mycoplasma bovis* est le plus pathogène des mycoplasmes retrouvés chez les bovins. Il a été isolé pour la première fois aux États-Unis en 1961 à partir d'un cas sévère de mammite (Hale, Helmboldt et al. 1962). *Mycoplasma bovis* est principalement connu pour sa contribution à la pneumonie enzootique du veau (Bryson 1985; Maeda, Shibahara et al. 2003), à la mammite (Hale, Helmboldt et al. 1962), à l'arthrite septique des jeunes bovins (Wilson, Skirpstunas et al. 2007) et à l'otite moyenne/interne des veaux (Maeda, Shibahara et al. 2003; Francoz, Fecteau et al. 2004). Il est à l'origine d'énormes pertes économiques dans le monde. Aux États-Unis, l'industrie laitière subirait 108 \$ millions de pertes chaque année à cause des mammites à *M. bovis* (Rosengarten 1999). *Mycoplasma bovis* est une bactérie aux caractéristiques très particulières d'où sa virulence, les difficultés à la diagnostiquer, à la traiter et à fabriquer un vaccin efficace. Sa prévalence dans les troupeaux laitiers au Québec est encore méconnue. C'est pourquoi il est devenu nécessaire de connaître les mécanismes de transmission de l'infection dans les troupeaux. Une meilleure connaissance du modèle de transmission permettrait tout au moins de limiter la propagation de *M. bovis* parmi les animaux.

L'objectif principal de ce projet était l'étude de la dynamique de transmission et la réponse sérologique à *M. bovis* chez les génisses de moins de 7 mois d'âge dans 4 troupeaux de bovins laitiers au Québec. Secondairement, la concordance du statut mères/génisses pour les résultats bactériologiques et les résultats sérologiques et la concordance du statut séroconversion/excrétion nasale des génisses a été évaluée. Finalement, le patron de l'excrétion nasale de *M. bovis* a été décrit.

Les résultats de cette étude permettent de décrire la dynamique de transmission de *M. bovis* dans les troupeaux laitiers et d'évaluer l'importance des sources de contamination des génisses de remplacement.

RECENSION DE LA LITTÉRATURE

Les mollicutes sont des microorganismes de très petite taille; ils mesurent entre 0,15 et 0,8 μm (Genre *Mycoplasma* et *Ureaplasma* < 0,45 μm). Ces bactéries ont été nommées ainsi (du latin *mollis*, mou; *cutis*, peau), car elles sont dépourvues de paroi cellulaire (Arcangioli, Duet et al. 2008).

Les mycoplasmes appartiennent à la classe des mollicutes, ils sont retrouvés chez l'Homme et l'animal. Plus de cent espèces sont connues chez les animaux (Le Grand, Bézille et al. 2002). Dans le genre *Mycoplasma*, les mycoplasmes les plus pathogènes sont *M. synoviae* et *M. gallisepticum* chez les poules, *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* et *M. hyosynoviae* chez les porcs et *M. mycoïdes mycoïdes* de type petite colonie et *M. bovis* chez les bovins.

1. Caractéristiques et pouvoir pathogène de *M. bovis*

L'absence de paroi, la variabilité antigénique, et la capacité à former un biofilm font de *M. bovis* un agent pathogène capable de résister dans les milieux les plus hostiles. En culture, *M. bovis* se présente en colonies de formes caractéristiques dites en « œuf sur le plat » (Figure 1).

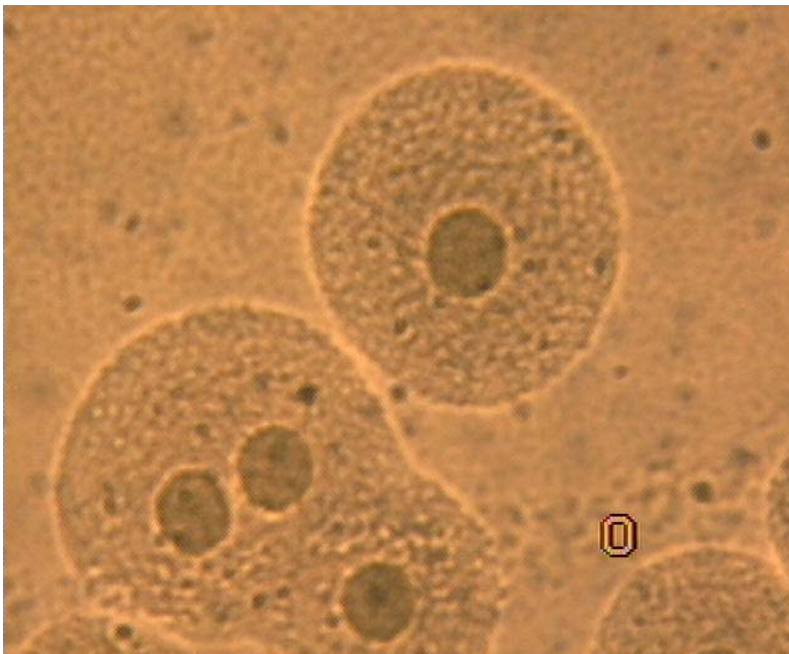


Figure 1 :
Colonies de *M. bovis* vues au microscope (grossissement 40 X.)

1.1. Absence de paroi

L'absence de paroi des mycoplasmes leur confère une résistance naturelle aux antibiotiques dont le mode d'action repose sur l'inhibition de la biosynthèse de celle-ci: les bêta-lactamines (Le Grand et Arcangioli 2008).

L'absence de paroi cellulaire a une autre conséquence sur le diagnostic de laboratoire de *M. bovis*, puisque la bactérie ne prend pas la coloration de Gram, néanmoins d'autres colorations peuvent être utilisées comme la coloration de Romanowski.

1.2. Taille du génome

Le génome de *M. bovis* est de taille réduite. Il est constitué de 600 à 1000 gènes, soit environ le quart du génome de la souche d'*Escherichia coli* (Le Grand et Arcangioli 2008). En raison de ce génome de petite taille et de leur métabolisme très limité les mycoplasmes ont besoin de puiser les substances nécessaires à leur survie chez la cellule hôte (Rosengarten, Citti et al. 2000; Maunsell et Donovan 2009). Leur croissance est lente (jusqu'à 7 jours) et nécessite des milieux de culture spécifiques, d'où la difficulté de diagnostic au laboratoire. La culture et l'identification à l'espèce de *M. bovis* par techniques immunohistochimiques ou par séquençage génétique ne se font pas dans les laboratoires de routine.

1.3. Variations des antigènes de surface

Mycoplasma bovis contient une série de lipoprotéines de surface dont la taille et l'expression sont très variables (Le Grand, Solsona et al. 1996). Les variations d'expression de ces antigènes de surface (Vsp, variable protein surface) se produisent à une fréquence élevée (Rosengarten, Behrens et al. 1994). Ce mécanisme original dans le monde bactérien pourrait expliquer pourquoi un tel agent infectieux peut persister en échappant à la réponse immunitaire et en s'adaptant rapidement aux changements micro-environnementaux rencontrés dans l'organisme de l'hôte (Citti et Rosengarten 1997). L'hypervariabilité des antigènes de surface de *M. bovis* a donc pour conséquence la difficulté pour

l'organisme de l'hôte à éliminer le microorganisme (Wiggins, Woolums et al. 2011).

Ce phénomène a d'autres conséquences comme la difficulté à fabriquer des vaccins efficaces et à élaborer des tests sérologiques ou immunohistochimiques fiables (Poumarat, Solsona et al. 1994).

1.4. Transfert de gènes

Le transfert de matériel génétique entre les bactéries inter ou intraespèce est un phénomène courant en bactériologie, et les mycoplasmes ne font pas exception à la règle.

L'analyse du génome de *Mycoplasma agalactiae* (qui appartient au groupe *hominis*) a montré que le cinquième de son patrimoine génétique appartient au génome des souches de mycoplasme du groupe *mycoïdes*. Or, *M. agalactiae* et les mycoplasmes du groupes *mycoïdes* vivent en promiscuité d'espace dans le conduit auditif externe des caprins. Ces ICE (integrative conjugative elements) voisines ont été identifiées chez plusieurs espèces de mycoplasmes partageant le même espace anatomique de l'organisme hôte (Sirand-Pugnet, Lartigue et al. 2007). Dans le même ordre d'idées, il existe chez certaines souches de *M. agalactiae* un élément génétique transférable que l'on retrouve chez *M. bovis* (Marenda, Barbe et al. 2006).

Ce phénomène implique d'importantes conséquences telles que l'adaptation à un nouvel hôte (*M. bovis* étant connu pour être spécifique seulement à l'espèce bovine), la colonisation de nouveaux sites anatomiques (*M. bovis* a été retrouvé sur certains sites anatomiques cités précédemment); (Sirand-Pugnet, Lartigue et al. 2007) ou encore l'induction de problèmes d'identification antigénique (ce qui se rajoute à la problématique de la fabrication de vaccin et des tests sérologiques).

1.5. Persistance

1.5.1. Formation de biofilms

En expérimentation, il a été démontré que *Mycoplasma bovis*, comme d'autres mycoplasmes (*M. agalactiae*, *M. putrefaciens*, *M. cottewii*, *M. yeatsii* et certaines souches de *M. mycoïdes mycoïdes* de type petite colonie) peut vivre isolé en cellule individuelle ou enchâssé dans un polymère qui peut adhérer à diverses surfaces inertes. Par ce mode d'organisation, il arriverait à survivre en résistant aux forces physiques (circulation sanguine, action de lavage de la salive), à l'action de la chaleur et à la dessiccation (McAuliffe, Ellis et al. 2006; McAuliffe, Ayling et al. 2008).

La formation de biofilms constitue donc un réservoir à travers lequel les mycoplasmes peuvent résister à l'immunité de l'hôte et persister en tant qu'infection chronique (Simmons et Dybvig 2009), ce qui expliquerait la problématique quant à l'éradication de l'infection des troupeaux et de l'organisme de l'hôte.

1.5.2. Persistance dans les milieux extérieurs

Bien que la taille du génome de *M. bovis* et son métabolisme soient très réduits, sa persistance dans les milieux extérieurs a été rapportée par plusieurs auteurs. Les données sur la survie de *M. bovis* à différentes températures et sur différents matériels sont présentées dans le tableau suivant :

Matériel	Température	Durée	Référence
Disque de papier sec	▶ 4°C	126 jours	(Nagatomo, Takegahara et al. 2001)
	▶ 30°C	28 jours	
Éponge et lait	▶ 4°C	2 mois	(Pfützner et Sachse 1996)
Bois et eau		Plus 2 semaines	
Paille		20 jours	

Tableau I : *Durée de survie de M. bovis dans le milieu extérieur.*

Inoculé sur des milieux liquides, *M. bovis* persiste entre 59 et 185 jours. Dans de telles conditions, les périodes de survie n'ont pas été influencées par les températures (4°C, 30°C, 37°C et à température ambiante); (Nagatomo, Takegahara et al. 2001).

Ces données montrent la capacité de survie de *M. bovis* et sa persistance dans l'environnement de l'animal.

1.6. Sensibilité aux antibiotiques

1.6.1. Antibiorésistance naturelle

Comme il a été mentionné précédemment, *M. bovis* est une bactérie caractérisée par son absence de paroi cellulaire, ce qui la rend totalement insensible à l'action des bêta-lactamines (Le Grand et Arcangioli 2008). Sa résistance naturelle à l'érythromycine a également été rapportée (Hirose, Kobayashi et al. 2003; Francoz, Fortin et al. 2005). En plus, les mycoplasmes ne synthétisent pas l'acide folique, ce qui les rend insensibles à l'action des sulfonamides (Maunsell et Donovan 2009).

1.6.2. Sensibilité et antibiorésistance acquise

Plusieurs antibiotiques sont utilisés pour traiter les maladies associées à *M. bovis* : les fluoroquinolones (comme l'enrofloxacin, la marbofloxacin et la danofloxacin), le florfenicol, la spectinomycine, les macrolides (comme la tulathromycine, la tilmicosine et la tylosine) et les tétracyclines (comme l'oxytétracycline).

Actuellement, en Amérique du Nord, trois antibiotiques sont homologués pour le traitement des maladies respiratoires associées à *M. bovis* :

- Tulathromycine: Draxxin^R (Pfizer, Canada Inc., Kirkland, Québec, Canada).
- Gamithromycine: ZactranTM (Merial, Canada Inc., Baie d'Urfe, Québec, Canada).
- Florfenicole: Nuflor goldTM (Intervet/Schering-Plough Animal Health, Summitt, NJ).

Concernant la résistance de *M. bovis* aux antibiotiques, plusieurs études ont montré *in vitro* la résistance de la bactérie à l'égard de la tétracycline, la spectinomycine (Ayling, Baker et al. 2000; Francoz, Fortin et al. 2005; Gerchman, Levisohn et al. 2009) et la tilmicosine (Ayling, Baker et al. 2000; Gerchman, Levisohn et al. 2009).

Par ailleurs, des tests *in vitro* (en Irlande et au Québec) ont révélé la sensibilité de *M. bovis* à l'action de l'enrofloxacin par rapport aux autres antibiotiques utilisés (Ball, Craig Reilly et al. 1995; Francoz, Fortin et al. 2005). Alors que récemment, l'émergence de souches de *M. bovis* résistantes à l'enrofloxacin a été rapportée (Lysnyansky, Mikula et al. 2009).

Une étude a comparé la sensibilité du microorganisme à divers antibiotiques. La comparaison a concerné les animaux importés de différents pays par rapport aux animaux du cheptel local. Les auteurs ont conclu que la sensibilité de *M. bovis* à l'égard des antibiotiques variait selon l'origine des animaux, et ils ont souligné l'importance et la nécessité de déterminer la sensibilité de *M. bovis* aux antibiotiques dans le temps et selon la région géographique (Gerchman, Levisohn et al. 2009). Toutefois, en raison des particularités de *M. bovis* en culture, il n'est pas possible d'utiliser les techniques de routine de détermination de sensibilité aux antibiotiques et ces dernières sont donc réservées aux laboratoires spécialisés.

En conclusion, la résistance acquise de *M. bovis* aux antibiotiques est un problème en santé animale, car il pourrait induire l'émergence de souches de plus en plus résistantes aux antibiotiques.

2. Maladies associées à *M. bovis* et leur importance

Les affections à *M. bovis* sont répandues dans le monde entier. Des études sur ces affections sont rapportées en Europe et en Amérique du Nord, mais la prévalence est certainement sous-estimée, car le dépistage n'est pas effectué de façon systématique (Pfützner et Sachse 1996).

2.1. Les maladies respiratoires

Mycoplasma bovis est un agent qui joue un rôle significatif dans le complexe respiratoire bovin en aggravant la maladie et en augmentant le taux de morbidité et de mortalité (Gourlay, Thomas et al. 1989). Les infections respiratoires dues à *M. bovis* affectent principalement les jeunes veaux mais peuvent également toucher les vaches adultes (Arcangioli, Duet et al. 2008).

Les animaux infectés présentent de la toux, un écoulement nasal, un abattement et de la fièvre. À l'autopsie, les poumons peuvent présenter des degrés variés de consolidation et de lésion nécrotique. Un ou plusieurs lobes peuvent être atteints et une pleurésie fibrineuse ou fibreuse peut parfois s'installer (Arcangioli, Duet et al. 2008).

Les maladies respiratoires chez les jeunes animaux sont souvent associées aux arthrites et aux otites. Dans les troupeaux de bovins laitiers, *Mycoplasma* spp. et *Pasteurella multocida* ont été isolés dans 29 % des cas de pneumonies chez les génisses durant les 3 premiers mois de leurs vies, et *Mycoplasma* spp. a été isolé seule dans 7 % des cas (Virtala, Mechor et al. 1996). Une étude réalisée en France a montré le rôle de *M. bovis* dans le complexe de la maladie respiratoire chez les veaux à l'engraissement, où plusieurs virus ont été isolés comme le virus de la diarrhée bovine (BVD), le virus respiratoire syncytial bovin (BRS) et le virus para-influenza-3 (PI3), mais seul *M. bovis* a été le plus fréquemment isolé avec un taux de 60 % à 100 % (Arcangioli, Duet et al. 2008). Aux États-Unis, les pertes occasionnées par les maladies respiratoires associées à *M. bovis* pour l'industrie des veaux de boucherie sont estimées à 32 \$ millions par année (Nicholas, Ayling et al. 2002).

2.2. Les mammites

Les mammites à *M. bovis* atteignent principalement la vache laitière, mais elles peuvent également atteindre les génisses prépubères (Fox, Muller et al. 2008). L'animal peut présenter une mammite clinique ou devenir porteur asymptomatique pendant des mois (Byrne, Markey et al. 2005) ou des années

et agir comme réservoir de l'infection dans le troupeau (Pfützner et Sachse 1996).

Les infections mammaires causées par *M. bovis* ont habituellement la caractéristique de ne pas répondre aux traitements (Gonzalez et Sears 1994). L'infection cause une modification de l'aspect du lait et une induration du parenchyme mammaire. L'infection se transmet d'un quartier à un autre et la production de lait diminue considérablement et peut même cesser (Houlihan, Veenstra et al. 2007).

Aux États-Unis, une étude sur les bovins laitiers, rapportée par le National Animal Health Monitoring System (NAHMS; 2002), a indiqué que 7.9 % des 871 troupeaux laitiers testés étaient positifs aux mycoplasmes (par analyse du lait de réservoir) et *M. bovis* a été identifié spécifiquement dans 86 % des troupeaux positifs (Maunsell et Donovan 2009). Au Canada, à l'Île du Prince Edward, la prévalence dans le lait de réservoir était de 1,5 % pour *M. bovis* (Riekerink, Barkema et al. 2006). Au Québec, la prévalence des mycoplasmes dans le lait de réservoir a été rapportée de 4/117 (3,42 %) troupeaux laitiers (Bergeron, Francoz et al. 2010) et dans 2 de ces troupeaux (1,7 %) *M. bovis* a été isolé.

Dans les troupeaux infectés, le pourcentage des animaux atteints de mammite peut atteindre jusqu'à 70 % (Rosengarten 1999) et la perte de production moyenne est estimée à 6,4 kg de lait par jour et par vache (Le Grand, Poumarat et al. 1997). Aux États-Unis, les pertes occasionnées par les mammites dues à *M. bovis* sont estimées à 108 \$ millions par année (Rosengarten 1999).

2.3. Les arthrites septiques

L'arthrite septique due à *M. bovis* peut affecter aussi bien les veaux laitiers (Francoz, Fecteau et al. 2004) que les vaches laitières (Wilson, Skirpstunas et al. 2007).

Chez les jeunes animaux, les arthrites septiques apparaissent simultanément ou à la suite de problèmes respiratoires. Chez la vache laitière, l'arthrite septique est souvent associée aux mammites en phase de lactation. Elle est

souvent décrite comme une séquelle de la mammite (Wilson, Skirpstunas et al. 2007). Les arthrites à *M. bovis* ont la particularité d'infecter les tissus avoisinant l'articulation, induisant une arthrite ou une périarthrite nécrotique fibrino-suppurative plus ou moins associée à une ténosynovite.

Dans la littérature, les données quant à la prévalence et les pertes économiques occasionnées par les arthrites à *M. bovis* dans les élevages de bovins laitiers n'ont pas été rapportées.

2.4. Les otites chez les jeunes animaux

L'otite moyenne et/ou interne suppurative atteint les veaux de boucherie (Maeda, Shibahara et al. 2003) et les veaux laitiers (Francoz, Fecteau et al. 2004). Les animaux malades peuvent présenter une tête penchée, une ptose d'une ou des deux paupières, une ptose d'une ou des deux oreilles, de l'épiphora, et un écoulement purulent de l'oreille (Walz, Mullaney et al. 1997). Chez les jeunes animaux, l'otite moyenne et/ou interne peut être associée à une bronchopneumonie (Francoz, Fecteau et al. 2004).

Une étude réalisée au Japon entre 2000 et 2001 a rapporté une morbidité de 8 % à 40 % et une mortalité de 30 % à 100 %, où *M. bovis* était le principal agent incriminé. Il a été isolé dans le jetage nasal, le poumon, l'oreille, les nœuds lymphatiques craniaux et pulmonaires (Maeda, Shibahara et al. 2003).

En Californie, Lamm et al. (2004) ont noté une augmentation des cas d'otites à mycoplasme (dont *M. bovis*) chez les veaux laitiers pendant les 10 dernières années (Lamm, Munson et al. 2004). Dans les troupeaux laitiers, les otites moyennes peuvent atteindre 20 % du cheptel, où *M. bovis* a été isolé seul dans les naseaux et dans le conduit auditif (Foster, Naylor et al. 2009). Dans la littérature il n'y a pas études rapportant les pertes économiques occasionnées par les otites à *M. bovis* dans les troupeaux laitiers.

3. Méthodes de diagnostic

3.1. Diagnostic clinique

Les signes cliniques ne permettent pas un diagnostic définitif d'infection à *M. bovis* car ces derniers sont non spécifiques (Caswell et Archambault 2007). Un diagnostic de laboratoire est donc essentiel pour incriminer *M. bovis* comme l'agent pathogène (Justice-Allen, Trujillo et al. 2010). Il est toutefois recommandé d'investir dans la recherche de *M. bovis* quand on trouve l'association de plus d'une condition pathologique sur le même individu :

- Chez le jeune bovin: arthrite, otite moyenne et/ou pneumonie (Francoz, Fecteau et al. 2004).
- Chez la vache laitière : mammite, pneumonie et /ou arthrite (Le Grand, Poumarat et al. 1997; Houlihan, Veenstra et al. 2007; Wilson, Skirpstunas et al. 2007).

