# PCAA

## Programme canadien d'adaptation agricole

# *Rapport final*

***Développement d'un test de dépistage rapide pour la paratuberculose chez les ovins vivants.***

Projet # 6432

Centre d'expertise en production ovine du Québec

Juillet 2012 à Novembre 2013

Rédigé par


Yvan L'Homme, Ph.D, ACIA et UdeM
Anne Leboeuf, mv MAPAQ
Julie Arsenault, mv, Ph.D. FMV

Collaboration

Léda Villeneuve, Coresponsable R&D, CEPOQ


Novembre 2013

*Le rapport d'étape transmis au CDAQ en version papier et Word doit inclure :*

- *les biens livrables décrits à l'annexe C de la convention de contribution financière;*
- *les pièces justificatives, numérotées et inscrites dans le document* Plan de financement et conciliation des dépenses*;*
- *les copies des documents de diffusion produits faisant mention de la contribution du PCAA selon les règles de visibilité du Programme.*
- *Agriculture et Agroalimentaire Canada (AAC) s'est engagé à travailler avec des partenaires de l'industrie. Les opinions exprimées dans le présent document sont celles du demandeur et ne sont pas nécessairement partagées par AAC et le CDAQ.*


CDAQ
CONSEIL POUR LE DÉVELOPPEMENT DE L'AGRICULTURE DU QUÉBEC

Agriculture et Agroalimentaire Canada
Agriculture and Agri-Food Canada

# Table des matières


1. *DESCRIPTION DU PROJET* ..... 3
*1.1. Objectif général* ..... 3
*1.2. Objectifs spécifiques* ..... 3
*2. RÉSULTATS ET ANALYSE* ..... 3
*2.1. Résultats obtenus depuis le rapport d'étape (juillet 2013)* ..... 3
*2.1.1. Résultats et analyses de la phase 2.* ..... 3
*2.1.1.1. Mise en contexte.* ..... 3
*2.1.1.2. Matériel et méthodes* ..... 5
*2.1.2. Résultats* ..... 9
*2.1.2.1. Culture* ..... 9
*2.1.2.2. Histologie* ..... 10
*2.1.2.3. PCR sur les fèces* ..... 10
*2.1.2.4. Analyse PCR de pools de fèces.* ..... 10
*2.1.2.5. ELISA* ..... 10
*2.1.3. Discussion* ..... 14
*2.2. Diffusion des résultats* ..... 16
*3. CONCLUSIONS ET SUITE DU PROJET* ..... 20
*4. SOMMAIRE DES ACCOMPLISSEMENTS DU PROJET* ..... 20
*5. PLAN DE FINANCEMENT ET CONCILIATION DES DÉPENSES* ..... 21
*ANNEXE 1 : ARTICLE OVIN QUÉBEC* ..... 22
*ANNEXE 2 : PRÉSENTATION AU CONGRÈS DE BANFF* ..... 28
*ANNEXE 3 : PRÉSENTATION À L'AGA DU CEPOQ* ..... 50
*ANNEXE 4 : PLAN DE FINANCEMENT & CONCILIATION DES DÉPENSES* ..... 71

# 1. *DESCRIPTION DU PROJET*

*** Une partie du financement de ce projet a été fournie par l'entremise des conseils sectoriels du Québec et de l'Ontario qui exécutent le Programme Canadien d'Adaptation Agricole (PCAA) pour le compte d'Agriculture et Agroalimentaire Canada.*

## *1.1. Objectif général*

Développement d'une méthode d'identification des animaux et troupeaux ovins québécois infectés par le Mycobacterium avium paratuberculosis (MAP) responsable de la maladie appelée paratuberculose.

## *1.2. Objectifs spécifiques*

- Améliorer les connaissances et l'expertise pour la détection de MAP chez les ovins.
- Développer et évaluer des méthodes diagnostiques rapides et efficaces pour le MAP dans les matières fécales et le lait.
- Fournir les outils nécessaires pour les études de prévalence et les méthodes de contrôles.
- Offrir une approche diagnostique accessible.