L'existence de plusieurs individus dans le même troupeau qui manifestent une ou plusieurs conditions pathologiques, citées précédemment, devrait également orienter vers la recherche de *M. bovis*.

La même démarche dans l'hypothèse de diagnostic doit être envisagée lorsqu'une réponse insuffisante ou absente au traitement est constatée chez des animaux présentant les maladies précitées.

3.2. Diagnostic de laboratoire

3.2.1. Modes d'échantillonnage

Les prélèvements peuvent se faire à partir de plusieurs sites sur l'animal vivant : sur les nasaux, la conjonctive et l'oreille (par écouvillonnage), la trachée (par lavage transtrachéal), les articulations (par aspiration du liquide synovial) et sur les poumons (par aspiration du liquide pleural). L'échantillonnage peut concerner également le lait individuel, le lait de réservoir et le sperme.

Sur l'animal mort, les prélèvements peuvent être effectués à partir des lésions du parenchyme pulmonaire, du tissu de la glande mammaire et du cerveau ainsi que du liquide articulaire.

Pour le diagnostic des infections pulmonaires, des études ont comparé l'écouvillonnage nasal au lavage bronchoalvéolaire pour déterminer laquelle des 2 techniques de prélèvement était prédictive de l'infection des poumons par *M. bovis* (Allen, Viel et al. 1991; Thomas, Dizier et al. 2002; Godinho, Sarasola et al. 2007).

Ces études réalisées sur des animaux atteints de maladies respiratoires ont conclu que l'écouvillonnage nasal n'était pas représentatif des mycoplasmes présents dans les voies respiratoires inférieures (Thomas, Dizier et al. 2002; Otagiri, Asai et al. 2005) et que cette technique de prélèvement doit être réservée pour l'évaluation du statut sanitaire à l'échelle du troupeau et non à l'échelle individuelle (Otagiri, Asai et al. 2005; Poulsen et McGuirk 2009).

En revanche, Godinho et al. (2007) ont montré que l'utilisation d'un écouvillonnage nasal profond peut prédire l'infection des voies respiratoires inférieures (Godinho, Sarasola et al. 2007). Ils décrivent ce mode d'échantillonnage comme étant plus facile à réaliser, moins stressant, moins invasif que le lavage bronchoalvéolaire, et est surtout recommandé lorsqu'un grand nombre d'animaux doit être prélevé ou lorsque les prélèvements sont répétitifs sur les mêmes animaux.

L'étude de Poulsen et al. (2009) a recommandé de faire un prélèvement profond des cavités nasales et d'utiliser une tige flexible contenant un milieu de culture de transport (BBL Culture Swab Plus, Benton Dickenson, Sparks, Maryland); (Poulsen et McGuirk 2009).

Concernant les prélèvements de lait, et en vue d'augmenter les chances d'isoler *M. bovis*, il est recommandé de récolter le lait dans des conditions aseptiques pour éviter toute contamination. Ensuite, les échantillons de lait doivent être réfrigérés avant la mise en culture. Dans le cas où la conservation des échantillons de lait doit dépasser 48 heures, il est recommandé de les conserver à une température égale ou inférieure à moins 30°C afin d'assurer la viabilité des mycoplasmes (Gonzalez et Wilson 2003).

3.2.2. Mise en évidence directe de *M. bovis*

3.2.2.1. Mise en culture et identification à l'espèce

La mise en culture de *M. bovis* nécessite un milieu de culture spécifique comme le milieu de Hayflick et un temps d'incubation de 7 jours pour dire qu'une culture est négative (Arcangioli, Duet et al. 2008). Les cultures sont incubées dans une atmosphère enrichie en dioxyde de carbone (Gagea, Bateman et al. 2006a). Les colonies de mycoplasmes sont identifiées grâce à leurs formes caractéristiques dites "en œuf sur le plat" (Voir figure 1). L'identification à l'espèce peut alors se faire avec le test d'immunofluorescence directe (Gagea, Bateman et al. 2006b) ou par ACP (amplification en chaîne par polymérase). Cette méthode de diagnostic a le désavantage d'être exigeante en temps.

3.2.2.2. Détection de l'ADN

La détection des fragments d'ADN du mycoplasme est possible par la technique ACP. Cette méthode de diagnostic est très spécifique et permet le diagnostic de la bactérie à partir d'infimes quantités d'isolats (100 cfu/ml de lait); (Sachse, Salam et al. 2010). Lorsque réalisée directement sur l'échantillon (lait, jetage nasal), la technique ACP ne nécessite que quelques heures (Fox, Kirk et al. 2005) comparativement à la méthode de mise en culture. En revanche la technique ACP ne permet pas de distinguer entre un microorganisme viable d'un autre non viable, car elle ne renseigne que sur l'existence de l'ADN dans l'échantillon, ce qui remet en cause son utilité à dépister l'agent responsable d'une maladie. Dernièrement, la technique ACP en temps réel s'est avérée très spécifique et encore plus sensible que la technique ACP classique (Cai, Bell-Rogers et al. 2005; Sachse, Salam et al. 2010).

3.2.2.3. Immunohistochimie

Isoler *M. bovis* dans les tissus comme les poumons n'est pas toujours facile, surtout quand l'infection est chronique. Dans ce cas, la coloration immunohistochimique est utile, elle permet de visualiser les antigènes de *M.*

bovis dans les tissus affectés, en plus de cela, le problème du transport et de la conservation des échantillons ne se pose pas.

3.2.3. Mise en évidence indirecte de *M. bovis*

La détection des anticorps contre *M. bovis* peut se faire dans le sang comme dans le lait. Pour l'analyse sérologique, plusieurs trousse de test ELISA sont commercialisées de par le monde (Biovet, Canada; Bommelli, Suisse); (Nicholas et Ayling 2003). La variabilité antigénique de *M. bovis* pose le problème de pérennité de ces trousse et de leur représentativité antigénique. En effet, la variation d'expression des antigènes de surface peut se produire d'une souche à une autre, mais également entre les cellules issues d'une même cellule mère (Poumarat, Solsona et al. 1994). En plus, la détection d'anticorps dans le sang n'indique pas si l'exposition de l'animal au mycoplasme est récente ou ancienne, car les anticorps peuvent persister durant des mois, et donc ce test n'est pas utile lors de diagnostic clinique à l'échelle individuelle (Fox, Kirk et al. 2005). Cette méthode est mieux adaptée pour une surveillance épidémiologique ou pendant la mise en quarantaine (Rosendal et Martin 1986) et s'appliquerait mieux aux animaux plus âgés qui n'ont pas d'anticorps maternels qui pourraient fausser le diagnostic (Nicholas et Ayling 2003).

Quant à la recherche des anticorps dans un prélèvement de lait, cette technique pourrait être compromise si l'échantillon est contaminé par d'autres bactéries ou s'il y a présence d'antibiotique dans l'échantillon (Blackburn, Brooks et al. 2008). Néanmoins, elle permet un diagnostic de l'infection mammaire par les mycoplasmes à l'échelle individuelle (Fox, Kirk et al. 2005).

4. Les facteurs de risque

4.1. Introduction de nouveaux animaux

Plusieurs études sur les facteurs de risque et la prévalence de *M. bovis* dans les troupeaux laitiers ont rapporté que l'introduction de nouveaux animaux était un facteur de risque majeur de transmission de l'infection entre les troupeaux

(Pfützner et Sachse 1996; Burnens, Bonnemain et al. 1999; Houlihan, Veenstra et al. 2007). Une étude épidémiologique sur la séroprévalence de *M. bovis* réalisée entre 1995 et 1997 en Suisse dans la région du Canton du Jura a montré que dans les 51 troupeaux laitiers testés, 13,4 % des animaux se sont révélés positifs. Les auteurs de cette étude ont conclu après une analyse des facteurs de risque possibles que l'achat de nouveaux animaux était associé à l'augmentation de la séroprévalence à *M. bovis* dans un troupeau (Burnens, Bonnemain et al. 1999).

Les animaux nouvellement introduits peuvent contaminer les autres animaux dans le troupeau par les sécrétions des voies respiratoires supérieures, les sécrétions vaginales, le colostrum ou le lait lors de la traite (Fox, Kirk et al. 2005).

4.2. Alimentation des veaux avec du lait contaminé

Pour des raisons économiques, le lait contaminé est souvent utilisé dans l'alimentation des veaux, ce qui constitue une autre voie majeure de transmission de *M. bovis* par le lait provenant de vaches malades et excrétaant la bactérie par les mamelles (Walz, Mullaney et al. 1997).

Plusieurs épizooties d'otites moyennes (Walz, Mullaney et al. 1997), d'arthrites et de pneumonies (Butler, Sickles et al. 2000) ont été rapportées dans les troupeaux laitiers chez des veaux qui ont été nourris avec du lait contaminé.

Bennett et Jasper (1977) ont conclu dans leur étude réalisée sur des troupeaux laitiers que les jeunes animaux nourris avec du lait infecté à *M. bovis* avaient une prévalence dans le jetage nasal de 34 % comparée à 6 % chez les animaux nourris avec du lait non contaminé (Bennett et Jasper 1977). Butler et al. (2000) ont étudié l'effet thermique sur les mycoplasmes dans le lait des vaches avec des mammites cliniques. Le cas s'est présenté quand une épidémie de pneumonie et d'arthrite est apparue chez des veaux nourris avec du lait provenant de vaches malades bien que le lait était préalablement pasteurisé à 65°C pendant une heure. Il faut préciser que le lait utilisé dans ce cas n'était pas acidifié, ce qui aurait pu réduire la viabilité des mycoplasmes

(Tola, Angioi et al. 1997). Seule une température de 70°C a permis d'inactiver *M. bovis* et *Mycoplasma californicum* en une minute alors que *Mycoplasma canadense* a été inactivée après 3 minutes (Butler, Sickles et al. 2000). Par ailleurs, des maladies sont apparues dans des troupeaux qui nourrissaient les veaux avec du lait pasteurisé ou avec du lait de remplacement (Lamm, Munson et al. 2004). Cela laisse penser que même si l'alimentation avec du lait contaminé est une source majeure de contamination des jeunes animaux ce n'est pas une source unique de contamination et qu'il existe certainement d'autres sources d'infection.

4.3. La taille du troupeau

Plusieurs auteurs ont supporté l'hypothèse que la taille du troupeau était un facteur de risque important dans l'apparition des mammites à *M. bovis* dans les troupeaux laitiers (Pfützner et Sachse 1996; Wilson, Goodell et al. 2009).

Dans le NAHMS (2002), la prévalence de *M. bovis* dans le lait de réservoir a indiqué que la taille du troupeau était un facteur de risque. En effet, plus le nombre d'animaux dans un troupeau augmentait, plus la prévalence de *M. bovis* augmentait. Dans les troupeaux qui comptaient plus de 500 animaux, 21,7 % étaient positifs, les troupeaux entre 100 à 400 animaux, 3,9 % étaient positifs et les troupeaux qui comptaient moins de 100 animaux, 2,1 % étaient positifs (Maunsell et Donovan 2009). Par ailleurs, le taux de mammites à *M. bovis* est plus élevé dans les grands troupeaux, alors que dans les troupeaux plus petits ce sont les pneumonies et les arthrites chez les jeunes animaux qui prédominent (Pfützner et Sachse 1996).

4.4. Les facteurs environnementaux

Woldehiwet et al. (1990) ont étudié l'effet de la température et de l'humidité sur la colonisation des nasaux et de la trachée par des mycoplasmes. Les changements brusques de température de tiède à froid (de 17°C à 5°C) ont eu pour conséquence l'augmentation de la quantité du jetage nasal. D'autres parts, les animaux vivants dans des températures basses (5°C) ont montré une plus grande quantité de jetage nasal par rapport aux animaux vivants à des

températures plus confortables (17°C); (Woldehiwet, Mamache et al. 1990). Bien que cette étude n'ait pas concerné *M. bovis*, il serait logique de penser que plus la quantité de jetage nasal (qui constitue un vecteur pour le mycoplasme) augmentait et plus la dissémination du microorganisme serait favorisée ce qui faciliterait la transmission du mycoplasme.

En conclusion, la température serait un facteur de risque favorisant la dissémination de l'infection au sein des troupeaux, mais aucune étude épidémiologique n'a été effectuée pour évaluer le rapport entre la température ou la saison et la prévalence des maladies associées à *M. bovis*.

4.5. La gestion du logement

La gestion du logement est aussi importante dans le développement des maladies associées à *M. bovis* au sein d'un troupeau. En effet, plusieurs auteurs ont rapporté que les mauvaises conditions d'hygiène (Fox, Hancock et al. 2003) et plus spécifiquement lors de la traite (Wilson, Skirpstunas et al. 2007) et les mauvaises conditions de logement (Hewicker-Trautwein, Feldmann et al. 2002) sont des facteurs qui peuvent favoriser la dissémination de l'infection à l'intérieur d'un troupeau.

4.6. L'association avec d'autres microorganismes

Mycoplasma bovis peut agir comme agent pathogène initiateur (Arcangioli, Duet et al. 2008; Foster, Naylor et al. 2009; Caswell, Bateman et al. 2010) ou comme opportuniste suite à une infection par un virus et/ou une bactérie. En effet, *M. bovis* a été isolé seul (Foster, Naylor et al. 2009) ou en association avec d'autres microorganismes pathogènes dont les plus importants sont le virus respiratoire syncytial bovin (Arcangioli, Duet et al. 2008), le virus para influenza 3 (Arcangioli, Duet et al. 2008), le virus de la diarrhée virale bovine (Shahriar, Clark et al. 2002), *Pasteurella multocida* (Binder, Amtsberg et al. 1990), *Mannheimia haemolytica* (Arcangioli, Duet et al. 2008), *Arcanobacterium pyogène* (Binder, Amtsberg et al. 1990), *Histophilus somni* (Shahriar, Clark et al. 2002), *Ureaplasma diversum* (Knudtson, Reed et al. 1986) et d'autres mycoplasmes (Binder, Amtsberg et al. 1990). L'interaction entre *M. bovis* et les

autres agents infectieux n'a été que peu étudiée. Le synergisme entre *M. bovis* et le virus de la diarrhée virale bovine a été rapporté par l'étude de Shahriar et ses collègues (2002). En effet, le virus de la diarrhée bovine cause une immunosuppression chez l'hôte qui le prédisposerait à l'infection par *M. bovis* (Shahriar, Clark et al. 2002). En revanche, une autre étude publiée plus récemment a montré que l'infection par le virus de la diarrhée virale bovine ne prédisposait pas préférentiellement aux pneumonies dues à *M. bovis* (Gagea, Bateman et al. 2006a). Par ailleurs, le synergisme entre *M. bovis* et *M. haemolytica* a été démontré (Houghton et Gourlay 1983).

Concernant les maladies respiratoires, l'infection par *M. bovis* viendrait prédisposer l'appareil respiratoire à l'infection par d'autres agents infectieux (Gagea, Bateman et al. 2006a), et inversement l'infection par les virus cités précédemment pourrait prédisposer à l'infection par *M. bovis*. Les virus viendraient endommager les tissus de l'appareil respiratoire tout en diminuant leur activité sécrétoire et leurs défenses immunitaires (Ames 1997).

4.7. Les facteurs liés à l'individu

Dans la littérature, plusieurs facteurs de risque associés à la dissémination de *M. bovis* dans les troupeaux sont des facteurs liés à l'individu.

En général, l'état de santé de l'animal détermine sa vulnérabilité ou sa résistance aux maladies. Dans les maladies respiratoires, *M. bovis* n'a été que rarement isolé des cavités nasales des jeunes animaux sains (6 %, 3 %) (Bennett et Jasper 1977; ter Laak, Noordergraaf et al. 1992), alors que chez les jeunes animaux malades la prévalence du portage nasal peut atteindre 34 %, 70 % et 91,4 % (Bennett et Jasper 1977; Stipkovits, Ripley et al. 2000; Maunsell, Donovan et al. 2009).

L'âge de l'animal est aussi un facteur de risque. On sait que le système immunitaire chez le jeune animal, et cela dès la naissance, est en phase de maturation (Foote, Nonnecke et al. 2005); c'est à cet âge que l'animal est le plus prédisposé à l'invasion par des agents infectieux, dont *M. bovis*. La colonisation par *M. bovis* des cavités nasales chez les animaux atteints de

maladies respiratoires débute dès la première semaine après la naissance et entre 3 à 3,5 semaines d'âge, elle peut atteindre entre 70 % à 91,4 % des animaux (Stipkovits, Ripley et al. 2000; Maunsell, Donovan et al. 2009).

5. Les modes de transmission

Lorsque *M. bovis* est introduit dans un troupeau, il peut se transmettre directement d'un animal à un autre ou indirectement par le contact avec du matériel infecté. Le contact direct se fait à travers les sécrétions qu'elles soient d'origine respiratoire, vaginale ou par le lait.

5.1. Transmission directe

Chez l'animal infecté, *M. bovis* a un tropisme tissulaire varié. Il est habituellement isolé à partir des muqueuses des voies respiratoires, urogénitales et gastro-intestinales (Rosengarten, Citti et al. 2000), et dans les sécrétions des glandes mammaires (Fox, Kirk et al. 2005). *Mycoplasma bovis* a également été isolé des sécrétions vaginales, du sperme et de la conjonctive chez des animaux qui ne présentaient aucun signe de maladie (Pfützner et Sachse 1996). La prévalence nasale de *M. bovis* peut atteindre 34 % dans les troupeaux avec des problèmes respiratoires chez les moins de 8 mois d'âge, comparée à 6 % chez des troupeaux où les animaux ne présentent aucun signe clinique de maladies respiratoires. Les animaux pourraient rester porteurs sains pendant des mois, voir des années et constituer ainsi un réservoir à partir duquel l'infection se propage aux autres animaux (Bennett et Jasper 1977).

Par ailleurs, il a été démontré que les amygdales constituaient un réservoir pour le mycoplasme à partir duquel il peut réapparaître dans le jetage nasal et ainsi se transmettre à d'autres animaux (Maunsell 2007). Des cas de mammites ont été diagnostiqués chez des génisses prépubères à six mois d'âge (séparées de leurs mères 1 heure après le vêlage) dans deux troupeaux voisins dans l'état de Washington aux États-Unis. *Mycoplasma bovis* a été isolé à partir de sécrétions lactées et d'échantillons de tissus prélevés après la nécropsie. Des analyses de laboratoire ont confirmé l'infection chez les mères et les autres membres du troupeau par les mêmes souches de *M. bovis*. Une transmission

verticale avec dissémination hémotogène est suggérée dans ce premier rapport d'infections intramammaires à *M. bovis* chez des génisses prépubères (Fox, Muller et al. 2008).

Quel que soit le mode de transmission dans un troupeau, qu'il soit direct (jetage nasal, lait, sécrétions vaginales) ou indirect (par le matériel, le personnel ou les surfaces de contact), les animaux infectés peuvent excréter le germe par les voies respiratoires supérieures ce qui a pour conséquence la contamination des autres animaux dans le troupeau. Étant donné que dans les troupeaux laitiers les génisses nées dans l'élevage sont maintenues pour remplacer les vaches adultes réformées; cela poserait la problématique de l'éradication de l'infection de ces élevages (Bennett et Jasper 1977).

5.2. Transmission indirecte

Comme il a été mentionné précédemment, *M. bovis* est un microorganisme qui a la capacité de persister dans l'environnement, augmentant ainsi son pouvoir de dissémination.

Mycoplasma bovis a été isolé dans le matériel de traite ce qui constitue un facteur de transmission de mamelle à mamelle lors de la traite. Le traitement des mammites peut aussi être un facteur de risque lorsque les règles d'hygiène ne sont pas respectées (Gonzalez et Wilson 2003).

Un veau a un risque plus élevé d'être porteur de *M. bovis* et de développer une maladie associée lorsqu'il est logé dans une stalle où avant il y avait un animal infecté; ou lorsqu'il est logé dans une stalle avoisinant une stalle d'un animal infecté (Maunsell et Cohan 2009).

L'environnement est contaminé par les sécrétions nasales des animaux excréant *M. bovis* par les nasaux. *Mycoplasma bovis* a été également isolé dans les cellules épithéliales des reins (Maeda, Shibahara et al. 2003), ce qui ajoute un autre facteur de contamination de l'environnement par l'urine.

5.3. Transmission par voie hémotogène ou lymphatique

La transmission de *M. bovis* à l'intérieur de l'organisme de l'animal pourrait se produire par voie hémotogène ou lymphatique, ce qui permettrait au mycoplasme de se transmettre soit de la mamelle à d'autres sites (Bennett et Jasper 1980; Fox, Muller et al. 2008), soit des sites extramammaires à la mamelle (Fox, Muller et al. 2008).

Effectivement, l'inoculation expérimentale de *M. bovis* a permis de démontrer la transmission du mycoplasme d'un quartier à un autre et sa persistance dans les mamelles (Byrne, Markey et al. 2005). Le quartier inoculé avec *M. bovis* est devenu distendu et sensible au toucher après 24 à 72 heures, et en 5 à 10 jours l'infection s'est transmise aux autres quartiers alors que les quartiers étaient traités avec des systèmes de traite différents. L'infection a persisté aux lactations suivantes (Byrne, Markey et al. 2005).