# *2. RÉSULTATS ET ANALYSE*

## *2.1. Résultats obtenus depuis le rapport d'étape (juillet 2013)*

### *2.1.1. Résultats et analyses de la phase 2.*

#### *2.1.1.1. Mise en contexte.*

La paratuberculose est une maladie bactérienne affectant le système digestif des ruminants d'élevage causée par la bactérie *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP). La paratuberculose est une maladie chronique qui prend plusieurs mois ou années à se développer et amène une perte de productivité et une réforme précoce. De plus, la paratuberculose soulève des préoccupations de santé publique étant donné son potentiel zoonotique suspecté. Chez les ovins, les outils diagnostiques clinique, microbiologique ou sérologique de la paratuberculose ne sont pas spécifiques, très lents ou insuffisamment sensibles ce qui rend leur utilisation sur le terrain difficile. L'avènement des méthodes moléculaires (PCR) a amené une petite révolution dans le domaine du diagnostic vétérinaire et la paratuberculose ne fait pas exception. Le présent projet avait pour but d'évaluer la sensibilité et la spécificité de méthodes PCR pour le diagnostic de l'infection par MAP chez les ovins à partir de matières fécales.

*Condition ciblée et contexte d'utilisation*

La validation d'un test pour le diagnostic de la paratuberculose doit d'abord tenir compte du stade d'évolution de la maladie des animaux que le test vise à détecter. En effet, les performances du test en termes de sensibilité et de spécificité sont reconnues comme étant variables selon la condition de l'animal, qui peut varier entre infecté silencieux, infectieux et affecté cliniquement. Le choix de la condition doit être défini en considérant l'application spécifique pour laquelle le test est validé. Par exemple, la validation d'un test dans une situation de diagnostic clinique chez des animaux malades devra être réalisée en utilisant des animaux affectés cliniquement pour l'évaluation de la sensibilité.

Dans le cas présent, la PCR fécale est validée afin de pouvoir détecter les troupeaux où des animaux sont infectés et/ou infectieux. La validation du test est faite de façon individuelle. La condition recherchée est un animal infecté ou infectieux, défini par la présence d'un MAP infectieux (i.e. cultivable) dans les tissus intestinaux ou dans les fèces. Le statut infectieux inclut également les animaux excrétant passivement la bactérie. En effet, ces animaux sont susceptibles de contaminer d'autres animaux, et cette infection provient probablement d'un autre animal du troupeau en infection active. L'évaluation du test se fera chez des animaux de 2 ans et plus uniquement, étant donné qu'ils sont plus à risque d'excréter la bactérie dans un troupeau infecté.

*Définition des animaux infectieux (estimation de la sensibilité de la PCR fécale)*

La sensibilité d'un test se définit comme la probabilité que le test soit positif étant donné le statut positif réel de l'animal, donc dans ce cas-ci, étant donné la présence d'un animal réellement infecté ou infectieux (MAP présent dans ses tissus ou dans ses matières fécales). Dans le présent projet, le test de référence pour déterminer qu'un animal est réellement infecté ou infectieux est la présence de la bactérie dans les tissus intestinaux et/ou dans les fèces. Pour l'établir, on utilise la culture d'un échantillon fécal prélevé directement dans le rectum ou de tissus intestinaux sur milieu MB7H10 et LJ, suivi de l'identification de la bactérie par une méthode de détection moléculaire (confirmation) de l'élément génétique répété *IS900* ou *IS1311* spécifique à MAP (tableau 1). Cette confirmation moléculaire est importante, car d'autres mycobactéries peuvent croitre sur les milieux de cultures utilisés et produire des colonies similaires. La PCR utilisée pour cette confirmation du résultat de la culture est différent de celles qui sont validées durant la phase 2 du projet.

*Définition des animaux non-infectieux (estimation de la spécificité de la PCR fécale)*

La spécificité d'un test se définit comme la probabilité que le test soit négatif étant donné le statut négatif réel de l'animal, donc dans le cas présent, étant donné la présence d'un animal non-infecté et non-infectieux (absence de MAP dans l'animal). La culture n'étant pas parfaitement sensible (i.e. présence de faux négatifs), il est proposé d'utiliser un panel de tests afin de maximiser la probabilité que l'animal soit réellement non-infecté et non-infectieux. Un animal sera considéré comme négatif

lorsque l'ensemble de ces tests seront négatifs : culture des fèces, culture des tissus et histopathologie avec coloration de Ziehl-Neelsen (tableau 1).

**TABLEAU 1 :** Interprétation des différents tests pour l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité de l'ELISA et de la PCR fécale

| Tests servant à définir le statut réel de l'animal | | | | Interprétation du statut réel | Tests évalués[1] | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Culture fécale | Culture tissulaire | Histologie avec Z-N | Confirmation moléculaire | | ELISA | PCR |
| + | +/- | +/- | + | Positif | √ | √ |
| +/- | + | +/- | + | Positif | √ | √ |
| + | +/- | + | - | Douteux | | |
| + | +/- | - | - | Négatif | √ | √ |
| +/- | + | + | - | Douteux | | |
| +/- | + | - | - | Négatif | √ | √ |
| - | - | + | S/O | Exclu | | |
| - | - | - | S/O | Négatif | √ | √ |

[1] Situation permettant l'évaluation de la sensibilité ou de la spécificité du test.