6. Prévention et contrôle

6.1. Métaphylaxie

L'utilisation des antibiotiques dans le lait de remplacement chez les veaux peut réduire l'incidence des maladies associées à *M. bovis* dans les troupeaux laitiers (Berge, Lindeque et al. 2005).

Une étude européenne a montré que l'utilisation du Valnemulin dans le lait à partir du 4^{ème} jour jusqu'à l'âge de 3 semaines était efficace pour réduire l'impact des maladies associées à *M. bovis* dans les troupeaux (Stipkovits, Ripley et al. 2001).

La même démarche prophylactique serait bénéfique chez les animaux adultes. En effet, Nagatomo et al. (1996) ont pu démontrer que le traitement préventif avec la leucomycine peut retarder l'apparition des signes cliniques des maladies respiratoires jusqu'à 248 jours après l'introduction des animaux dans un établissement d'élevage infecté par *M. bovis* et aucune mortalité n'a été enregistrée chez ce groupe d'animaux. Alors que chez les animaux qui n'ont reçu aucune médication le taux de mortalité a atteint 41 % entre le 14^{ème} et le

63^{ème} jour après l'introduction des animaux dans cet établissement d'élevage (Nagatomo, Shimizu et al. 1996).

En conclusion, le traitement préventif en milieu infecté serait justifié pour réduire la mortalité et la morbidité dans les troupeaux avec un historique de maladies associées à *M. bovis*, mais pour être efficace cette démarche doit débiter le plus tôt dans la vie de l'animal (Maunsell et Donovan 2009).

6.2. Vaccination

Aux États-Unis, un vaccin est actuellement homologué pour réduire la sévérité et la durée des mammites à *M. bovis* chez le bovin laitier (Mycomune ; Biomune, Lenexa, Kansas). Trois autres vaccins sont homologués pour prévenir les maladies respiratoires associées à *M. bovis*. Le premier vaccin (Myco-B Bac ; Texas Vet. Labs, Inc., San Angelo, Texas) est destiné aux veaux à l'engraissement. Le deuxième, (Pulmo-Guard MbP; Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., St Joseph, Missouri) vise les bovins à partir de l'âge de 45 jours. Enfin, le troisième vaccin (Mycomune R; Biomune, Lenexa, Kansas) a été homologué pour l'utilisation chez les veaux à partir de l'âge de 3 semaines (Maunsell et Donovan 2009).

Concernant l'efficacité de ces vaccins à prévenir ou à réduire les infections contre lesquelles ils ont été fabriqués; des études sur les jeunes bovins infectés naturellement ont été réalisées aux États-Unis. La première, réalisée chez les génisses, a montré qu'il y avait une augmentation de cas d'otites moyennes et une absence d'efficacité du vaccin à prévenir les maladies associées à *M. bovis* (Maunsell et Donovan 2009). La deuxième étude, réalisée chez les veaux de boucherie a montré que la vaccination n'a pas permis la réduction de la colonisation des voies respiratoires supérieures par *M. bovis* (Soehnlén, Aydin et al. 2011).

En expérimentation, une étude sur la vaccination de jeunes animaux inoculés avec *M. bovis* a permis d'augmenter l'immunité de ces animaux contre les maladies respiratoires sans observation d'effets indésirables (Nicholas, Ayling et al. 2002).

Concernant la vaccination des vaches laitières, une étude a rapporté que la vaccination contre *M. bovis* à la fin de la gestation augmentait la concentration des immunoglobulines (IgG1) dans le sang et dans le colostrum, mais pas dans le lait. Par contre, l'ingestion de colostrum par les veaux ne garantissait pas la protection contre l'infection à *M. bovis* (Calloway, Schultz et al. 2008).

Dans la littérature, il n'y a pas encore de données qui ont rapporté l'efficacité de ces vaccins dans les troupeaux naturellement infectés. Les seules données rapportées à ce jour ont montré que ces vaccins ne préviennent pas et ne réduisent pas la colonisation des voies respiratoires supérieures par *M. bovis* (Soehnen, Aydin et al. 2011) et qui par ailleurs peuvent provoquer des effets indésirables (Maunsell et Donovan 2009).

En plus, comme on l'a mentionné précédemment, la variabilité des antigènes de surface de *M. bovis* viendrait se rajouter à la problématique de développer un vaccin efficace chez les génisses de remplacement. Pour pallier à ce problème, certains laboratoires ont proposé de fabriquer des vaccins à partir des souches spécifiques à chaque élevage, ce qu'on appelle un autovaccin.

6.3. Conduite d'élevage

En raison du pouvoir pathogène de *M. bovis*, de la complexité de son diagnostic, de sa thérapie et de sa prophylaxie, il devient primordial d'optimiser la prévention de ces infections par le respect des règles d'hygiène et par une bonne conduite d'élevage (Thomas, Dizier et al. 2003).

Maunsell et Donovan (2009) ont proposé des recommandations concernant la gestion des troupeaux pour contrôler les maladies associées à *M. bovis* qui se résument comme suit :

- Pasteurisation adéquate du lait ou utilisation d'un lait de remplacement.
- Pasteurisation du colostrum.
- Assurer une bonne ventilation des bâtiments d'élevage.
- Respecter les normes d'élevage concernant la densité.
- Isoler et traiter les animaux malades.

- Prévenir la transmission par la stérilisation de tout le matériel utilisé dans le bâtiment d'élevage.
- Veiller à ce que le personnel porte des gants pour manipuler les animaux malades et les animaux nouveaux nés et les changer entre chaque animal.
- Considérer la pratique du tout plein tout vide et éliminer du troupeau les animaux infectés les plus âgés et les plus jeunes dès que l'opportunité se présente pour réduire au maximum les pertes économiques.

MÉTHODOLOGIE

1. La population à l'étude

1.1. La sélection des troupeaux

Quatre troupeaux de bovins laitiers ont été sélectionnés suite à une enquête auprès des médecins vétérinaires pratiquant dans la région de la Faculté de médecine vétérinaire de Saint-Hyacinthe et dans les fiches signalétiques du réseau de surveillance de l'institut national de santé animale (INSA).

Pour être sélectionné, chaque troupeau devait répondre aux critères suivants :

- Dans les 6 mois précédents le début de l'étude, un diagnostic d'infection mammaire ou respiratoire à *M. bovis* chez plus d'un sujet confirmé par culture bactériologique devait être établi dans le troupeau. Les tests diagnostiques ont été effectués au laboratoire d'épidémiologie-surveillance animale à Saint-Hyacinthe (LÉAQ) du ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) ou au Centre hospitalier universitaire vétérinaire de Saint-Hyacinthe.
- Selon le médecin vétérinaire chargé du suivi du troupeau ou bien selon l'éleveur, le troupeau devait enregistrer une morbidité élevée au moment de son inclusion dans l'étude.
- Pour pouvoir étudier les données du troupeau, un logiciel de santé animale (par exemple le dossier santé animale) devait être utilisé pour la gestion du troupeau.
- Le troupeau devait être situé à une distance n'excédant pas 60 km par rapport au laboratoire (LÉAQ) où les analyses seraient effectuées, ce qui permettrait d'acheminer les prélèvements le jour même de la récolte.

1.2. La sélection des animaux

1.2.1. Sélection des génisses

Dans chaque troupeau et à chaque visite, de 1 à 5 génisses ont été incluses dans l'étude au fur et à mesure des naissances pour atteindre 20 génisses par troupeau. S'il arrivait qu'il y'ait plus de 5 naissances, alors on sélectionnait 5

génisses au hasard. Les génisses devaient être âgées de quelques heures à 30 jours.

Si une génisse venait à mourir avant d'atteindre l'âge de 3 mois, elle était automatiquement remplacée par un nouveau couple génisse/mère.

1.2.2. Sélection des vaches adultes

Les vaches adultes qui sont les mères de chacune des génisses ont également été enrôlées dans l'étude au fur et à mesure de la naissance de leurs génisses, pour atteindre 20 vaches adultes par troupeau.

2. Le questionnaire

Dans chaque troupeau, un questionnaire a été rempli conjointement par le propriétaire du troupeau et le médecin vétérinaire chargé du suivi du troupeau. Le questionnaire a été en partie tiré des questionnaires réalisés lors d'études sur les problèmes respiratoires au Québec et sur *Neospora caninum*, la diarrhée virale bovine et la leucose dans les autres provinces canadiennes.

On retrouve en annexe le questionnaire intitulé "Évaluation des facteurs de risques associés à la présence et à la dissémination de *M. bovis* dans les troupeaux laitiers québécois" (Annexe III).

3. Les prélèvements

3.1. Nature et mode de prélèvement

3.1.1. Prise de sang chez les génisses et chez les vaches adultes

Un prélèvement sanguin était effectué à partir de la veine jugulaire chez les animaux âgés de moins de 7 mois, et à partir de la veine coccygienne chez les animaux âgés de plus de 7 mois. Le sang était récolté sous vide dans un vacutainer de 10 ml BD Vacutainer^R (Becton, Dickinson and company, Franklin Lakes, NJ USA).

3.1.2. Écouvillon nasal chez les génisses et chez les vaches adultes

Un écouvillon nasal flexible mesurant 14 cm de long est introduit profondément dans la cavité nasale des 2 narines de façon successive. Il était ensuite

conservé dans un milieu de culture Stuart (BBL™ Culture Swab, Becton, Dickinson and company, Le pont de Claix, France).

3.1.3. Prélèvement de lait chez les vaches adultes

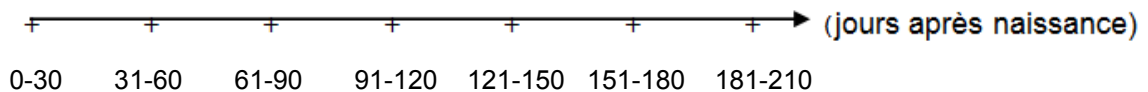
Après désinfection des 4 trayons avec une gaze imbibée d'alcool à 70%, les premiers jets de lait étaient éliminés et le lait était ensuite récolté à partir des 4 quartiers dans un tube stérile en plastique de 10 ml.

3.1.4. Prélèvement du lait de réservoir

Le lait dans le réservoir était agité durant 10 min, par la suite un échantillon de lait était prélevé à l'aide d'un tube stérile connecté à une seringue stérile, le lait était conservé dans un tube stérile de 10 ml.

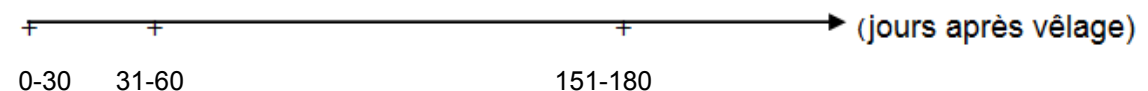
3.2. Séquence des prélèvements

3.2.1. Chez les génisses :



Une prise de sang et un écouvillon nasal ont été prélevés à chaque visite de la naissance au 7^{ème} mois d'âge à une fréquence d'une visite par mois.

3.2.2. Chez les vaches :



Un échantillon de sang, un écouvillon nasal et un prélèvement de lait ont été récoltés à chaque visite (1^{ère} visite entre 0 et 30^{ème} jour, 2^{ème} visite entre 31 et 60^{ème} jour et la 3^{ème} visite entre 151 et 180^{ème} jour après vêlage).

3.2.3. Le lait de réservoir :

Un lait de réservoir était prélevé dans chaque élevage tous les 3 mois.

3.3. Acheminement et conservation

Dès le prélèvement, les échantillons ont été conservés sur glace et acheminés le jour même du prélèvement au LÉAQ et ils ont étéensemencés dans les 24 heures.

4. Les analyses de laboratoire

4.1. Analyse bactériologique

L'analyse bactériologique des prélèvements de lait et des cultures nasales s'est déroulée en 3 étapes :

4.1.1. La mise en culture

Écouvillon nasal : Les écouvillons nasaux ont étéensemencés sur gélose Hayflick et dans un bouillon Hayflick.

Lait individuel : Pour la recherche de *Mycoplasma* spp. dans les échantillons de lait individuel, l'ensemencement a été effectué sur gélose Hayflick.

Lait de réservoir : Pour la recherche de mycoplasmes dans le lait de réservoir une première étape décrite par Punyapornwithaya et al. (2009) a été effectuée avant l'ensemencement sur gélose Hayflick (Punyapornwithaya, Fox et al. 2009). Elle consistait en la centrifugation du lait. La couche de gras qui se forme à la surface de l'échantillon était alors prélevée et diluée dans une solution saline stérile. Le mélange était ensuite centrifugé et enfinensemencé sur gélose Hayflick.

4.1.2. Incubation et lecture des milieux de culture

Les géloses et bouillons Hayflick étaient incubés à 35°C, dans une jarre avec une chandelle. Les bouillons Hayflick incubés étaientensemencés après 48 heures sur gélose Hayflick. Si le bouillon était contaminé par des bactéries, il était filtré de façon stérile avec un filtre 0,45 µm. Lors d'utilisation de bouillons avec indicateurs de pH, ceux-ci étaient incubés en aérobiose à 35°C.

Lorsqu'il y avait un changement de couleur, ils étaient alorsensemencés sur gélose Hayflick.

Les géloses Hayflick étaient examinées tous les jours à l'aide du stéréoscope. Les colonies d'apparences « d'œuf sur le plat » étaient recherchées. En cas de doute, la coloration Gram permettait d'identifier les bactéries des mycoplasmes puisque n'ayant pas de paroi, ces derniers ne se colorent pas à la coloration Gram. Les géloses étaient incubées pour une durée de 10 jours avant de déclarer un résultat négatif.

En annexe, on peut retrouver la composition du milieu Hayflick (Annexe I).

4.1.3. L'identification à l'espèce

L'identification à l'espèce s'est faite par l'épreuve d'immunofluorescence indirecte suivant le protocole du LÉAQ (al-Aubaidi et Fabricant 1971).

Des rondelles de la gélose Hayflick inoculée de colonies de *Mycoplasma* spp. étaient prélevées à l'aide d'un tube vide. Les rondelles de géloses (colonies vers le haut) étaient fixées sur lames dégraissées et chauffées. Elles étaient ensuite scellées avec de la paraffine à l'aide d'une pipette chaude. Une goutte de formol à 10 % était placée sur chacun des blocs et laissée à température pièce dans un pétri humide pour 5 minutes. L'excès de formol était ensuite enlevé avec du papier buvard. Les lames étaient lavées avec du PBS pour 10 minutes. L'excédant d'eau était enlevé en épongeant le bord de la gélose. Une goutte de l'antisérum à *M. bovis* était déposée sur chacun des blocs du spécimen à identifier et sur chacun des blocs de culture témoin. Les lames étaient incubées dans une chambre humide durant 30 minutes à température pièce. L'excédent était enlevé avec du papier buvard et les lames étaient lavées 3 fois pendant 10 minutes avec du PBS.

L'excédent du PBS était enlevé avec du papier buvard, une goutte de fluorescéine était ajoutée et les lames ont été conservées à la noirceur dans une chambre humide pendant 30 min à la température pièce. L'excédent de fluorescéine était enlevé avec du papier buvard et les lames sont lavées au PBS pour 10 min, 3 fois, en gardant les lames à la noirceur. Les lames étaient examinées au microscope à épifluorescence et les colonies à *M. bovis* sont

comparées aux souches contrôle spécifiques à l'espèce bovine : *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma bovigenitalium* et *Acholeplasma laidlawii*.

4.2. Analyse sérologique

La détection des anticorps contre *M. bovis* dans les prélèvements de sang s'est faite par une épreuve immunoenzymatique (Trousse ELISA de détection des anticorps contre *M. bovis*, Biovet Inc., Saint-Hyacinthe, Canada).

Le principe du test, le calcul du seuil de séropositivité ainsi que l'interprétation des résultats sont les recommandations du manufacturier qu'on retrouve en annexe (Annexe II).

5. Les analyses statistiques

Toutes les données ont été compilées avec le logiciel Excel (Version 2007 de Microsoft Office). Tous les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel SAS (Version 9.2). Dans tous les cas et pour tous les tests statistiques utilisés dans cette étude, une différence a été considérée statistiquement significative en utilisant une valeur alpha de 0,05.

5.1. Définitions générales

- Période de l'étude : La période de l'étude correspond chez les génisses à la période entre leur naissance jusqu'à ce qu'elles atteignent l'âge de 7 mois. Pour les vaches, la période de l'étude correspond à la période entre le vêlage et le 5^{ème} mois après la naissance de ces génisses.
- Bactériopositif : un animal dont l'analyse bactériologique (lait ou culture nasale) indique un résultat positif.
- Séropositif : un animal dont l'analyse sérologique indique un résultat positif, c'est-à-dire, soit +, ++, +++ ou ++++ (voir la grille d'interprétation des résultats sérologiques en annexe II).
- Séroconversion : augmentation des titres d'anticorps d'au moins "++" dans le sérum d'un animal entre les résultats de 2 prélèvements successifs.
- Séroconverti : un animal qui a vécu l'évènement de la séroconversion.

5.2. Définitions et tests statistiques/calculs selon le type d'analyse

5.2.1. Analyse de l'âge moyen des génisses à leur premier prélèvement

La moyenne d'âge des génisses à leur premier prélèvement a été évaluée pour chaque troupeau. Un modèle linéaire pour variances hétérogènes avec le troupeau comme facteur fixe a été utilisé pour comparer les moyennes des différents troupeaux.

5.2.2. Analyse de l'incidence cumulée pour l'excrétion nasale, la séropositivité et la séroconversion chez les génisses

La dynamique de la transmission de *M. bovis* chez les génisses de la naissance à l'âge de 7 mois a été évaluée par le calcul de l'incidence cumulée pour les variables excrétion nasale, séropositivité et séroconversion et cela dans les différents troupeaux et pour l'ensemble des troupeaux. Les définitions suivantes ont été utilisées :

Premier cas : un animal qui est déclaré positif au prélèvement P et dont tous les résultats précédents sont négatifs.

Animal à risque : un animal qui n'a pas été diagnostiqué positif aux prélèvements précédents.

Population à risque : la somme des individus à risque pendant la période d'étude.

L'incidence cumulée est le rapport entre la somme de premiers cas et la population à risque pendant toute la période d'étude.

Pour l'analyse statistique de l'effet du troupeau sur l'incidence cumulée de l'excrétion nasale, la séropositivité et la séroconversion le test du Chi carré exact a été utilisé.

Lorsque le test du Chi carré exact indiquait une association significative entre le troupeau et l'incidence, le test post hoc a été utilisé, car il permet de comparer les incidences cumulées des différents troupeaux entre elles.

5.3. Analyse des concordances

Pour l'analyse des concordances entre différents statuts, des définitions ont été utilisées et sont présentées selon le type de concordance analysée :

5.3.1. Concordance entre les statuts vache/génisse pour les résultats bactériologiques durant toute la période de l'étude

Une vache a été considérée bactériopositive si au moins un de ses résultats bactériologiques de culture nasale ou de culture de lait s'est révélé positif durant toute la période de l'étude.

Une génisse a été considérée bactériopositive si au moins un de ses prélèvements en culture nasale s'est révélé positif durant toute la période de l'étude.

5.3.2. Concordance entre les statuts vache/génisse pour les résultats sérologiques durant le premier mois après la naissance

Un animal a été considéré séropositif si son résultat au premier prélèvement s'est révélé positif.

5.3.3. Concordance entre les statuts excrétion nasale/séroconversion des génisses depuis la naissance à l'âge de 7 mois

Une génisse a été considérée bactériopositive si au moins un de ses résultats en culture nasale s'est révélé positif durant toute la période de l'étude.

Une génisse a été considérée séroconvertie si elle a vécu au moins une séroconversion durant toute la période de l'étude.

Pour l'analyse de la concordance entre 2 statuts et pour les différentes variables citées ci-dessus, le test du Kappa a été utilisé.

Les résultats au test Kappa ont été interprétés et classifiés selon la grille suivante (Dohoo 2009) :

- ≤ 0 : accord faible
- 0,01 - 0,2 : léger accord
- 0,21 - 0,4 : bon accord
- 0,41 - 0,6 : accord modéré

- 0,61 - 0,8 : accord important
- 0,81 - 1,0 : accord presque parfait

Quant à la comparaison statistique entre 2 prévalences (de 2 statuts), le test du Chi carré de McNemar a été utilisé. Ce dernier a permis d'ajouter plus d'interprétation au test Kappa.

5.4. Analyse de l'âge moyen d'une 1^{ère} excrétion nasale, 1^{ère} séropositivité et 1^{ère} séroconversion à *M. bovis* chez les génisses

Pour l'analyse de l'âge moyen d'une génisse à son 1^{er} diagnostic positif (en culture nasale, en séropositivité ou en séroconversion), les définitions suivantes ont été utilisées :

Temps (en jours) : est le temps écoulé depuis la naissance de la génisse jusqu'à son premier diagnostic positif en culture nasale ou en séropositivité. Pour la séroconversion, étant donné que la séroconversion est évaluée à partir de 2 prélèvements successifs, c'est le temps du 1^{er} prélèvement qui a été considéré comme temps du diagnostic positif de séroconversion (voir la définition de la séroconversion cité précédemment).

Pour le calcul de l'âge moyen, la formule suivante a été utilisée :

Âge moyen = la somme des temps/nombre d'animaux diagnostiqués positifs.

Pour déterminer si la moyenne d'âge variait significativement entre les troupeaux, un modèle linéaire pour variances hétérogènes avec le troupeau comme facteur fixe a été utilisé.

Lorsque le modèle linéaire indiquait une variance significative, les tests post hoc de Tukey ont été utilisés pour comparer les moyennes d'âge entre elles.

5.5. Analyse de l'intermittence de l'excrétion nasale de *M. bovis* chez les génisses

Pour évaluer l'intermittence de l'excrétion nasale chez les génisses de moins de 7 mois diagnostiquées excrétrices nasales de *M. bovis* dans l'ensemble des troupeaux la définition suivante a été utilisée :

L'excrétion nasale de *M. bovis* est dite intermittente lorsqu'en culture et à l'instant T un diagnostic est négatif, alors qu'un diagnostic positif est posé avant l'instant T et après l'instant T.

Pour le calcul de la proportion des génisses qui ont excrétées d'une façon intermittente, la formule suivante a été utilisée :

Proportion de l'intermittence = nombre de génisses ayant excrétées d'une façon intermittente/nombre de génisses ayant excrétées plus d'une fois durant la période de l'étude.

5.6. Analyse de la vitesse de survenue de la 1^{ère} excrétion nasale, 1^{ère} séropositivité et 1^{ère} séroconversion à *M. bovis* chez les génisses

La vitesse de survenue d'une 1^{ère} excrétion nasale, 1^{ère} séropositivité et 1^{ère} séroconversion a été analysée avec l'analyse de survie selon la méthode de Kaplan-Meier. Cette analyse s'exprime par la fonction de survie cumulée qui est la probabilité (en pourcentage) des génisses diagnostiquées négatives à chaque période de prélèvement et dans chaque troupeau.

L'analyse de l'homogénéité entre les courbes de survie des différents troupeaux a été réalisée avec le test de Wilcoxon. Cette analyse permet d'indiquer s'il y a une différence dans la vitesse de survenue de l'évènement étudié parmi les troupeaux.

Les définitions suivantes ont été utilisées pour ces analyses :

Période d'observation : est l'intervalle de temps durant lequel un animal a été étudié et cela depuis sa naissance jusqu'à la survenue de l'évènement étudié, ce qui correspond à la différence entre le temps 1 (T1) et le temps 0 (T0), l'unité de mesure étant le jour.

- Temps 0 (T0) : C'est l'âge de l'animal à son premier prélèvement.
- Temps 1 (T1) : varie selon le statut de l'animal à la fin de la période d'observation.

Statut positif : Pour un animal diagnostiqué positif, T1 est le temps durant lequel est survenu le 1^{er} évènement étudié (excrétion nasale, séropositivité ou séroconversion).

Statut censuré : Pour l'animal censuré, il y a 2 possibilités :

- Soit que l'animal a été perdu de vue, et T1 est le temps de son dernier prélèvement.
- Soit que l'animal arrive à la fin de l'étude sans vivre l'évènement et T1 est le temps de son dernier prélèvement.

EXPOSÉ ET ANALYSE DES RÉSULTATS

1. Description des troupeaux

Quatre troupeaux de bovins laitiers ont été sélectionnés et étudiés durant une période de 11 mois. L'étude a débuté en novembre 2009 et s'est terminée en septembre 2010.

1.1. Troupeau A

Le troupeau A compte 145 vaches adultes en stabulation libre de race Holstein. À la naissance, les génisses sont logées dans des logettes individuelles dans une pouponnière qui est séparée du bâtiment des vaches adultes. Néanmoins, les génisses qui sont logées côte à côte peuvent avoir un contact direct. Une génisse est séparée de sa mère avant la 1^{ère} tétée et elle est nourrie avec du colostrum non pasteurisé qui provient à 100 % de sa mère.

À l'âge de 3 mois, les génisses sont sevrées et logées en groupe (chaque groupe compte approximativement 6 animaux) dans des enclos situés dans le bâtiment où sont logées également les vaches adultes.

Avant l'âge de 6 mois et en âge de reproduction, les animaux sont vaccinés avec le vaccin Express^R 10 (Boehringer Ingelheim, Burlington, Ontario, Canada). Il s'agit d'un vaccin de virus vivant modifié des souches de rhinotrachéite infectieuse bovine, de la diarrhée virale bovine type 1 et 2, de la parainfluenza 3 et du virus respiratoire syncytial bovin. Le produit Express^R 10 contient également les valences pour *Histophilus somnus*, *Leptospira canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. hardjo*, *L. icterohaemorrhagiae*, et *L. pomona*.

Durant l'étude, 3 génisses sont mortes de diarrhées et 2 vaches adultes qui sont les mères de ces génisses ont été vendues. Selon les critères de remplacement des animaux en cas de perte décrite dans le protocole de l'étude, 2 génisses mortes ont été remplacées par 2 couples mères/génisses, alors que la 3^{ème} génisse morte n'a pas été remplacée, car elle était âgée de plus de 3 mois. Par conséquent, 22 couples génisses/mères ont été inclus dans l'étude.

1.2. Troupeau B

Le troupeau B compte 90 vaches adultes de race Holstein. À la naissance, les génisses sont logées en groupe dans des enclos en face des vaches adultes, ces dernières sont en stabulation entravée. À la naissance, une génisse est séparée de sa mère avant la 1^{ère} tétée et est nourrie avec du colostrum non pasteurisé qui provient à 100 % de sa mère. Approximativement à l'âge de 3 mois et demi, les génisses sont sevrées et logées en groupe (chaque groupe compte plus de 6 génisses).

Avant l'âge de 6 mois et en âge de reproduction, les animaux sont vaccinés avec le vaccin Bovi-shield^R Gold FP5^{MC} (Pfizer, Canada Inc., Kirkland, Québec, Canada). Il s'agit d'un vaccin de virus vivant modifié des souches de rhinotrachéite infectieuse bovine, de la diarrhée virale bovine type 1 et 2, de la parainfluenza 3 et du virus respiratoire syncytial bovin.

Durant l'étude, une génisse est morte de cause inconnue et sa mère a été vendue. Au total 20 génisses et 19 mères ont été incluses dans l'étude, car une vache adulte a donné naissance à 2 génisses.

1.3. Troupeau C

Le troupeau C compte 132 vaches adultes de race Holstein principalement et de race Jersey. À la naissance, les génisses sont logées dans des enclos individuels situés dans le même bâtiment que les vaches adultes. Néanmoins les génisses qui sont logées côte à côte peuvent avoir un contact direct. Une génisse est séparée de sa mère avant 3 heures après la naissance et elle est nourrie avec du colostrum non pasteurisé à 95 % et dans 80 % du temps il provient de sa mère.

Approximativement à l'âge de 3 mois, les génisses sont sevrées et logées en groupe de 6 animaux dans des enclos situés à l'intérieur du bâtiment où sont logées les vaches adultes.

Avant l'âge de 6 mois et en âge de reproduction, les animaux sont vaccinés avec le vaccin Pyramid^R FP10 (Boehringer Ingelheim, (Canada) Ltée, Burlington, Ontario, Canada), qui est un vaccin de virus vivant modifié des

souches de rhinotrachéite infectieuse bovine, de la diarrhée virale bovine type 1 et 2, de la parainfluenza 3 et du virus respiratoire syncytial bovin. Le vaccin contient également les valences *Leptospira canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. hardjo*, *L. icterohaemorrhagiae* et *L. pomona*.

Durant l'étude, 20 paires génisse/mère ont été incluses et 6 génisses ont été vendues et n'ont pas été remplacées vu qu'elles étaient âgées de plus de 3 mois.

Toutes les génisses ont reçu un traitement antibiotique à leurs naissances. Le produit utilisé qui est le Draxxin^R (Pfizer, (Canada) Inc., Kirkland, Québec, Canada) est un antibiotique à base de tulathromycine. La dose reçue était 0,5 ml administrée par voie sous-cutanée.

1.4. Troupeau D

Le troupeau D compte 120 vaches adultes de race Holstein principalement et de race Jersey. À la naissance, une génisse est séparée de sa mère avant 12 heures et elle est logée dans une hutte à veau à l'extérieur. La génisse à sa naissance est nourrie à 90 % avec du colostrum non pasteurisé (le 10 % qui reste est pasteurisé). Le colostrum provient dans 60 % du temps de sa mère, 30 % du colostrum mélangé de plusieurs vaches et 10 % provient de colostrum commercial en poudre. Approximativement à l'âge de 2 mois, les génisses sont sevrées et logées en groupe à l'extérieur durant 1 à 2 semaines, ensuite les animaux sont logés dans des enclos (chaque enclos compte approximativement 6 animaux) à l'intérieur d'un bâtiment où ne sont logées que les génisses.

Avant l'âge de 6 mois et en âge de reproduction les animaux sont vaccinés avec le vaccin Bovi-shield^R Gold FP5^{MC} (Pfizer, (Canada) Inc., Kirkland, Québec, Canada), qui est un vaccin de virus vivant modifié des souches de rhinotrachéite infectieuse bovine, de la diarrhée virale bovine type 1 et 2, de la parainfluenza 3 et du virus respiratoire syncytial bovin.

Dans le troupeau D, 2 génisses sont mortes de diarrhée, 2 vaches adultes sont mortes de pneumonies (dont une avec un diagnostic à *M. bovis*), une vache

adulte a été vendue et une autre vache adulte a été réformée pour cause d'arthrite. Selon les critères de remplacement des animaux en cas de perte décrite dans le protocole de l'étude, 21 paires génisse/mère ont été incluses dans l'étude.

2. Âge moyen des génisses à leur premier prélèvement

Comme nous l'avons cité dans la méthodologie, les génisses devaient avoir 30 jours ou moins à la date de leur inclusion dans l'étude, ce qui correspond à la date de leur premier prélèvement. Malgré cela, 3 génisses avaient 33, 34 et 40 jours à leur premier prélèvement (une génisse du troupeau A et 2 génisses du troupeau B respectivement).

Pour cette raison, une analyse de l'âge moyen des génisses à leur premier prélèvement a été réalisée pour chaque troupeau et pour l'ensemble des troupeaux. Une comparaison entre les moyennes d'âge dans les différents troupeaux a également été réalisée pour savoir si les génisses avaient en moyenne le même âge à leur premier prélèvement. Les résultats de cette analyse sont présentés dans le tableau suivant :

Troupeau	Génisses incluses dans l'étude	Génisses ayant complété l'étude	Moyenne d'âge (jour)	Écart-type à la moyenne (jour)	Min.	Max.
A	22	19	15,5	2	2	34
B	20	19	16,4	2,6	1	40
C	20	14	14,6	1,5	1	24
D	21	19	10,9	1,9	0	28
Total	83	71	14,3	1	0	40

Tableau II : Âge moyen des génisses (en jour) à leur premier prélèvement pour les différents troupeaux et pour l'ensemble des troupeaux.

L'analyse comparative entre les moyennes d'âge des génisses a montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les troupeaux ($P = 0,28$).

3. Les résultats bactériologiques

3.1. Résultats bactériologiques de culture nasale chez les génisses et chez les vaches adultes

Les résultats de culture nasale pour mycoplasmes chez les génisses de moins de 7 mois et chez les vaches adultes pour les différents troupeaux et pour l'ensemble des troupeaux et cela durant toute la période de l'étude sont présentés dans le tableau suivant :

Troupeau	Génisse de moins de 7 mois Nombre de prélèvements positifs/nombre total des prélèvements (%)		Vache adulte Nombre de prélèvements positifs/nombre total des prélèvements (%)	
	<i>M. bovis</i>	<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>M. bovis</i>	<i>Mycoplasma</i> spp.
A	24/130 (18,5 %)	38/130 (29,2 %)	0/58 (0 %)	14/58 (24,1 %)
B	10/131 (7,6 %)	30/131 (22,9 %)	0/52 (0 %)	8/52 (15,4 %)
C	0/113 (0 %)	52/113 (46,0 %)	0/60 (0 %)	7/60 (11,7 %)
D	1/132 (0,8 %)	80/132 (60,6 %)	1/59 (1,7 %)	20/59 (33,9 %)
Total	35/506 (6,9 %)	200/506 (39,5 %)	1/229 (0,4 %)	49/229 (21,4 %)

Tableau III : Proportions des prélèvements positifs à *M. bovis* et à *Mycoplasma* spp. en culture nasale (chez les génisses et chez les vaches adultes) par rapport au nombre total des prélèvements effectués pendant toute la période de l'étude.

Les résultats de culture nasale pour *M. bovis* dans les 4 troupeaux indiquent que les proportions chez les vaches adultes sont beaucoup plus faibles par rapport aux proportions chez les génisses. Alors que les résultats pour *Mycoplasma* spp. et cela pour les 4 troupeaux indiquent que les proportions

chez les vaches représentent approximativement la moitié des proportions chez les génisses.

3.2. Résultats bactériologiques du lait de réservoir

Sur les 16 échantillons de lait de réservoir qui ont été prélevés dans les 4 troupeaux et cela durant toute la période de l'étude, aucune culture bactériologique ne s'est révélée positive à *M. bovis* ou à *Mycoplasma* spp.

3.3. Résultats bactériologiques du lait individuel

Sur les 228 prélèvements de lait effectués sur les vaches adultes dans les 4 troupeaux et cela durant toute la période de l'étude, aucune culture bactériologique ne s'est révélée positive à *M. bovis* ou à *Mycoplasma* spp.

3.4. Incidence cumulée de l'excrétion nasale chez les génisses

Les incidences cumulées des génisses diagnostiquées positives en culture nasale durant toute la période de l'étude, dans les différents troupeaux et dans l'ensemble des troupeaux sont présentées dans le tableau suivant :

Troupeau	Nbre de premiers cas	Population à risque	IC : cas par 100 veau-mois (intervalle de confiance à 95 %)
A	13	86	15,1 (8,3 – 24,5)
B	8	98	8,2 (3,6 – 15,5)
C	0	113	0 (0 – 3,2)
D	1	129	0,8 (0 – 4,2)
Total	22	426	5,2 (3,3 – 7,7)

Tableau IV : Incidence cumulée des génisses diagnostiquées excrétrices nasales de *M. bovis* par 100 veau-mois de la naissance à l'âge de 7 mois.

L'analyse statistique de l'effet du troupeau sur l'incidence cumulée par le test du Chi carré exact a indiqué qu'il y avait une association significative entre le

troupeau et l'incidence cumulée ($P < 0,0001$).

Quant à l'analyse statistique de la comparaison deux à deux des incidences cumulées, les tests post-hoc ont indiqué que l'incidence était significativement plus élevée dans le troupeau A que dans les troupeaux C et D ($P < 0.0001$) et plus élevée dans le troupeau B que dans les troupeaux C ($P = 0.0018$) et D ($P = 0.0058$). Il n'y avait pas d'autres différences significatives.

3.5. Analyse de survie (selon la méthode de Kaplan-Meier) de la vitesse de survenue de la première excrétion nasale de *M. bovis* chez les génisses

L'analyse de survie (selon la méthode de Kaplan-Meier) de la vitesse de survenue de la première excrétion nasale de *M. bovis* chez les génisses de moins de 7 mois dans les troupeaux A, B et D où au moins un cas positif a été diagnostiqué est présentée dans la figure de la page suivante :

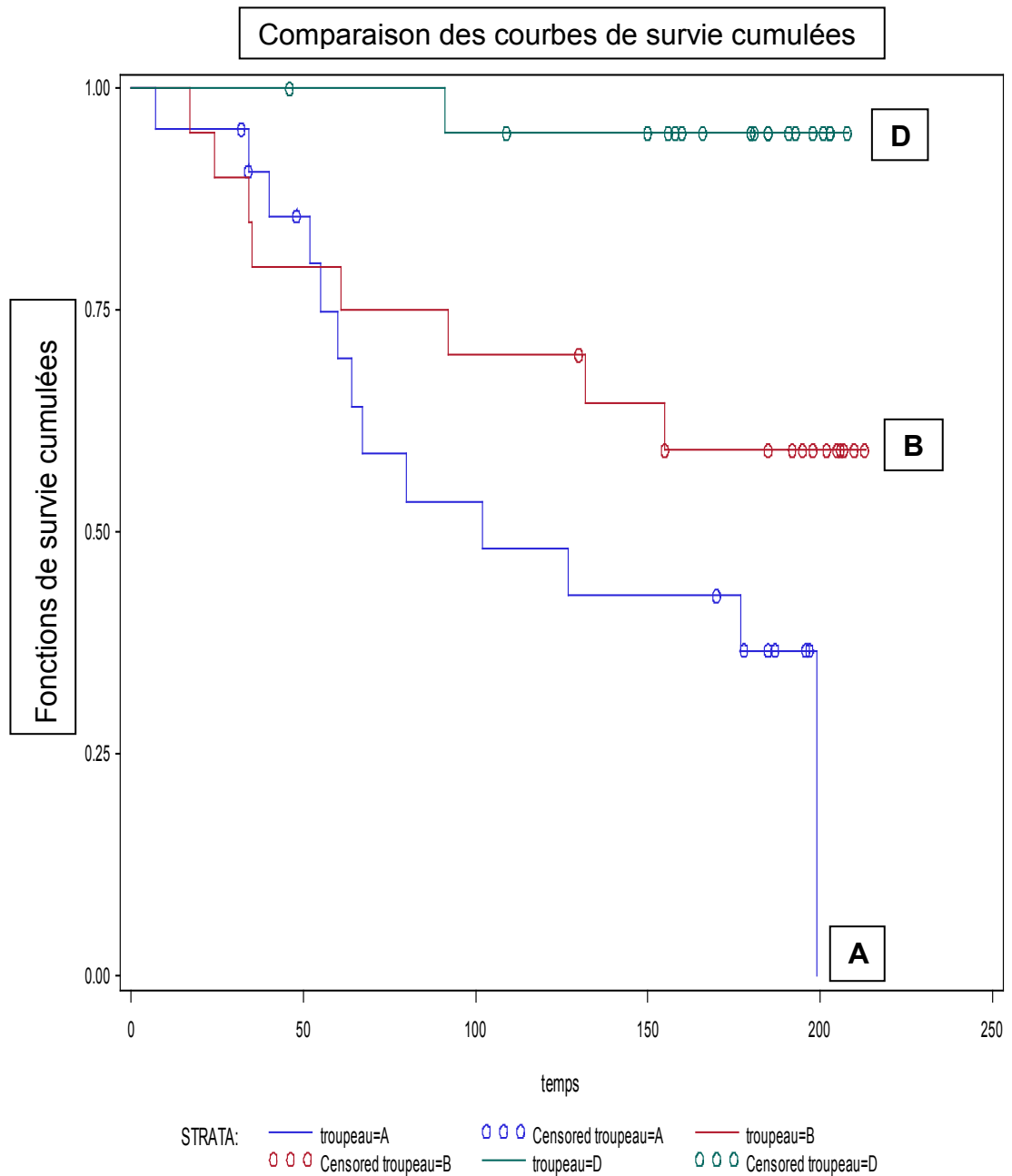


Figure 2 : Comparaison des courbes de survie cumulées (selon la méthode de Kaplan-Meier) de la vitesse de survenue de la première excrétion nasale chez les génisses dans les 3 troupeaux A, B et D.

Temps : Âge des génisses en jour.

Fonctions de survie cumulées : La probabilité en % des génisses diagnostiquées négatives en culture nasale.

L'analyse statistique d'égalité des fonctions de survie cumulées a indiqué qu'il y avait une différence significative dans la vitesse de survenue de la 1^{ère} excrétion nasale entre les 3 troupeaux A, B et D ($P = 0,002$). Le troupeau C n'a pas été analysé, car il n'y avait pas de cas positifs.

La comparaison deux à deux des courbes de survie a indiqué qu'il n'y avait pas de différence significative entre les troupeaux A et B ($P = 0.29$), alors qu'il existait une différence significative entre les troupeaux A et D ($P = 0.0001$) et entre les troupeaux B et D ($P = 0.008$).

3.6. Âge moyen de survenue de la première excrétion nasale de *M. bovis* chez les génisses

L'âge moyen de la première excrétion nasale a été analysé pour les troupeaux où au moins une génisse a été diagnostiquée positive à *M. bovis* en culture nasale, à savoir les troupeaux A, B et D. L'âge moyen d'une première excrétion nasale est présenté dans le tableau suivant :

Troupeau	Nbre de génisses excrétrices nasales	Moyenne d'âge (jour)	Écart-type à la moyenne
A	13	81,8	15,5
B	8	68,7	18,4
D	1	91	54,6
Total	22	77,5	11,2

Tableau V : Âge moyen en jour de survenue de la première excrétion nasale des génisses diagnostiquées excrétrices nasales de *M. bovis* de la naissance à 7 mois d'âge.

L'analyse statistique a montré que la moyenne d'âge ne variait pas significativement entre les troupeaux ($P = 0,83$).