#### *2.1.1.2. Matériel et méthodes*

*Animaux et échantillons prélevés*

La phase 1 du projet a permis d'analyser 23 animaux et de mettre au point la culture de fèces et de tissus et à mettre au point les PCR et l'ELISA; la phase 2 visait à échantillonner un total de 80 animaux de deux ans et plus afin de valider des PCR. Ces 80 animaux étaient issus de 6 troupeaux (71 animaux) reconnus infectés lors de la phase 1 (troupeaux 1, 2, 3, 5, 6 et 8) et d'un troupeau présumé non-infecté (9 animaux) qui devait servir de contrôle négatif (troupeau 9).

Pour 6 des 7 troupeaux, entre 4 et 17 brebis de réforme de deux ans et plus ont été sélectionnées lors de leur envoi à l'abattoir durant l'hiver/printemps 2012. L'état de chair a été évalué sur l'animal vivant à l'abattoir. Les prélèvements de sang ont été réalisés à l'ante mortem (7-10 ml avec un tube sec pour prélèvement du sérum). Les animaux ont ensuite été repérés au post mortem grâce à l'identifiant ATQ. Les systèmes digestifs ont été prélevés à l'abattoir et transportés sur glace dans les heures suivantes à la salle de nécropsie de la Faculté de médecine vétérinaire (FMV) de l'Université de Montréal à St-Hyacinthe. Toutes ces étapes ont été réalisées par Dre. Anne Leboeuf. Pour le troupeau 5, les 6 animaux ont été euthanasiés et prélevés à la ferme par le praticien parce non ambulatoire ou trop amaigrie et faible puis envoyés à la FMV.

En salle de nécropsie, le système digestif et les nœuds lymphatiques ont été examinés macroscopiquement. Environ 10 gr de fèces furent prélevées à partir du rectum lorsque possible et entreposés à -70$^0$C pour la culture et les analyses PCR. L'iléon et les nœuds lymphatiques mésentériques ont été sectionnés de façon transversale. Deux sections de l'iléon ont été

échantillonnées, soit des sections de 5 cm provenant de 1) la valvule iléo-caecale (VIC) et 2) de l'iléon à 5 cm de la région proximale de la VIC. Le nœud lymphatique le plus volumineux fut échantillonné. Ces tissus furent ensuite séparés en deux parties égales pour l'histologie et la culture. La partie servant à la culture fut entreposée à -70$^0$C. Les tissus servant à l'histologie ont été fixés dans du formol neutre tamponné à 10% pendant 24-48 hrs. Les sections de l'intestin et les nœuds lymphatiques furent ensuite enrobés dans la paraffine, tranchées à 5µm d'épaisseur et colorées avec de l'hématoxyline-éosine-phloxine-safran (HEPS) et Ziehl-Neelsen (ZN). Tous les tissus ont été examinés en microscopie optique à la FMV par un pathologiste certifié (Dr. Pierre Hélie) pendant un maximum de 5 minutes; lorsque des bacilles acido-alcoolo-résistants (AAR) ou des lésions typiques de paratuberculose étaient visibles avant le temps maximum, une seconde section était examinée. Ceci était réalisé à l'aveugle, c.-à-d. les résultats de culture ou de PCR n'étaient pas connus du pathologiste. Une infection à MAP était diagnostiquée lorsqu'il y avait présence de 1) entérite granulomateuse, lymphangite et/ou une lymphadénite iléo-caecale indépendamment de la détection de bacille AAR ou de l'étendue des lésions ou 2) la présence de bacilles AAR dans la lumière ou les tissus sans lésions associées.

Au laboratoire de l'ACIA, les épreuves diagnostiques suivantes ont été réalisées : culture fécale, culture des tissus, PCR fécale (2 tests différents) et analyse sérologique (ELISA IDEXX), les méthodes détaillées sont décrites plus bas. Les animaux négatifs à la culture fécale, à la culture des tissus et à l'histologie forment la population à partir de laquelle la spécificité de la PCR et de l'ELISA a été évaluée. Les animaux positifs en culture de tissus et/ou de fèces forment la population à partir de laquelle la sensibilité de la PCR et de l'ELISA a été évaluée.