3.7. Le patron de l'excrétion nasale de *M. bovis* chez les génisses

Le patron de l'excrétion nasale de *M. bovis* chez les génisses où au moins un diagnostic positif de culture nasale a été posé est présenté dans la figure de la page suivante :

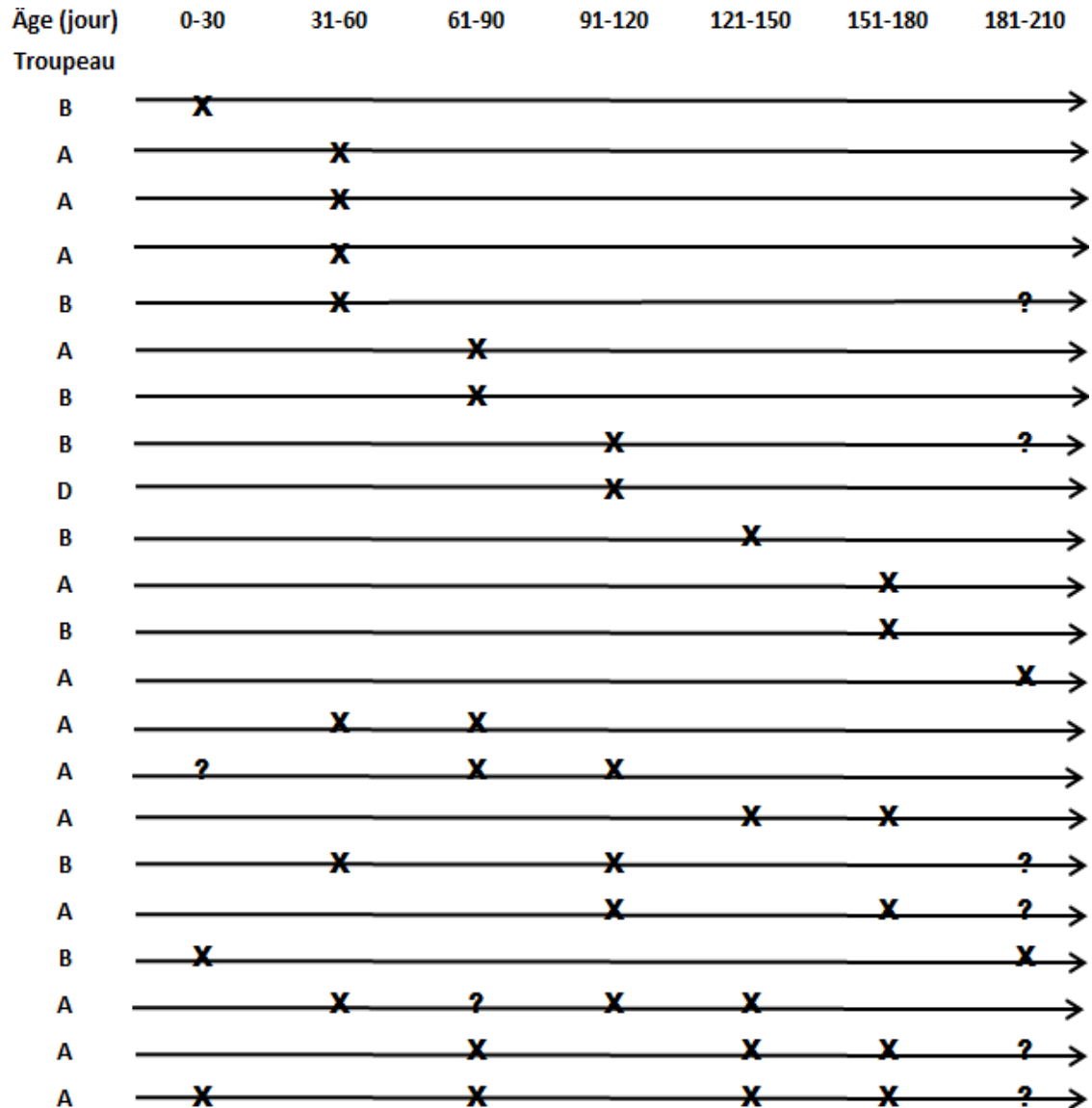


Figure 3 : Répartition temporelle des résultats positifs en culture nasale chez les génisses diagnostiquées excrétrices nasales de *M. bovis* dans les troupeaux A, B et D (n=22).

Les intervalles de temps (sur la 1^{ère} ligne) représentent les intervalles d'âge en jours durant lesquels les prélèvements de culture nasale ont été effectués.

Une croix représente un diagnostic positif en culture nasale.

Un point d'interrogation représente un statut inconnu dû à une donnée manquante.

La proportion des génisses diagnostiquées positives en culture nasale à *M. bovis* plus d'une fois par rapport au nombre total des génisses diagnostiquées positives en culture nasale est de 9/22 et cela dans les 3 troupeaux A, B et D où au moins une génisse a été diagnostiquée positive.

Parmi les génisses diagnostiquées excrétrices nasales de *M. bovis* plus d'une fois, 5/9 ont excrété d'une façon intermittente et 2/9 avaient un statut inconnu dû à une donnée manquante.

3.8. Analyse de la concordance entre le statut des vaches adultes et le statut des génisses pour les résultats de cultures bactériologiques

Les résultats de la concordance entre le statut des génisses en culture nasale et le statut des vaches adultes en culture nasale et en culture de lait individuel sont présentés dans le tableau suivant :

Statut des vaches (lait et culture nasale)	Statut des génisses (culture nasale)	
	Négatif	Positif
Négatif	60	22
Positif	1	0

Tableau VI : *Résultats de la concordance entre le statut des vaches adultes (en lait et culture nasale) et le statut des génisses (en culture nasale) à M. bovis de toute la période de l'étude.*

L'analyse de la concordance entre le statut bactériologique des vaches adultes et le statut bactériologique des génisses a indiqué une faible concordance et ceci pour deux raisons :

Premièrement, une seule vache adulte a été diagnostiquée positive en culture nasale et cela à son deuxième prélèvement ce qui correspond à l'intervalle entre 31 et 60 jours après le vêlage.

Deuxièmement, la vache adulte diagnostiquée excrétrice nasale de *M. bovis*, sa génisse a été déclarée négative en culture nasale et cela pendant toute la période de l'étude.

4. Les résultats sérologiques

4.1. Résultats sérologiques chez les génisses et chez les vaches adultes

Les résultats des analyses sérologiques des génisses de moins de 7 mois et des vaches adultes dans les différents troupeaux et dans l'ensemble des troupeaux et cela durant toute la période de l'étude sont présentés dans le tableau suivant :

Troupeau	Génisses Nombre de prélèvements positifs/nombre total des prélèvements (%)	Vaches adultes Nombre de prélèvements positifs/nombre total des prélèvements (%)
A	68/131 (51,9 %)	35/58 (60,3 %)
B	129/132 (97,7 %)	39/51 (76,5 %)
C	23/114 (20,2 %)	32/60 (53,3 %)
D	74/132 (56,1 %)	51/59 (86,4 %)
Total	294/509 (57,8 %)	157/228 (68,9 %)

Tableau VII : Proportions des prélèvements sérologiques positifs à *M. bovis* (chez les génisses et chez les vaches adultes) par rapport au nombre total des prélèvements effectuées durant la période d'étude.

4.2. Incidence cumulée des génisses séropositives

Les incidences cumulées des génisses séropositives dans les différents troupeaux et pour l'ensemble des troupeaux durant toute la période de l'étude sont présentées dans le tableau de la page suivante :

Tableau VIII : *Incidence cumulée des génisses diagnostiquées séropositives à M. bovis par 100 veau-mois de la naissance à l'âge de 7 mois.*

Troupeau	Nbre de premiers cas	Population à risque	IC : cas par 100 veau-mois (intervalle de confiance à 95 %)
A	21	58	36,2 (24 - 49,9)
B	20	23	87 (66,4 - 97,2)
C	13	114	11,4 (6,2 - 18,7)
D	20	37	54 (36,9 - 70,5)
Total	74	232	31,9 (25,9 - 38,3)

L'analyse statistique de l'effet du troupeau sur l'incidence cumulée par le test du Chi carré exact, a indiqué une hétérogénéité significative entre le troupeau et l'incidence cumulée ($P < 0,0001$). Quant à l'analyse statistique de la comparaison des incidences cumulées, les tests post-hoc ont indiqué que l'incidence cumulée était significativement moins élevée dans le troupeau C que dans les troupeaux A ($P = 0.0002$), B ($P < 0.0001$) et D ($P < 0.0001$), et plus élevée dans le troupeau B que dans les troupeaux A ($P < 0.0001$) et D ($P = 0.01$).

4.3. Analyse de survie (selon la méthode de Kaplan-Meier) de la vitesse de survenue du premier cas séropositif à *M. bovis* chez les génisses

L'analyse de survie (selon la méthode de Kaplan-Meier) de la vitesse de survenue du premier cas séropositif à *M. bovis*, chez les génisses de moins de 7 mois dans les différents troupeaux est présentée dans la figure de la page suivante :

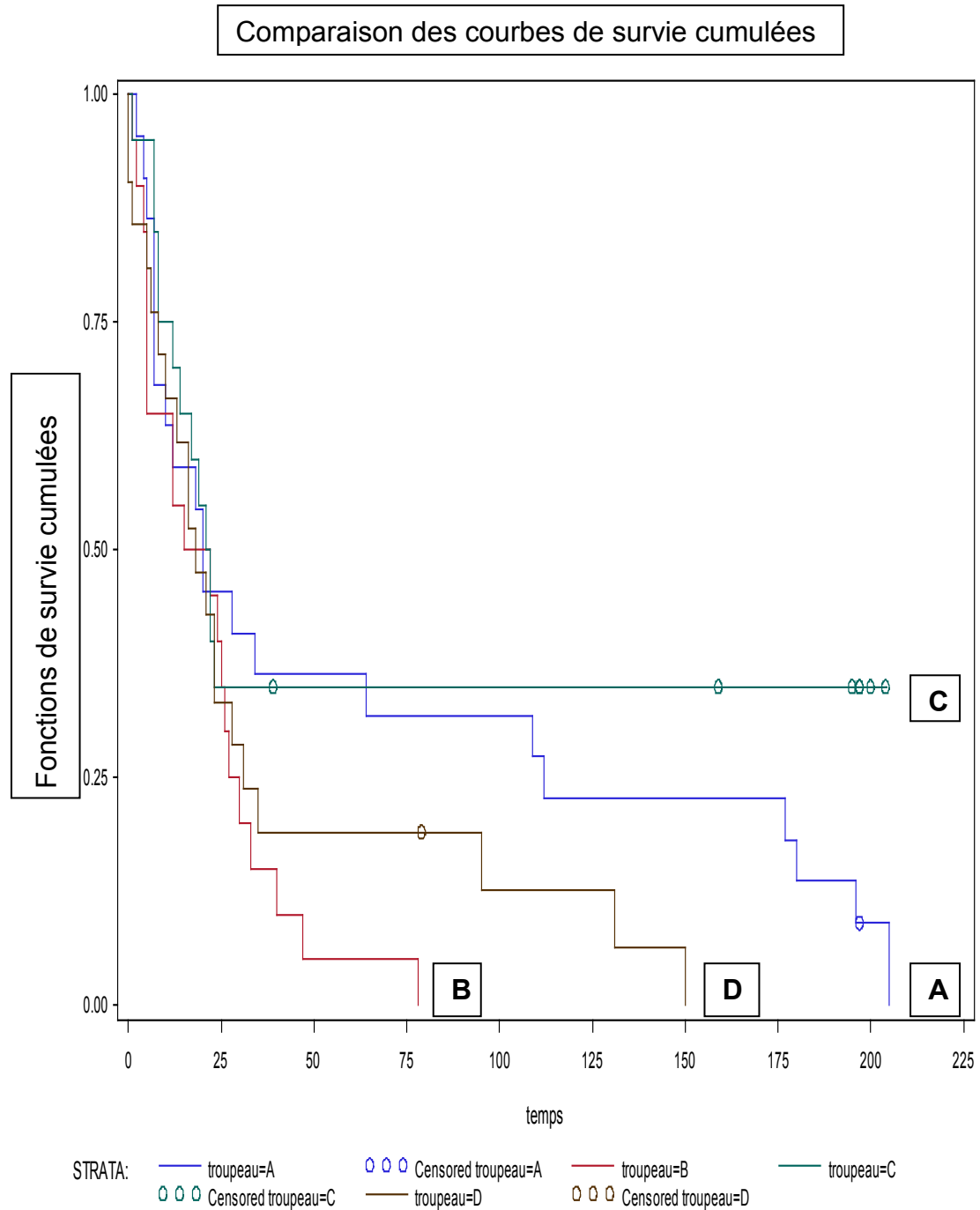


Figure 4 : Comparaison des courbes de survie cumulées (selon la méthode de Kaplan-Meier) de la vitesse de survenue du 1^{er} cas séropositif entre les 4 troupeaux.

Temps : Âge des génisses en jour.

Fonctions de survie cumulées : La probabilité en % des génisses diagnostiquées séronégatives à *M. bovis* dans les différents troupeaux.

L'analyse statistique d'égalité des fonctions de survie cumulées indiquait qu'il n'y avait pas de différence statistiquement significative dans la vitesse de survenue du premier cas séropositif entre les 4 troupeaux ($P = 0,42$).

4.4. Âge moyen de survenue de la première séropositivité à *M. bovis* chez les génisses

L'âge moyen du premier cas séropositif contre *M. bovis*, a été analysé chez les génisses séropositives contre *M. bovis*, pour les différents troupeaux et pour l'ensemble des troupeaux et cela pour toute la période de l'étude. Les résultats de cette analyse sont présentés dans le tableau suivant :

Troupeau	Nbre de génisses séropositives	Moyenne d'âge (jour)	Écart-type à la moyenne
A	21	51,7	13,6
B	20	20,9	4,2
C	13	13,9	2
D	20	30,4	9,1
Total	74	31	4,9

Tableau IX : Âge moyen en jour de survenue du premier cas séropositif chez les génisses diagnostiquées séropositives à *M. bovis* de la naissance à 7 mois d'âge.

L'analyse statistique a montré que la moyenne d'âge ne variait pas significativement entre les troupeaux ($P = 0,10$).

4.5. Analyse de la concordance entre les statuts sérologiques mère/génisse à *M. bovis* pour le premier mois après la naissance des génisses

Les résultats de la concordance entre le statut sérologique des génisses et le statut sérologique des mères pour le premier mois après la naissance des génisses sont représentés dans le tableau de la page suivante :

Tableau X : Résultats de la concordance entre le statut des génisses et le statut des mères pour les résultats sérologiques à *M. bovis* pour le premier mois après la naissance.

Statut sérologique des génisses	Statut sérologique des vaches adultes (mères)		Total
	Négatif	Positif	
Négatif	15 (18 %)	8 (10 %)	23 (28,7 %)
Positif	22 (27,5 %)	35 (43,7 %)	59 (71,2 %)
Total	37 (46,2 %)	43 (53,7 %)	80 (100 %)

Le coefficient Kappa est de 0,23 indiquant une concordance faible entre le statut sérologique des génisses et le statut sérologique de leurs mères pour la période du premier mois après la naissance des génisses.

Quant à la comparaison entre la prévalence des génisses séropositives et la prévalence des mères séropositives, le test de McNemar a indiqué que la prévalence sérologique était significativement plus élevée chez les génisses (71,3 %) que chez les mères (53,8 %) avec un $P = 0,01$.

5. Les résultats de séroconversion

5.1. Incidence cumulée des génisses séroconverties

Les incidences cumulées des génisses séroconverties contre *M. bovis* dans les différents troupeaux et dans l'ensemble des troupeaux et cela durant toute la période de l'étude sont présentés dans le tableau de la page suivante :

Tableau XI : Incidence cumulée des génisses séroconverties contre *M. bovis* par 100 veau-mois de la naissance à l'âge de 7 mois.

Troupeau	Nbre de premiers cas	Population à risque	IC : cas par 100 veau-mois (intervalle de confiance à 95 %)
A	7	116	6 (2,4 - 12)
B	11	83	13,2 (6,8 - 22,4)
C	0	113	0 (0 – 3,2)
D	18	84	21,4 (13,2 - 31,7)
Total	36	396	9 (6,4 - 12,3)

L'analyse de la comparaison de l'incidence cumulée entre les 4 troupeaux par le test du Chi carré exact a indiqué une hétérogénéité statistiquement significative entre les troupeaux ($P < 0.0001$). Les tests post-hoc avec l'ajustement séquentiel de Bonferroni pour comparaisons multiples ont indiqué que l'incidence était significativement moins élevée dans le troupeau C que dans les troupeaux A ($P = 0.014$), B ($P < 0.0001$) et D ($P < 0.0001$), et moins élevée dans le troupeau A que dans le troupeau D ($P = 0.0019$).

5.2. Analyse de survie (selon la méthode de Kaplan-Meier) de la vitesse de survenue de la première séroconversion chez les génisses

La comparaison des fonctions de survie cumulées de la première séroconversion contre *M. bovis* chez les génisses de moins de 7 mois, dans les 3 troupeaux A, B et D est présentée sur la figure à la page suivante :

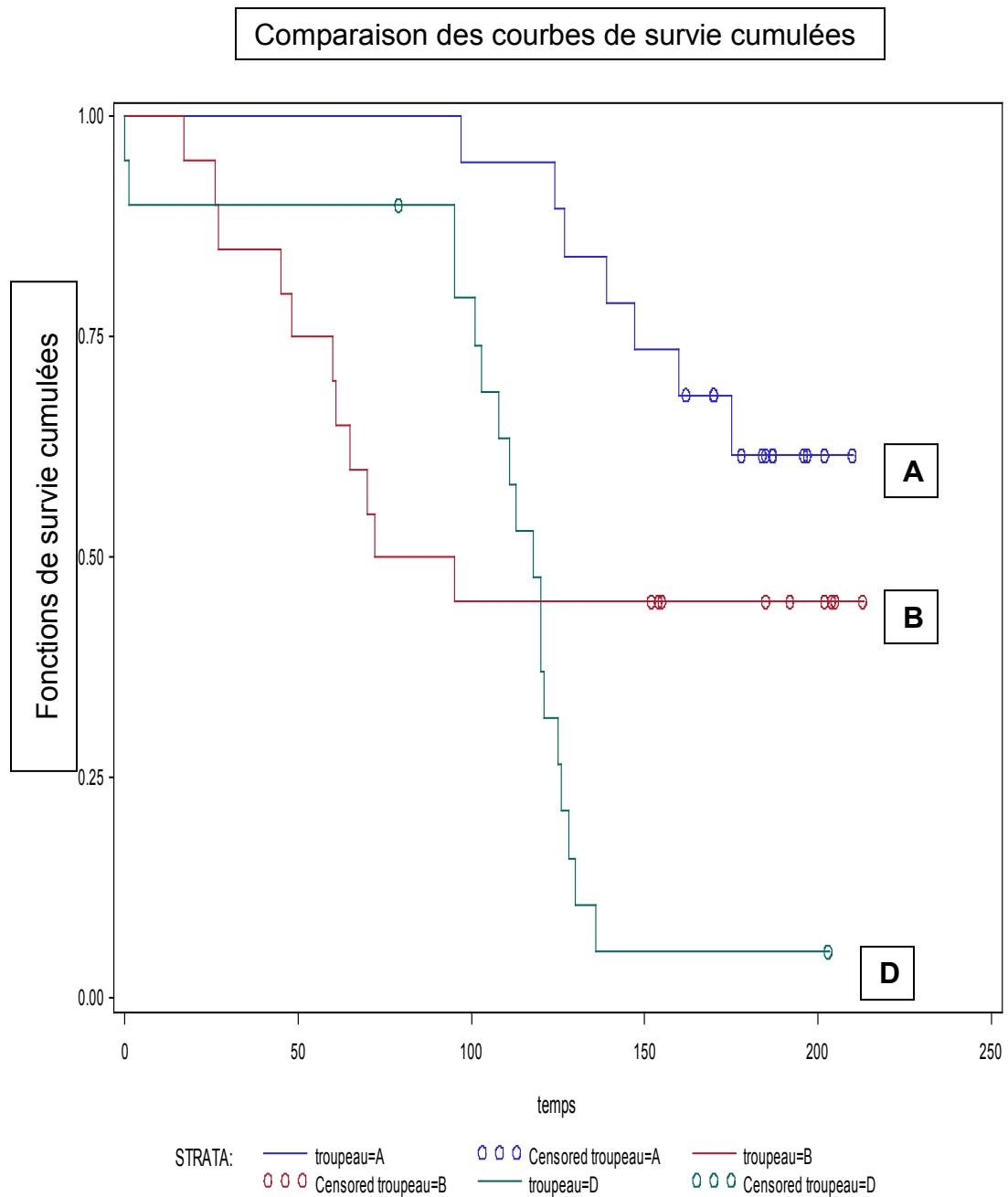


Figure 5 : Comparaison des courbes de survie (selon la méthode de Kaplan-Meier) de la vitesse de survenue de la première séroconversion contre *M. bovis* chez les génisses dans les troupeaux.

Temps : Âge des génisses en jour.

Fonctions de survie cumulées : La probabilité en % des génisses diagnostiquées non séroconverties à *M. bovis* dans les différents troupeaux.

L'analyse statistique d'égalité des fonctions de survie cumulées des troupeaux A, B et D a indiqué une différence significative ($P = 0,001$) dans la vitesse de survenue de la première séroconversion à *M. bovis*. Le troupeau C n'a pas été analysé, car il n'avait aucun cas positif.

Les tests post-hoc ont indiqué qu'il y avait une différence significative entre le troupeau A et le troupeau B ($P = 0.02$) et entre le troupeau A et le troupeau D ($P < 0.0001$).

Entre le troupeau B et le troupeau D, il n'y avait pas de différence significative ($P = 0.88$).

5.3. Âge moyen de survenue de la première séroconversion à *M. bovis* chez les génisses

L'âge moyen de la génisse à sa première séroconversion contre *M. bovis* a été analysé pour les troupeaux où au moins une génisse a séroconverti contre *M. bovis*, à savoir les troupeaux A, B et D. L'âge moyen d'une première séroconversion dans les différents troupeaux et pour l'ensemble des troupeaux est présenté dans le tableau suivant :

Troupeau	Nbre de génisses séroconverties	Moyenne d'âge (jours)	Écart-type à la moyenne
A	8	143,2	6,3
B	11	53,3	7
D	18	102,8	9,2
Total	37	96,8	7,4

Tableau XII : Âge moyen de survenue de la 1^{ère} séroconversion contre *M. bovis* chez les génisses diagnostiquées séroconverties à *M. bovis* dans les troupeaux A, B et D.

L'analyse statistique a montré que la moyenne d'âge variait significativement entre les troupeaux ($P < 0,0001$). La moyenne était significativement plus élevée dans le troupeau A que dans le troupeau B et le troupeau D et plus élevée dans le troupeau D que dans le troupeau B.

6. Les résultats de l'analyse de la concordance du statut séroconversion/bactériologie à *M. bovis* chez les génisses

Les résultats de l'analyse de la concordance entre le statut de séroconversion et le statut bactériologique à *M. bovis* chez les génisses de moins de 7 mois durant toute la période de l'étude, sont présentés dans le tableau suivant :

Statut de séroconversion des génisses (test ELISA)	Statut bactériologique des génisses (culture nasale)		Total
	Négatif	Positif	
Négatif	34 (44,2 %)	11 (14,3 %)	45 (58,5 %)
Positif	21 (27,3 %)	11 (14,3 %)	32 (41,6 %)
Total	55 (71,5 %)	22 (28,6 %)	77 (100 %)

Tableau XIII : Résultats de la concordance entre le statut de séroconversion et le statut bactériologique à *M. bovis* des génisses de la naissance à l'âge de 7 mois.

L'analyse statistique par le test du Kappa a indiqué une légère concordance entre les 2 statuts (Kappa = 0,10).

L'analyse statistique de la comparaison entre la prévalence bactériologique et la prévalence de séroconversion chez les génisses par le test de McNemar a indiqué qu'il n'y avait pas de différence significative entre la prévalence des génisses séroconverties et la prévalence des génisses bactériopositives ($P = 0,07$).

DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce mémoire a visé l'étude de la transmission et la réponse sérologique à *M. bovis* chez les génisses de remplacement dans 4 troupeaux de bovins laitiers au Québec. Pour cela plusieurs volets ont été analysés dans ce travail.

- La concordance entre le statut de séroconversion et le statut excrétion nasale de *M. bovis* chez les génisses.
- Les résultats sérologiques et leur pertinence comme indicateur épidémiologique dans l'étude de la dynamique de transmission de *M. bovis*.
- La dynamique de transmission de *M. bovis*.
- Le modèle de transmission de *M. bovis*.
- Les proportions des résultats positifs de cultures nasales et des résultats sérologiques.
- Une description du patron de l'excrétion nasale de *M. bovis*.

Le but de cette discussion est l'analyse des résultats des différentes parties de l'étude, une mise en relation entre ces dernières et la description des limites de cette étude.

1. Étude de la concordance entre l'excrétion nasale et la séroconversion à *M. bovis* chez les génisses

Les résultats de cette étude ont montré une légère concordance entre le statut de séroconversion et le statut excrétion nasale de *M. bovis* chez les génisses de la naissance jusqu'à l'âge de 7 mois.

Ce résultat pourrait s'expliquer par les hypothèses suivantes :

- Souches de virulence différente induisant une réponse immunitaire variable

En effet, il pourrait s'agir de plusieurs souches de *M. bovis* qui seraient différentes d'un troupeau à l'autre, comme il pourrait s'agir de plus d'une souche qui circulerait au sein d'un même troupeau (Poumarat, Solsona et al. 1994).

Shahriar et al. (2002) ont émit l'hypothèse de la différence de virulence entre les souches de *M. bovis*. La légère concordance entre le l'excrétion nasale et la

séroconversion à *M. bovis* montrée dans cette étude, nous suggère qu'on a probablement rencontré différentes souches du mycoplasme et que ces dernières se comportaient différemment du point de vue transmission et pathogénie.

En fait, certaines souches pourraient se transmettre plus facilement, mais seraient moins virulentes pour induire une séroconversion. Ce qui pourrait expliquer les cultures nasales diagnostiquées positives des génisses qui n'ont pas séroconverti durant la période de l'étude. Probablement que la faiblesse du pouvoir pathogène de certaines souches serait telle qu'elle n'induirait qu'une immunité locale de la muqueuse et non une immunité systémique (Howard, Gourlay et al. 1980; Maunsell, Donovan et al. 2009).

Paradoxalement, d'autres souches pourraient se transmettre faiblement, mais être virulentes au point d'induire une séroconversion. En effet, la colonisation des amygdales qui sont le réservoir naturel de *M. bovis* pourrait se faire sans excrétion nasale du mycoplasme (Maunsell 2007) ou avec une excrétion nasale, mais de courte durée, car à l'heure actuelle on ne connaît pas la durée de l'excrétion nasale de *M. bovis*. Toutes ces données pourraient expliquer la séroconversion chez des génisses dont les cultures nasales sont diagnostiquées négatives.

- Souches identiques ou souches variables induisant une réponse immunitaire similaire

L'hypothèse que plusieurs souches similaires ou qu'une seule souche de *M. bovis* circulerait dans les troupeaux est aussi à considérer (Kusiluka, Kokotovic et al. 2000).

Par ailleurs, la légère concordance entre l'excrétion nasale et la séroconversion pourrait s'expliquer par la limite de cette étude, à savoir la sensibilité de l'écouvillonnage nasal à détecter le mycoplasme chez les génisses qui portent le mycoplasme sans l'excréter et par le phénomène de l'intermittence de l'excrétion nasale détecté par ce travail.

Des études seraient toutefois nécessaires pour vérifier ces hypothèses et plus précisément des études épidémiologiques à l'échelle moléculaire.

Ces recherches viendraient identifier les souches de *M. bovis* qui circuleraient dans les troupeaux de bovins laitiers au Québec et pourraient par la même évaluer leur pathogénie et décrire leur transmission.

2. Choix des indicateurs épidémiologiques dans l'étude de la dynamique de transmission de *M. bovis* chez les génisses

Dans cette étude, les résultats de séropositivité des génisses ne pourront pas être utilisés pour l'évaluation de la dynamique de transmission de *M. bovis*. En effet, ces résultats ont montré que les premiers cas séropositifs sont apparus à la même période et cela dans les 4 troupeaux. Cette période s'est située en moyenne à l'âge d'un mois après la naissance. D'un autre côté, les génisses ont consommé à leurs naissances du colostrum frais provenant entre 80% et 100% de leurs mères. Ces données nous suggèrent qu'il s'agit probablement du transfert passif des anticorps maternels comme cela a été rapporté par l'étude expérimentale de Calloway et al. (2008). Ces derniers ont montré le transfert passif des anticorps maternels par le colostrum et ont conclu par ailleurs que ces anticorps maternels ne garantissaient pas aux génisses la protection contre l'infection à *M. bovis* (Calloway, Schultz et al. 2008).

En conclusion, l'étude de la dynamique de transmission de *M. bovis* par la variable séropositivité chez les génisses à cet âge serait biaisée par le transfert passif des anticorps maternels et par conséquent ne serait pas un bon indicateur dans l'étude de la dynamique de transmission du mycoplasme.

3. Étude de la dynamique de transmission de *M. bovis*

La dynamique de transmission a été évaluée par l'incidence cumulée et par l'analyse de survie pour les variables excrétion nasale et séroconversion à *M. bovis*.

Les résultats ont montré une dynamique de transmission significativement différente entre les troupeaux, et cette dynamique a semblé dépendre de la variable analysée, c'est-à-dire que cette différence ne concernait pas les mêmes troupeaux selon que l'analyse soit effectuée par l'excrétion nasale ou par la séroconversion.

Quelle que soit la variable utilisée dans l'étude de la dynamique de transmission, une différence significative entre les troupeaux a été constatée, et la cause la plus probable est la différence dans la régie de troupeau et plus spécifiquement, le mode de gestion du logement des génisses et le traitement antibiotique administré dès la naissance comme cela a été rapporté par la littérature (Soehnlén, Aydin et al. 2012).

Dans cet ordre d'idée, les génisses des troupeaux A et B pouvaient avoir un contact direct nez à nez, et elles étaient logées dès la naissance à l'intérieur de bâtiment, ce qui aurait pu favoriser la dissémination du mycoplasme par l'excrétion nasale. La transmission aurait pu se produire suite au contact direct avec un animal excréteur nasal de *M. bovis* ou indirectement par les aérosols infectés par le mycoplasme ou par du matériel infecté (Maunsell et Donovan 2009). Alors que cette dissémination aurait été ralentie dans le troupeau D comparativement aux deux autres troupeaux, probablement grâce au logement individuel des génisses à l'extérieur où elles ne pouvaient avoir de contact direct entre elles. En plus de l'absence de contact et donc de transmission directe d'une génisse à l'autre, ce ralentissement dans la dissémination pourrait s'expliquer par le fait que le mycoplasme serait moins résistant à l'extérieur (Pfützner 1984; Nagatomo, Takegahara et al. 2001) probablement à cause de l'effet de dessiccation des vents. Ce facteur viendrait également limiter la contamination d'une génisse indemne logée dans un box où auparavant était logée une génisse infectée par *M. bovis* (Maunsell et Cohan 2009).

En revanche, la dynamique de transmission évaluée par la séroconversion a montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les troupeaux B et D.

Dans le troupeau B, les génisses étaient logées dès la naissance en groupe avec d'autres génisses plus âgées et dans le même bâtiment que les vaches adultes. Dans la littérature, ce mode de logement a été identifié comme facteur de risque de développement de maladies respiratoires (Gulliksen, Jor et al. 2009). De même que pour les génisses du troupeau D, elles avaient en majorité séroconverties après avoir été logées en groupe avec des génisses plus âgées. Alors que pour le troupeau A, les premiers cas de séroconversion sont apparus

bien plus tardivement que le troupeau B et D, probablement grâce au logement individuel des génisses dans une pouponnière jusqu'à l'âge du sevrage ce qui aurait diminué le risque de séroconversion.

Cette disparité dans la dynamique de transmission entre les troupeaux selon la variable analysée pourrait s'expliquer par la légère concordance entre le statut de séroconversion et le statut d'excrétion nasale de *M. bovis* montré par cette étude, et dont les causes probables ont été énumérées précédemment (voir le 1^{er} paragraphe de la discussion).

En plus, à cause de la particularité du mycoplasme à être porté chez l'animal sans que cela induise une séroconversion (Bennett et Jasper 1977), il serait difficile de déterminer laquelle des deux variables serait la mieux indiquée pour évaluer la dynamique de transmission de *M. bovis* ou si ces deux variables pouvaient apporter des informations complémentaires. Toutefois, et d'un point de vue épidémiologique, il faut préciser que ces deux variables ne représenteraient pas le même événement. Une séroconversion indique certainement l'exposition et l'augmentation du taux d'anticorps à *M. bovis*. Alors que l'excrétion nasale n'indique que la colonisation des voies respiratoires supérieures sans augmentation systématique du taux d'anticorps circulants.

En conclusion, le logement des génisses et cela dès la naissance aurait fort probablement un impact sur la dynamique de transmission de *M. bovis* chez les génisses de remplacement comme cela a été rapporté récemment dans la littérature (Soehnlén, Aydin et al. 2012). Cependant, d'autres études impliquant un plus grand nombre de troupeaux seraient nécessaires pour identifier les facteurs de risque de régie de troupeau associés au développement d'infections à *M. bovis*.

Une parenthèse doit être ouverte pour discuter plus en détail des résultats du troupeau C. Les résultats négatifs de ce troupeau concernant l'excrétion nasale et la séroconversion à *M. bovis* des génisses alors que ce troupeau présentait le même historique d'infection à *M. bovis* que les autres troupeaux ne peuvent être expliqués. Néanmoins, l'hypothèse que le traitement systématique des

génisses à la naissance aurait influencé négativement les résultats reste fort plausible et vient d'être supportée par l'étude de Soehnlén, Aydin et al. qui rapporte qu'avant l'âge de 50 jours, la vaccination, le traitement ou les mesures prophylactiques ciblant l'élimination du mycoplasme d'un troupeau sont des facteurs qui diminuent la prévalence de *M. bovis* chez les jeunes bovins (Soehnlén, Aydin et al. 2012). Par ailleurs, il a été rapporté dans la littérature que l'excrétion nasale de *M. bovis* débutait à un jeune âge, à moins d'une semaine (Bennett et Jasper 1977). Dans le troupeau C, le traitement antibiotique administré aux génisses dès la naissance a fort probablement réduit la transmission de *M. bovis* à cet âge (Soehnlén, Aydin et al. 2012) ce qui aurait diminué plus tardivement sa propagation.

Toutefois, ces résultats ne permettent pas de conclure si *M. bovis* existe toujours dans ce troupeau ou si ce dernier est devenu indemne, bien que tous les résultats de séroconversion et de culture (lait et excrétion nasale) soient négatifs que ce soit chez les génisses ou chez les vaches adultes.

Ajoutons en dernier que le diagnostic de vaches séropositives dans ce troupeau ne renseigne aucunement sur le statut infectieux du troupeau vis-à-vis de *M. bovis*, car on ignore à l'heure actuelle la durée de persistance des anticorps dans le sang.

4. Le modèle de transmission de *M. bovis*

Les résultats de cette étude nous suggèrent que la transmission de *M. bovis* des vaches adultes à leurs génisses par les deux principales voies de transmission à savoir l'excrétion nasale et le lait était faible. D'un autre côté, les données sérologiques du premier mois après la naissance des génisses ont montré que la prévalence chez les génisses était significativement plus élevée que la prévalence chez les mères. En d'autres termes, des génisses ont été diagnostiquées séropositives alors que leurs mères sont séronégatives. Ce qui nous suggère fortement que les mères ne sont pas la seule source de contamination des génisses et que ces dernières sont exposées à *M. bovis* par une autre source que de leurs mères.

Par ailleurs, la moyenne d'âge d'une 1^{ère} excrétion nasale était approximativement de 2,5 mois dans les différents troupeaux, ce qui est bien supérieur à ce qui a été rapporté par la littérature. En effet, deux études ont conclu que l'excrétion nasale de *M. bovis* atteignait le pic entre 3 et 3,5 semaines d'âge (Stipkovits, Ripley et al. 2000; Maunsell, Donovan et al. 2009). D'un autre côté la moyenne d'âge d'une 1^{ère} séroconversion variait significativement entre les troupeaux (approximativement : 2 ; 2,5 et 5 mois respectivement dans les troupeaux B, D et A).

Quel que soit l'âge de la transmission de *M. bovis* (évalué par une 1^{ère} excrétion nasale ou par une 1^{ère} séroconversion), cette période de la vie d'une génisse est bien loin de la période néonatale, ce qui diminue encore plus la probabilité de la transmission directe des mères aux génisses. Ces résultats nous suggèrent qu'à l'échelle du troupeau, la transmission s'opère en moyenne à l'âge où les génisses entrent en contact direct ou indirect avec d'autres génisses excrétrices nasales de *M. bovis*.

Ces données viennent supporter ce qui a été suggéré dans la littérature concernant le modèle de transmission de *M. bovis* dans les troupeaux de bovins laitiers. En effet, dans ce modèle il a été suggéré qu'au tout début de l'introduction de *M. bovis* dans un troupeau laitier, ce sont les vaches adultes qui transmettent le mycoplasme aux génisses. Ces dernières, deviennent des porteurs sains et n'excrètent que peu ou pas du tout (Bennett et Jasper 1977; Pfützner et Sachse 1996). Ensuite les génisses continuent de se transmettre le mycoplasme entre elles que ce soit par contact direct ou indirect par la voie des sécrétions des voies respiratoires (Bennett et Jasper 1977; Tschopp, Bonnemain et al. 2001).

5. Les proportions des résultats positifs de cultures nasales et des résultats sérologiques

Les résultats de cette étude concernant la proportion des cultures nasales positives à *M. bovis* ont montré que cette dernière était beaucoup plus importante chez les génisses que chez les vaches (approximativement de 17

fois supérieure. Alors que la proportion des résultats de culture nasale pour *Mycoplasma* spp. n'était que de 2 fois supérieures chez les génisses que chez les vaches. Les données actuelles de la littérature ne permettent pas une analyse comparative de ces résultats.

Quant aux proportions des prélèvements séropositifs, l'analyse a montré que dans les 4 troupeaux, plus de la moitié des prélèvements étaient positifs, ce qui est bien plus élevé par rapport à ce qui a été rapporté dans la littérature (Burnens, Bonnemain et al. 1999). Et lorsqu'on compare les proportions des génisses aux proportions des vaches adultes, on constate que les proportions étaient approximativement égales.

6. Description du patron de l'excrétion nasale de *M. bovis*

L'observation du patron d'excrétion nasale de *M. bovis* chez les génisses jusqu'à l'âge de 7 mois, a permis de constater que l'excrétion du mycoplasme se faisait d'une façon intermittente.

La conception de l'étude quant au mode de prélèvement, c'est-à-dire l'écouvillonnage nasal, fait qu'on ne peut conclure s'il s'agit d'une vraie intermittence ou d'une réinfection. Une vraie intermittence suggère que le mycoplasme persiste dans les amygdales comme infection chronique et est excrété d'une façon intermittente à partir de ce réservoir naturel (Maunsell, Donovan et al. 2009). Une réinfection sous-entend que l'animal ne porte plus le mycoplasme dans les voies respiratoires supérieures (aucune infection des amygdales) et qu'ensuite il se réinfecte et peut être excrété. Dans la littérature scientifique, aucune donnée n'a été rapportée à ce jour concernant l'intermittence de l'excrétion nasale de *M. bovis*. Ainsi, d'autres études avec un autre mode d'échantillonnage seraient nécessaires pour pouvoir quantifier l'intermittence de l'excrétion nasale de *M. bovis* chez les génisses de remplacement. On pourrait effectuer simultanément sur la même génisse 2 prélèvements, le 1^{er} serait un écouvillonnage de la muqueuse nasale et le 2^{ème} un écouvillonnage des amygdales. Une comparaison entre les résultats des 2 prélèvements permettrait de quantifier l'intermittence de l'excrétion nasale et

permettrait également de répondre à la question posée précédemment à savoir s'il s'agirait d'une vraie intermittence ou une réinfection. Or, un tel mode d'échantillonnage aurait été difficilement réalisable dans une étude de cohorte comme l'étude actuelle, principalement à cause des contraintes logistiques, et serait mieux adapté à des études expérimentales.

7. Les Limites de l'étude

Les limites constatées suite à l'analyse et à l'interprétation des résultats de cette étude sont :

- L'intermittence de l'excrétion nasale de *M. bovis* aurait pu influencer ces résultats comme cela était suggéré dans la littérature (Bennett et Jasper 1977) et par les résultats de cette étude.
- Le traitement antibiotique administré aux génisses dès la naissance dans le troupeau C aurait pu avoir un impact sur le diagnostic de *M. bovis* des premiers prélèvements que ce soit par le test ELISA ou par le test de mise en culture (Allen, Viel et al. 1991; Thomas, Ball et al. 2002).

CONCLUSION

Ce travail a permis d'étudier la transmission et la réponse sérologique à *M. bovis* chez les génisses de remplacement dans 4 troupeaux de bovins laitiers au Québec de la naissance à 7 mois d'âge. Cette étude s'inscrit donc parmi les études les plus fortes en matière de causalité, et représente le plus la réalité quant au phénomène étudié, car les animaux sont observés dans leur milieu naturel.

Les résultats de cette étude ont montré que la dynamique de transmission et la réponse sérologique à *M. bovis* étaient différentes entre les troupeaux et différents facteurs auraient influencé ces résultats, comme le logement des génisses ou le traitement antibiotique administré dès la naissance.

Les résultats ont également montré que la transmission de *M. bovis* des mères aux génisses n'a joué qu'un rôle mineur dans la transmission du mycoplasme. La principale voie de transmission s'est opérée parmi les génisses de remplacement que ce soit par contact direct ou indirect, ce qui a maintenu le réservoir de l'infection parmi ces génisses.

De plus, cette étude a montré que la concordance entre l'excrétion nasale de *M. bovis* et la séroconversion contre *M. bovis* était légère chez la génisse de moins de 7 mois. L'hypothèse émise était la différence de souches de *M. bovis* qui circuleraient entre les troupeaux et au sein d'un même troupeau et qui auraient une variabilité dans la virulence et dans le pouvoir de transmission.

Enfin, une intermittence de l'excrétion nasale existerait et reste à décrire plus en détail par d'autres recherches.

D'autres études seraient toutefois nécessaires afin de comparer les résultats de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- al-Aubaidi, J. M. and J. Fabricant (1971). "The practical application of immunofluorescence (agar block technic) for the identification of *Mycoplasma*." Cornell Vet **61**(3): 519-542.
- Allen, J. W., L. Viel, et al. (1991). "The microbial flora of the respiratory tract in feedlot calves: associations between nasopharyngeal and bronchoalveolar lavage cultures." Can J Vet Res **55**(4): 341.
- Ames, T. R. (1997). "Dairy calf pneumonia. The disease and its impact." Vet Clin North Am Food Anim Pract **13**(3): 379-391.
- Arcangioli, M. A., A. Duet, et al. (2008). "The role of *Mycoplasma bovis* in bovine respiratory disease outbreaks in veal calf feedlots." Vet J **177**(1): 89-93.
- Ayling, R., S. Baker, et al. (2000). "Comparison of in vitro activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tilmicosin against *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* small colony type." Vet Rec **146**(9): 243.
- Ball, H. J., G. A. Craig Reilly, et al. (1995). "Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma bovis* strains isolated in Northern Ireland." Irish Vet J **48**: 316.
- Bennett, R. H. and D. E. Jasper (1977). "Nasal prevalence of *Mycoplasma bovis* and IHA titers in young dairy animals." Cornell Vet **67**(3): 361-373.
- Bennett, R. H. and D. E. Jasper (1980). "Bovine mycoplasmal mastitis from intramammary inoculations of small numbers of *Mycoplasma bovis*: local and systemic antibody response." Am J Vet Res **41**(6): 889-892.
- Berge, A. C., P. Lindeque, et al. (2005). "A clinical trial evaluating prophylactic and therapeutic antibiotic use on health and performance of preweaned calves." J Dairy Sci **88**(6): 2166-2177.
- Bergeron, L., D. Francoz, et al. (2010). Enquête sur la prévalence des mycoplasmes dans le lait de réservoir des troupeaux de bovins laitiers du Québec, MAPAQ.
- Binder, A., G. Amtsberg, et al. (1990). "Examination of cattle with respiratory diseases for *Mycoplasma* and bacterial bronchopneumonia agents." Zentralbl Veterinarmed B **37**(6): 430.
- Blackburn, P., C. Brooks, et al. (2008). "Filtration of homogenised tissue samples to improve the diagnostic detection of *Mycoplasma bovis* by sandwich ELISA." Vet Rec **163**(17): 514-515.
- Bryson, D. G. (1985). "Calf pneumonia." Vet Clin North Am Food Anim Pract **1**(2): 237-257.
- Burnens, A. P., P. Bonnemain, et al. (1999). "Study on the seroprevalence of infections by *Mycoplasma bovis* in Swiss cattle including epidemiological analysis of risk factors in a local population (Jura region)." Schweiz Arch Tierheilkd **141**: 455-460.
- Butler, J. A., S. A. Sickles, et al. (2000). "Pasteurization of discard mycoplasma mastitic milk used to feed calves: thermal effects on various mycoplasma." J Dairy Sci **83**(10): 2285-2288.

- Byrne, W., B. Markey, et al. (2005). "Persistence of *Mycoplasma bovis* infection in the mammary glands of lactating cows inoculated experimentally." *Vet Rec* **156**(24): 767-771.
- Cai, H. Y., P. Bell-Rogers, et al. (2005). "Development of a real-time PCR for detection of *Mycoplasma bovis* in bovine milk and lung samples." *J Vet Diagn Invest* **17**(6): 537-545.
- Calloway, C. D., L. G. Schultz, et al. (2008). "Determination of serologic and colostral response in late-gestation cows vaccinated with a *Mycoplasma bovis* bacterin." *Am J Vet Res* **69**(7): 912-915.
- Caswell, J. L. and M. Archambault (2007). "Mycoplasma bovis pneumonia in cattle." *Anim Health Res Rev* **8**(2): 161-186.
- Caswell, J. L., K. G. Bateman, et al. (2010). "Mycoplasma bovis in respiratory disease of feedlot cattle." *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **26**(2): 365-379.
- Citti, C. and R. Rosengarten (1997). "Mycoplasma genetic variation and its implication for pathogenesis." *Wien Klin Wochenschr* **109**(14-15): 562.
- Dohoo, I. R., Martin, W., Stryhn, H. (2009). *Veterinary Epidemiologic Research*, VER Inc., Charlottetown, Prince Edward Island, Canada. 91-134.
- Foote, M. R., B. J. Nonnecke, et al. (2005). "Effects of age and nutrition on expression of CD25, CD44, and L-selectin (CD62L) on T-cells from neonatal calves." *J Dairy Sci* **88**(8): 2718-2729.
- Foster, A. P., R. D. Naylor, et al. (2009). "Mycoplasma bovis and otitis in dairy calves in the United Kingdom." *Vet J* **179**(3): 455-457.
- Fox, L. K., D. D. Hancock, et al. (2003). "Bulk tank milk analysis: factors associated with appearance of *Mycoplasma* sp. in milk." *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **50**(5): 235-240.
- Fox, L. K., J. H. Kirk, et al. (2005). "Mycoplasma mastitis: a review of transmission and control." *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **52**(4): 153-160.
- Fox, L. K., F. J. Muller, et al. (2008). "Clinical *Mycoplasma bovis* mastitis in prepubertal heifers on 2 dairy herds." *Can Vet J* **49**(11): 1110.
- Francoz, D., G. Fecteau, et al. (2004). "Otitis media in dairy calves: A retrospective study of 15 cases (1987 to 2002)." *Can Vet J* **45**(8): 661.
- Francoz, D., M. Fortin, et al. (2005). "Determination of *Mycoplasma bovis* susceptibilities against six antimicrobial agents using the E test method." *Vet Microbiol* **105**(1): 57-64.
- Gagea, M. I., K. G. Bateman, et al. (2006a). "Naturally occurring *Mycoplasma bovis*-associated pneumonia and polyarthritis in feedlot beef calves." *J Vet Diagn Invest* **18**(1): 29-40.
- Gagea, M. I., K. G. Bateman, et al. (2006b). "Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots." *J Vet Diagn Invest* **18**(1): 18-28.
- Gerchman, I., S. Levisohn, et al. (2009). "In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolated in Israel from local and imported cattle." *Vet Microbiol* **137**(3-4): 268-275.

- Godinho, K. S., P. Sarasola, et al. (2007). "Use of deep nasopharyngeal swabs as a predictive diagnostic method for natural respiratory infections in calves." *Vet Rec* **160**(1): 22-25.
- Gonzalez, R. N. and P. M. Sears (1994). "Diagnosis, control, and effect on milk production of *Mycoplasma bovis* intramammary infections. En." *Proc. XVIII World Buiatrics Cong*: 681-684.
- Gonzalez, R. N. and D. J. Wilson (2003). "Mycoplasmal mastitis in dairy herds." *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **19**(1): 199-221.
- Gourlay, R. N., L. H. Thomas, et al. (1989). "Increased severity of calf pneumonia associated with the appearance of *Mycoplasma bovis* in a rearing herd." *Vet Rec* **124**(16): 420-422.
- Gulliksen, S. M., E. Jor, et al. (2009). "Respiratory infections in Norwegian dairy calves." *J Dairy Sci* **92**(10): 5139-5146.
- Hale, H. H., C. F. Helmboldt, et al. (1962). "Bovine mastitis caused by a *Mycoplasma* species." *Cornell Vet* **52**: 582-591.
- Hewicker-Trautwein, M., M. Feldmann, et al. (2002). "Outbreak of pneumonia and arthritis in beef calves associated with *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma californicum*." *Vet Rec* **151**(23): 699-703.
- Hirose, K., H. Kobayashi, et al. (2003). "Isolation of mycoplasmas from nasal swabs of calves affected with respiratory diseases and antimicrobial susceptibility of their isolates." *J Vet Med B* **50**(7): 347-351.
- Houghton, S. B. and R. N. Gourlay (1983). "Synergism between *Mycoplasma bovis* and *Pasteurella haemolytica* in calf pneumonia." *Vet Rec* **113**(2): 41-42.
- Houlihan, M. G., B. Veenstra, et al. (2007). "Mastitis and arthritis in two dairy herds caused by *Mycoplasma bovis*." *Vet Rec* **160**(4): 126.
- Howard, C., R. Gourlay, et al. (1980). "Immunity to *Mycoplasma bovis* infections of the respiratory tract of calves." *Res Vet Sci* **28**(2): 242-249.
- Justice-Allen, A., J. Trujillo, et al. (2010). "Survival and replication of *Mycoplasma* species in recycled bedding sand and association with mastitis on dairy farms in Utah." *J Dairy Sci* **93**(1): 192-202.
- Knudtson, W. U., D. E. Reed, et al. (1986). "Identification of *Mycoplasmatales* in pneumonic calf lungs." *Vet Microbiol* **11**(1-2): 79-91.
- Kusiluka, L. J. M., B. Kokotovic, et al. (2000). "Genetic variations among *Mycoplasma bovis* strains isolated from Danish cattle." *Fems microbiology letters* **192**(1): 113-118.
- Lamm, C. G., L. Munson, et al. (2004). "Mycoplasma otitis in California calves." *J Vet Diagn Invest* **16**(5): 397.
- Le Grand, D. and M. Arcangioli (2008). "News on *Mycoplasma* and Bovine Mycoplasmosis." *Bull Acad Vet Fr* **161**(2): 159-166.
- Le Grand, D., P. Bézille, et al. (2002). "Serological prevalence of *Mycoplasma bovis* infection in suckling beef cattle in France." *Vet Rec* **150**(9): 268.
- Le Grand, D., F. Poumarat, et al. (1997). "Bovine mycoplasmosis caused by *Mycoplasma bovis*." *Point Veterinaire* **28**(180): 23-30.

- Le Grand, D., M. Solsona, et al. (1996). "Adaptive surface antigen variation in *Mycoplasma bovis* to the host immune response." FEMS Microbiology Letters **144**(2-3): 267-275.
- Lysnyansky, I., I. Mikula, et al. (2009). "Rapid detection of a point mutation in the *parC* gene associated with decreased susceptibility to fluoroquinolones in *Mycoplasma bovis*." Antimicrob Agents Chemother **1**: 00703-00709.
- Maeda, T., T. Shibahara, et al. (2003). "Mycoplasma bovis-associated suppurative otitis media and pneumonia in bull calves." J Compar Path **129**(2-3): 100-110.
- Marenda, M., V. Barbe, et al. (2006). "A new integrative conjugative element occurs in *Mycoplasma agalactiae* as chromosomal and free circular forms." J Bacteriol **188**(11): 4137-4141.
- Maunsell, F. P. (2007). Mycoplasma bovis infection of dairy calves. University of Florida Ph.D., University of Florida.
- Maunsell, F. P. and J. N. Cohan (2009). Factors associated with mycoplasma colonization of dairy calves in a herd with endemic mycoplasmal disease. International conference on bovine mycoplasmosis, Saskatchewan, Canada.
- Maunsell, F. P. and G. A. Donovan (2009). "Mycoplasma bovis infections in young calves." Vet Clin North Am Food Anim Prac **25**(1): 139-177.
- Maunsell, F. P., G. A. Donovan, et al. (2009). "Field evaluation of a *Mycoplasma bovis* bacterin in young dairy calves." Vaccine **27**(21): 2781-2788.
- McAuliffe, L., R. D. Ayling, et al. (2008). "Biofilm-grown *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC exhibit both phenotypic and genotypic variation compared with planktonic cells." Vet Microbiol **129**(3-4): 315-324.
- McAuliffe, L., R. J. Ellis, et al. (2006). "Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival." Microbiology **152**(Pt 4): 913-922.
- Nagatomo, H., T. Shimizu, et al. (1996). "Antibody response to *Mycoplasma bovis* of calves introduced to a farm contaminated with the organism." J Vet Med Sci **58**(9): 919-920.
- Nagatomo, H., Y. Takegahara, et al. (2001). "Comparative studies of the persistence of animal mycoplasmas under different environmental conditions." Vet microbiol **82**(3): 223-232.
- Nicholas, R. A. and R. D. Ayling (2003). "Mycoplasma bovis: disease, diagnosis, and control." Res Vet Sci **74**(2): 105-112.
- Nicholas, R. A., R. D. Ayling, et al. (2002). "An experimental vaccine for calf pneumonia caused by *Mycoplasma bovis*: clinical, cultural, serological and pathological findings." Vaccine **20**(29-30): 3569-3575.
- Otagiri, Y., T. Asai, et al. (2005). "Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lung and nasal swab samples from pigs by nested PCR and culture methods." J Vet Med Sci **67**(8): 801-805.
- Pfützner, H. (1984). "The tenacity of *Mycoplasma bovis*." Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A **258**(1): 38-41.

- Pfützner, H. and K. Sachse (1996). "Mycoplasma bovis as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle." Rev Sci Tech **15**(4): 1477-1494.
- Poulsen, K. P. and S. M. McGuirk (2009). "Respiratory disease of the bovine neonate." Vet Clin North Am: Food Anim Pract **25**(1): 121-137.
- Poumarat, F., M. Solsona, et al. (1994). "Genomic, protein and antigenic variability of mycoplasma bovis." Vet Microbiol **40**(3-4): 305-321.
- Punyapornwithaya, V., L. K. Fox, et al. (2009). "Short communication: The effect of centrifugation and resuspension on the recovery of Mycoplasma species from milk." J Dairy Sci **92**(9): 4444-4447.
- Riekerink, R. G. M. O., H. W. Barkema, et al. (2006). "Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island." Can Vet J **47**(6): 567.
- Rosendal, S. and S. W. Martin (1986). "The association between serological evidence of mycoplasma infection and respiratory disease in feedlot calves." Can J Vet Res **50**(2): 179.
- Rosengarten, R. (1999). "The role of ruminant mycoplasmas in systemic infection. In: Stipkovits, L. Rosengarten, R. and Frey. (eds) Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics." European commission, Brussels. **3**: 14-17.
- Rosengarten, R., A. Behrens, et al. (1994). "Antigen heterogeneity among isolates of Mycoplasma bovis is generated by high-frequency variation of diverse membrane surface proteins." Infection and immunity **62**(11): 5066.
- Rosengarten, R., C. Citti, et al. (2000). "Host-pathogen interactions in mycoplasma pathogenesis: virulence and survival strategies of minimalist prokaryotes." Int J Med Microbiol **290**(1): 15-25.
- Sachse, K., H. S. Salam, et al. (2010). "Use of a novel real-time PCR technique to monitor and quantitate Mycoplasma bovis infection in cattle herds with mastitis and respiratory disease." Vet J **186**(3): 299-303.
- Shahriar, F. M., E. G. Clark, et al. (2002). "Coinfection with bovine viral diarrhea virus and Mycoplasma bovis in feedlot cattle with chronic pneumonia." Can Vet J **43**(11): 863-868.
- Simmons, W. L. and K. Dybvig (2009). "Mycoplasma biofilms ex vivo and in vivo." Fems Microbiology Letters **295**(1): 77-81.
- Sirand-Pugnet, P., C. Lartigue, et al. (2007). "Being pathogenic, plastic, and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome." PLoS Genet **3**(5): e75.
- Soehnen, M., A. Aydin, et al. (2011). "Blinded, controlled field trial of two commercially available Mycoplasma bovis bacterin vaccines in veal calves." Vaccine **29**(33): 5347-5354.
- Soehnen, M., A. Aydin, et al. (2012). "Epidemiology of Mycoplasma bovis in Pennsylvania veal calves." J Dairy Sci **95**(1): 247-254.
- Stipkovits, L., P. Ripley, et al. (2000). "Clinical study of the disease of calves associated with Mycoplasma bovis infection." Acta Vet Hung **48**(4): 387-395.

- Stipkovits, L., P. H. Ripley, et al. (2001). "Use of valnemulin in the control of *Mycoplasma bovis* infection under field conditions." Vet Rec **148**(13): 399-402.
- ter Laak, E. A., J. H. Noordergraaf, et al. (1992). "The nasal mycoplasmal flora of healthy calves and cows." Zentralbl Veterinarmed B **39**(8): 610-616.
- Thomas, A., H. Ball, et al. (2002). "Isolation of mycoplasma species from the lower respiratory tract of healthy cattle and cattle with respiratory disease in Belgium." Vet Rec **151**(16): 472-476.
- Thomas, A., I. Dizier, et al. (2003). "Mycoplasma bovis in the bovine respiratory disease complex and its in vitro cytoadherence." Ann Med Vet **147**: 267-272.
- Thomas, A., I. Dizier, et al. (2002). "Comparison of sampling procedures for isolating pulmonary mycoplasmas in cattle." Vet Res Commun **26**(5): 333-339.
- Tola, S., A. Angioi, et al. (1997). "Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction." Vet Microbiol **54**(1): 17-22.
- Tschopp, R., P. Bonnemain, et al. (2001). "Epidemiological study of risk factors for *Mycoplasma bovis* infections in fattening calves." Schweiz Arch Tierheilkd **143**(9): 461.
- Virtala, A. M., G. D. Mechor, et al. (1996). "Epidemiologic and pathologic characteristics of respiratory tract disease in dairy heifers during the first three months of life." J Am Vet Med Assoc **208**(12): 2035-2042.
- Walz, P. H., T. P. Mullaney, et al. (1997). "Otitis media in preweaned Holstein dairy calves in Michigan due to *Mycoplasma bovis*." J Vet Diagn Invest **9**(3): 250-254.
- Wiggins, M. C., A. R. Woolums, et al. (2011). "The effect of various *Mycoplasma bovis* isolates on bovine leukocyte responses." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **34**(1): 49-54.
- Wilson, D. J., G. Goodell, et al. (2009). "Herd-level prevalence of *Mycoplasma* spp mastitis and characteristics of infected dairy herds in Utah as determined by a statewide survey." J Am Vet Med Ass **235**(6): 749-754.
- Wilson, D. J., R. T. Skirpstunas, et al. (2007). "Unusual history and initial clinical signs of *Mycoplasma bovis* mastitis and arthritis in first-lactation cows in a closed commercial dairy herd." J Am Vet Med Ass **230**(10): 1519-1523.
- Woldehiwet, Z., B. Mamache, et al. (1990). "Effects of age, environmental temperature and relative humidity on the colonization of the nose and trachea of calves by *Mycoplasma* spp." Br Vet J **146**(5): 419-424.

ANNEXES

ANNEXE I

Composition du milieu Hayflick

PPLO agar ou PPLO bouillon.

Rouge phénol 0,5%.

Enrichissement (composé de sérum de cheval, sérum de porc, extrait de levure maison, D.N.A. 0,2% et ampicilline).

β -Nad 1%.

Acétate de thallium 10%.

ANNEXE II

Principe du test ELISA

Les échantillons de sérum bovin étaient dilués puis incubés dans des puits où sont absorbés des antigènes (Ag) spécifiques à *M. bovis*. Les anticorps (Ac) spécifiques à *M. bovis* dans les échantillons de sérum positifs se sont fixés aux Ag dans les puits. Les substances non liées sont éliminées par lavage et un conjugué (un Ac couplé à une enzyme) dirigé contre les Ac bovins était ajouté. Après incubation, l'excédent de conjugué était éliminé par lavages successifs. La liaison du conjugué aux Ac bovins était révélée avec un substrat chromogène. En présence de la portion enzymatique du conjugué, le chromogène réagissait et provoquait le développement d'une coloration bleue. La réaction enzymatique était arrêtée (la couleur passait du bleu au jaune) et les densités optiques (DO) étaient mesurées. L'intensité de la coloration indiquait la nature des échantillons. Un échantillon négatif était révélé par une réaction (jaune pâle) alors qu'un échantillon fortement positif était révélé par une réaction forte (jaune foncé). Toute intensité de réaction se situant entre le jaune foncé et le jaune pâle représentait divers degrés de positivité (Référence : la charte d'utilisation de la trousse ELISA de Biovet Canada).

Calcul du seuil de positivité

Le seuil de positivité était calculé selon la formule indiquée sur la charte d'utilisation de la trousse ELISA. La formule consiste en la multiplication de la moyenne des densités optiques pour le contrôle positif par 0,3.

Deux critères devaient être réunis pour que l'épreuve soit validée :

- La moyenne des DO obtenue pour le contrôle négatif devait être inférieure au seuil de positivité.
- La moyenne des DO obtenue pour le contrôle positif devait être supérieure ou égale à 1,0.

Interprétation des résultats

Les DO des échantillons ont été interprétés comme suit :

- Si la moyenne des DO obtenue pour l'échantillon était inférieure au seuil de positivité, ce dernier était considéré négatif.
- Si la moyenne des DO obtenue pour l'échantillon était supérieure ou égale au seuil de positivité, ce dernier était considéré positif.

Les variations des DO des échantillons ont été interprétées et classifiées selon les recommandations du fabricant et sont présentées dans le tableau suivant :

Intervalle	Interprétation
DO échantillon < Seuil	Négatif
Seuil < DO échantillon < 1,75 * Seuil	+
1,75 * Seuil < DO échantillon < 2,3 * Seuil	++
2,3 * Seuil < DO échantillon < 3 * Seuil	+++
DO échantillon > 3 * Seuil	++++

Grille d'interprétation des analyses sérologiques par le test ELISA.

ANNEXE III

Le questionnaire

David Francoz

Gilles Fecteau

Geneviève Côté

Jean-Philippe Roy

Olivia Labrecque

[ÉVALUATION DES FACTEURS DE RISQUES ASSOCIÉS À LA PRÉSENCE ET À LA DISSÉMINATION DE M. BOVIS DANS LES TROUPEAUX LAITIERS QUÉBÉCOIS]

Définitions des termes utilisés dans le questionnaire :

Génisse non sevrée : génisse avant le sevrage (arrêt complet du lait)

Génisse sevrée: génisse du sevrage jusqu'à l'âge de la reproduction

Taures : Génisses en âge de reproduction ou gestantes

Vache en lactation : toute vache (premier veau ou plus) en lactation.

Vache tarie : toute vache (premier veau ou plus) au tarissement

Mâle : tout bovin mâle sevré présent dans l'élevage.

Date de réalisation du questionnaire :

1. Description générale du troupeau

Nom de l'éleveur : _____

Nom de la ferme : _____

Adresse : _____

Ville : _____

Code postal : _____

Téléphone : _____

Télécopieur : _____

Courriel : _____

NIM du MAPAQ : _____

NIP valacta : _____

Moyenne de production de lait sur 305 jours₁₀₁ : _____

Quel est (sont) l'âge de(s) la personne(s) responsable(s) du troupeau?₁₀₂

Quel est le nombre d'employés à plein temps (plus de 35h par semaine, en incluant les personnes de la famille)?₁₀₃

_____ employés

Quel est le nombre d'employés à temps partiel (moins de 35h par semaine, en incluant les personnes de la famille)?₁₀₄

_____ employés

L'exploitation laitière est elle le revenu familial principal?₁₀₅

Oui Non

La ferme la plus proche de votre élevage dont la production principale est l'élevage de bovins (tout type de production confondu : vaches laitières, bovins de boucherie, veaux de lait...) se situe à :₁₀₆

Moins de 500 m de 500 m à 1 km à plus de 1 km

Durant les 12 derniers mois, avez-vous partagé (prêt ou emprunt) l'usage de matériel agricole (tracteurs, épandeurs à fumier, autres équipements) avec un autre éleveur de bovins ¹⁰⁷

Oui Non

Si oui décrivez : ¹⁰⁸

2. Suivi du troupeau

Vétérinaire du troupeau : _____

Nom de la clinique : _____

Adresse : _____

Ville : _____

Code postale : _____

Téléphone : _____

Télécopieur : _____

Courriel : _____

Êtes-vous suivi sur une base régulière (1 fois par mois) par un agent-conseil de Valacta?

²⁰¹

Oui non

Utilisez-vous un logiciel à la ferme pour le suivi de santé et de production des vaches? ²⁰²

Oui non

Si oui, lequel : ²⁰³ _____

Description du troupeau

Quelle est la principale race de vache laitière élevée? ³⁰¹

Holstein Jersey Ayrshire Suisse brune

Autre : _____

Y-a-t-il d'autres races laitières dans le troupeau? ³⁰²

Oui Non

Si oui, laquelle? ³⁰³

Holstein Jersey Ayrshire Suisse brune

Autre : _____

Spécifiez les nombres d'animaux de votre troupeau laitier des catégories suivantes en remplissant le tableau suivant (utilisez une estimation, si le nombre exact n'est pas disponible).

	Génisses non sevrées	Génisses sevrées	Taures		Vaches en lactation	Vaches tarées	Mâles
			ouvertes	pleines			
Nombre d'animaux présents lors de la visite	304	305	306	307	308	309	310
Nombre d'animaux vendus (comme un animal qui servira à produire du lait) dans les 12 derniers mois	311	312	313	314	315	316	317
Nombre d'animaux réformés (abattus pour consommation) dans les 12 derniers mois	318	319	320	321	322	323	324
Nombre d'animaux morts (mort naturel ou euthanasié à la ferme) dans les 12 derniers mois	325	326	327	328	329	330	331
Nombre d'animaux achetés ou loués dans les 12 derniers mois	332	333	334	335	336	337	338
Nombre d'animaux achetés ou loués dans les 5 dernières années	339	340	341	342	343	344	345

Quel pourcentage de votre troupeau de vache adulte actuel est né sur la ferme?

³⁴⁶ _____%

Origine des génisses de remplacement :

% nées et élevées sur votre ferme : ³⁴⁷ _____%

% nées et élevées sur une autre ferme : ³⁴⁸ _____%

% nées à votre ferme, mais élevées sur une autre ferme : ³⁴⁹ _____%

3. Description du logement

Génisses non sevrées

Quel est le type de logement utilisé durant les saisons mentionnées?

(faire un X dans la ou les case(s) appropriée(s))

Type de logement		Hiver	Eté
En groupe	≤ 6 génisses	401	402
	>6 génisses	403	404
Hutte (ou box) à veau à l'intérieur		407	406
Hutte à veau à l'extérieur		408	409
A l'attache		410	411

Autres types de logement, précisez :

Est-ce que le logement est nettoyé entre chaque génisse non sevrée ou chaque groupe de génisses non sevrés?⁴¹²

Oui Non

Si oui comment :

Est-ce que le logement est désinfecté entre chaque génisse non sevrées ou chaque groupe de génisses non sevrés?⁴¹³

Oui Non

Si oui comment :

Génisses sevrées

Quel est le type de logement utilisé durant les saisons mentionnées?

(faire un **X** dans la ou les case(s) appropriée(s))

Type de logement		Hiver	Eté
En groupe	≤ 6 génisses	414	415
	>6 génisses	416	417
A l'attache		418	419

Autres types de logement, précisez :

Est-ce que le logement est nettoyé entre chaque groupe de génisses?⁴²⁰

Oui Non

Si oui comment :

Est-ce que le logement est désinfecté entre chaque groupe de génisses?⁴²¹

Oui Non

Si oui comment :

Taures, vaches

Quels sont les types de logements utilisés durant l'hiver / été pour chacune des catégories?

(faire un **X** dans les cases appropriées)

		Été			
		Stabulation libre	Pâturage	Aire d'exercice	Vache à l'attache
Taures	ouverte	422	423	424	425
	pleine	426	427	428	429
Vache en lactation		430	431	432	433
Vache tarie		434	435	436	437
Mâle		438	439	440	441

		Hiver		
		À l'attache	Stabulation libre en logette	Stabulation libre
Taures	ouverte	442	443	444
	pleine	445	446	447
Vache en lactation		448	449	450
Vache tarie		451	452	453
Mâle		454	455	456

Autres types de logement, précisez :

Achats ou locations d'animaux

Précisez vos acquisitions en indiquant le nombre d'animaux achetés durant ces derniers mois. (Utilisez une estimation, si le nombre exact n'est pas disponible)

	Dernier 12 mois	3 dernières années	5 dernières années
Nombre d'animaux achetés	501	502	503
Nombre d'animaux loués	504	505	506

Précisez l'origine des vos acquisition en indiquant le nombre d'animaux achetés selon leur origine durant ces 12 derniers mois (Utilisez une approximation, si le nombre exact n'est pas connu)

	Dernier 12 mois	3 dernières années	5 dernières années
Nombre d'animaux directement acheté ou loué auprès d'autres éleveurs	507	508	509
Nombre d'animaux acheté à des marchands privés ou encan à la ferme	510	511	512
Nombre d'animaux acheté par vente aux enchères	513	514	515

Si vous avez acheté des animaux directement auprès d'éleveur, de combien de fermes différentes avez-vous acheté ou loué des bovins au cours des 5 dernières années?₅₁₆

Les animaux transportés jusqu'à votre ferme, le sont-ils avec votre propre remorque?⁵¹⁹

Oui Non

Si oui, désinfectez-vous votre remorque après chaque transport?⁵²⁰

Oui Non

Si oui, utilisez-vous votre remorque pour d'autres transports?⁵²¹

Oui Non

Si oui, louez-vous ou prêtez-vous votre remorque à d'autres éleveurs?⁵²²

Oui Non

Avant d'introduire un animal dans votre élevage, demandez-vous?

	OUI	NON
Un test négatif (quel qu'il soit) pour le BVD pour l'animal ⁵²³	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Un test négatif pour la leucose pour l'animal ⁵²⁴	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Un test négatif pour l'IBR pour l'animal ⁵²⁵	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Un test négatif pour la néosporose pour l'animal ⁵²⁶	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Un test négatif pour la paratuberculose pour l'animal ⁵²⁷	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Un test négatif pour la paratuberculose pour le troupeau ⁵²⁸	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Un certificat de vaccination ⁵²⁹	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Un comptage somatique bas (<200000 c/ml) pour l'animal ⁵³⁰	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Un comptage bas (<200000 c/ml) du réservoir de lait du troupeau d'origine ⁵³¹	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Une culture bactérienne du lait négative pour les pathogènes majeurs (Staph aureus, streptocoque, mycoplasme) de l'animal ⁵³²	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Une culture bactérienne du réservoir de lait négative pour les pathogènes majeurs (Staph aureus, streptocoque, mycoplasme) du troupeau d'origine ⁵³³	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Autres tests ou critères (non mentionnés ci-dessus) demandés avant l'introduction
d'un animal :

Respectez-vous une quarantaine – isolement de l'animal - avant de le mettre en contact avec vos autres animaux? ⁵³⁴ Oui Non

Si oui, pendant combien de temps isolez-vous l'animal avant de le mettre en contact avec vos animaux? ⁵³⁵ _____

Si oui, l'aire d'isolement sert elle pour une autre activité? ⁵⁵⁰ Oui Non

Si oui, la ou lesquelles? ⁵³⁶ _____

Contacts entre animaux

Existe-t-il un contact physique **quel qu'il soit** entre les catégories suivantes d'animaux? :

	Génisse non sevrée	Génisse sevrée	Taure	Vache en lactation	Vache tarie	Taureau
Génisse non sevrée	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> ⁶⁰¹	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> ⁶⁰²	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> ⁶⁰³	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> ⁶⁰⁴	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> ⁶⁰⁵	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> ⁶⁰⁶
Génisse sevrée		Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> ⁶⁰⁸	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> ⁶⁰⁹	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> ⁶¹⁰	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> ⁶¹¹	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> ⁶¹²
Taure			Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> ⁶¹⁴	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> ⁶¹⁵	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> ⁶¹⁶	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> ⁶¹⁷
Vache en lactation				Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> ⁶¹⁹	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> ⁶²⁰	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> ⁶²¹
Vache tarie					Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> ⁶²³	Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> ⁶²⁴
Taureau						Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> ⁶²⁶

Après leur séparation avec leur mère, mais avant le sevrage, est-ce que les veaux laitiers ont un contact (nez à nez) avec d'autres veaux non-sevrés?⁶²⁶

- Jamais
- Parfois
- Souvent
- Toujours

Après leur séparation avec leur mère, mais avant le sevrage, est ce que les veaux laitiers ont un contact (nez à nez) avec des génisses de remplacement?⁶²⁷

- Jamais
- Parfois
- Souvent
- Toujours

Après leur séparation avec leur mère, mais avant le sevrage, est-ce que les veaux laitiers ont un contact nez à nez avec des vaches adultes?⁶²⁸

- Jamais
- Parfois
- Souvent
- Toujours

Est-ce que les génisses de remplacement (sevrées, mais de moins de 6 mois) ont un contact nez à nez avec des vaches adultes?⁶²⁹

- Jamais
- Parfois
- Souvent
- Toujours

Les visiteurs et les employés utilisent-ils un bain de bottes (pédiluve) pour désinfecter leurs bottes avant d'entrer dans l'étable?⁶³⁰

- Oui Non

Si oui, est ce que les bottes sont lavées à l'eau avant d'utiliser le pédiluve?⁶³¹

Oui Non

Si OUI, combien de fois par mois changez-vous le désinfectant : ⁶³²_____

Si oui, quel désinfectant est utilisé ? ⁶³³_____

Vaccination

Est-ce que vous vaccinez vos animaux?⁷⁰¹ Oui Non

Dans les 12 derniers mois, quels vaccins avez-vous administrés chez :

Génisses non sevrées : ⁷⁰²_____

Génisses sevrées : ⁷⁰³_____

Taures : ⁷⁰⁴_____

Vaches adultes : ⁷⁰⁵_____

Autres bovins : ⁷⁰⁶_____

Est-ce que vous vaccinez vos animaux avant l'âge de 6 mois?⁷⁰⁷ Oui Non

Est-ce que vous avez vacciné des animaux contre le BVD dans les 12 derniers mois?⁷⁰⁸

Oui Non Ne sait pas

Si oui, dans la première année de la vaccination est-ce que les animaux sont revaccinés dans les 2-4 semaines suivant la première administration lors de l'utilisation de vaccin tué?⁷⁰⁹

Oui Non

Si oui, est ce que ces 2 injections sont administrées après que l'animal ait 6 mois d'âge?⁷⁰⁹

Oui Non

Vêlage et gestion des génisses non sevrées

Localisation principale des vêlages en :	Été ⁸⁰¹	Hiver ⁸⁰²
Stabulation libre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
À l'attache	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Stabulation libre à logette	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Box de vêlage	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dans le champ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

À quelle fréquence les veaux naissent-ils ailleurs que dans un box de vêlage (stalles entravées, des logettes, au pâturage ou parmi les autres vaches)? (si le nombre est difficile à estimer, posez-vous la question sur les 10 derniers vêlages)⁸⁰³

- Jamais
- Se produit dans <10% des vêlages
- Se produit dans 10 à 40% des vêlages
- Se produit dans >50% des vêlages
- Se produit toujours

Box de vêlage

Si vous n'utilisez pas d'aire de vêlage spécifique, passez à la section suivante.

Est ce que le box de vêlage a été utilisée à d'autres fins (ex vache malade, boiteuse ou ayant besoin de soins spéciaux) lors de ces 12 derniers mois?⁸⁰⁴

- Oui Non

Si des box de vêlage sont utilisés, à quelle fréquence gardez-vous plus d'une vache dans le box au même moment?⁸⁰⁵

- Jamais
- Se produit dans <10% des vêlages

Se produit dans 10 à 40% des vèlages

Se produit dans >50% des vèlages

Se produit toujours

À quelle fréquence nettoyez-vous et lavez vous à l'eau et au savon complètement le box de vèlage? ⁸⁰⁶

À chaque vèlage

Tous les 2-4 vèlages

Tous les 5 vèlages ou plus

Prise de colostrum et alimentation des génisses non sevrée

Les veaux sont-ils séparés de la vache dans les 30 minutes suivant la naissance? ⁸⁰⁷

- Toujours (>90%)
- Se produit dans > 50% des vêlages
- Se produit dans 10 à 40% des vêlages
- Se produit dans <10% des vêlages
- Jamais

En général, à quel moment les veaux sont-ils séparés de leur mère? ⁸⁰⁹

- Aussitôt que la vache a léché le veau avant la première tétée
- Dans <3 heures après le vêlage
- Dans <12 heures après le vêlage
- Entre 12 et 24 heures après le vêlage
- Plus que 24 heures après le vêlage

Quel est le pourcentage de veau femelle née sur votre ferme qui reste avec leur mère plus de 24 heures ? ⁸¹⁰_____%

En général, les veaux têtent-ils leur mère ou une autre vache? ⁸¹²

- Jamais
- Se produit dans <10% des vêlages
- Se produit dans 10 à 40% des vêlages
- Se produit dans >50% des vêlages
- Toujours

Pourcentage des nouveau-nés femelles recevant :

Du colostrum seulement de sa mère : ⁸¹³_____%

Du colostrum mélangé de plusieurs vaches : ⁸¹⁴_____%

Du colostrum mélangé de vaches testées négatives pour différentes maladies:
⁸¹⁵_____%

Autres : _____ ; _____%

Pourcentage des nouveau-nés femelles recevant :

Du colostrum frais : ⁸¹⁶ _____ %

Du colostrum congelé : ⁸¹⁷ _____ %

Du colostrum fermenté : ⁸¹⁹ _____ %

Du colostrum pasteurisé (traité par la chaleur) : ⁸²⁰ _____ %

Autres : _____ ; ⁸²¹ _____ %

Pourcentage de génisses non sevrées recevant :

Du lait de remplacement (poudre de lait commercial) : ⁸²² _____ %

Un mélange de lait entier provenant de toutes les vaches : ⁸²³ _____ %

Un mélange de lait entier de vache leucose négative : ⁸²⁴ _____ %

Un mélange de lait entier de vache paratuberculose négative : ⁸²⁵ _____ %

Du lait provenant de vache mammitieuse ou à comptage cellulaire élevé ou avec des résidus médicamenteux (antibiotiques) : ⁸²⁶ _____ %

Autres : _____ ; ⁸²⁷ _____ %

Les génisses boivent-elles un mélange de lait entier (lait de réservoir réfrigéré, du pipeline, du bol collecteur de la laiterie ou de plusieurs vaches en lactation, etc.)? ⁸²⁸

Jamais

Une à 2 fois par année

Une à 2 fois par mois

Une à 2 fois par semaine

Toujours

Les génisses boivent-elles du lait non comestible (provenant de vache fraîche vêlée, atteinte de mammitie ou traitée avec un produit avec une période de retrait de lait)? ⁸²⁹

Jamais

Une à 2 fois par année

Une à 2 fois par mois

Une à 2 fois par semaine

Toujours

Si les génisses boivent du lait non comestible, ce lait est-il pasteurisé? ⁸³⁰

Oui Non

Pourcentage de vos génisses alimentées :

Au biberon individuel : ⁸³¹_____%

À une chaudière à tétine collective : ⁸³²_____%

À une chaudière individuelle : ⁸³³_____%

À une chaudière collective : ⁸³⁴_____%

Autres systèmes : ⁸³⁵_____%

Les bouteilles et les seaux d'abreuvement des veaux sont-ils lavés (pas simplement rincés) chaque jour avec de l'eau et du savon? ⁸³⁶

Oui Non

Plusieurs veaux boivent-ils avec la même bouteille ou dans le même seau chaque jour?

⁸³⁷

Oui Non

Si oui, est ce que la bouteille ou le seau est lavé entre chaque veau? ⁸³⁸

Oui Non

Combien de repas de lait les veaux reçoivent-ils par jour? ⁸³⁹

1 repas 3 repas

2 repas 4 repas et plus

Quelle quantité totale de lait est offerte par veau par jour? ⁸⁴⁰

_____ Litres

Prévalence des maladies

Données générales

Pour les 6 derniers mois, fournissez les renseignements suivants pour les génisses âgées jusqu'à 12 mois :

Nombre de génisses décédés : Mortes à la naissance : ⁹⁰¹ _____

Âgées de moins de 24h : ⁹⁰² _____

Âgées de mois d'un mois : ⁹⁰³ _____

Âgées entre 1 et 6 mois : ⁹⁰⁴ _____

Âgées entre 7 et 12 mois : ⁹⁰⁵ _____

Nombre de génisses avec omphalite (nombril infecté) : ⁹⁰⁶ _____

Nombre de génisses avec diarrhée (traité ou pas) : ⁹⁰⁷ _____

Nombre de génisses avec une pneumonie : ⁹⁰⁸ _____

Problème(s) de santé rencontré(s) (plus qu'un cas) cette année dans votre troupeau de vaches, cochez toutes les réponses qui conviennent : ⁹⁰⁹

Fièvre de lait

Avortement

Acétonémie

Rétention placentaire

Métrite

Boiterie

Déplacement de caillette

Mammite

Difficulté au vêlage

Diarrhée

Autres : _____

Actuellement, quel est votre plus gros problème de santé dans votre troupeau? ⁹¹⁰

Maladies des veaux non sevrés et des génisses de moins de 6 mois

Quel pourcentage de vos veaux non sevrés ont des problèmes de:

Pneumonie ⁹¹¹:

Otite (tête penchée) ⁹¹²:

Arthrite ⁹¹³:

Quel pourcentage de vos génisses âgées de moins de 6 mois ont des problèmes de:

Pneumonie ⁹¹⁴:

Otite (tête penchée) ⁹¹⁵:

Arthrite ⁹¹⁶:

Est-ce que c'est la même personne qui s'occupe des soins des veaux et de la traite? ⁹¹⁷

Oui Non

Quel(s) principal antibiotique(s) utilisez-vous (l'éleveur) pour le traitement des infections sur les veaux et les génisses ?

Problème respiratoire ⁹¹⁸:

• _____
• _____

• _____
• _____

Problème d'arthrite ⁹¹⁹:

• _____
• _____

• _____
• _____

Problème de diarrhée ⁹²⁰:

• _____
• _____

• _____
• _____

Problème de tête penchée ⁹²¹:

- _____
- _____

Problème d'ombilic ⁹²²:

- _____
- _____

Mammites

Avez-vous eu de problèmes de comptage cellulaire de lait de réservoir élevé (>250 000 c/ml) dans la dernière année? ⁹²³

Oui Non Ne sait pas

Selon vous, avez-vous des problèmes de mammites contagieuses comme *Staphylococcus aureus* (Staph) par exemple? ⁹²⁴

Oui Non Ne sait pas

Prenez vous des mesures particulières pour le contrôle des mammites et des mammites contagieuses? ⁹²⁴

Oui Non

Si oui, lesquelles :

Avez-vous déjà eu des mammites à mycoplasmes (confirmées par culture ou PCR du lait) dans votre troupeau dans les 2 dernières années? ⁹²⁵

Oui Non Ne sait pas

Si oui, s'agissait-il de *Mycoplasma bovis*? ⁹²⁶

Oui Non Ne sait pas

Si oui, qu'avez-vous fait des animaux?

927 _____

Quel(s) produit(s) de tarissement utilisez-vous? 928

- _____
- _____
- _____
- _____

Avez-vous changé de produit de tarissement dans les 5 dernières années? 929

Oui Non

Si oui, quel(s) produit de tarissement utilisiez-vous avant? 930

- _____
- _____
- _____
- _____

Quel(s) produit(s) de traitement intra-mammaire utilisez-vous ? 931

- _____
- _____
- _____
- _____

Merci d'avoir pris la peine de compléter ce questionnaire.