*Culture microbiologique de MAP*

*Milieux de culture*

Suivant les résultats obtenus à la phase 1 du projet, seuls les milieux de culture « modified MiddleBrook 7H10 » (MB7H10) et « Lowenstein-Jensen » (LJ) ont été utilisés pour mettre en culture les échantillons de fèces et de tissus, ces deux milieux s'étant montrés supérieurs aux autres milieux. Le milieu MB7H10 contient (par litre) : agar Difco Middlebrook 7H10 19.0 g, casitone 1.0 g, glycerol 5.0 ml, Difco ADC enrichment 100 ml, jaune d'œufs 200 ml, mycobactine J 2.0 mg, antibiotiques (amphotericine B- 4.0 mg, Trimethoprime- 3.8 mg, acide Nalidixique 8.0 mg & Polymyxine B- 6.0 mg). Le milieu LJ contient 37.4 g de milieu de base Difco Lowenstein dans 580 ml d'eau contenant 12.0 ml de glycérol, 20 œufs entiers homogénéisés, mycobactine J 4.0 mg, antibiotiques (amphotericine B- 6.4 mg, Trimethoprime- 6.08 mg, acide Nalidixique- 12.8 mg & Polymyxine B- 9.6 mg). Les milieux étaient autoclavés avant l'addition des anibiotiques et des œufs. Après le mélange de tous les

ingrédients, les milieux étaient coulés dans des tubes de 20 ml et laissés à coaguler dans une position penchée dans un bain-marie à 80$^0$C pendant 45 minutes.

*Homogénéisation des tissus et fèces.*

Les tissus furent coupés finement avec un scalpel et homogénéisés dans 10ml de PBS stérile. 2.0 g de matières fécales furent homogénéisées dans 10 ml de PBS. Les homogénats étaient ensuite décontaminés en ajoutant 10 ml de 0.9% de chlorure d'hexadecyle pyridinium (HPC) et en incubant à température pièce pendant 12 heures. Suivant une centrifugation de 30 minutes à 3800 X g, le culot bactérien était remis en suspension dans 1 ml d'eau distillée et 0.2 ml inoculé sur 3 géloses penchées de chaque milieu. Les géloses furent incubées jusqu'à un maximum de 8 mois à 37$^0$C et vérifiés à chaque 2 semaines pour la présence de colonies. Les cultures présumées positives (présence de colonies) furent confirmées à l'aide d'un PCR ciblant les éléments génétiques *IS900* ou *IS1311* spécifiques à MAP.

*Extraction ADN*

Comme le trousse d'extraction d'ADN "QIAamp DNA stool mini trousse" n'a pas donné de résultats satisfaisants lors de la phase I, il a été exclu de la phase II et remplacé par un trousse de la compagnie « Zymo research - ZR Fecal DNA extraction system ». Le trousse d'extraction de la compagnie Tetracore a également été utilisé comme à la phase I du projet. Les deux protocoles ont été réalisés en suivant les recommandations des manufacturiers respectifs. Les deux trousses utilisent une technologie dite de « bead beating » à l'aide de billes d'acier inoxydable afin de briser les cellules et tissus suivi d'une purification de l'ADN sur colonnes de silice.

*Amplification PCR*

Le système d'amplification PCR de la compagnie Tetracore est basé sur l'amplification en temps réel du gène *hspX* spécifique à MAP. Les recommandations du fabricant ont été suivies à la lettre dans un volume réactionnel final de 20µl contenant 5µl d'ADN. Un échantillon est déclaré positif si le Ct ≤38 (cut-off). Chaque groupe comprenait des échantillons positifs et négatifs. L'ADN extrait avec le trousse ZR Fecal a été soumis à une PCR « maison » en temps réel basé sur l'élément répété IS900. Les amorces et sondes sont celles proposées par Irenge *et al* (Vet. Micro. 2009 Apr 14;136:166-72., 2009). Le volume final des réactions était de 25µl contenant, 12.5 µl de master mix (ABI Fast Taqman trousse), 300 nM de chaque amorce, 100 nM de sonde et 5.0 µl d'ADN fécal. Les conditions d'amplification étaient de 95$^0$C, 15 sec, et 60$^0$C 15 sec pendant 40 cycles. Un échantillon est déclaré positif si le Ct ≤38 (cut-off). L'appareil utilisé était un *Viaa7* de Applied Biosystems.

*ELISA*

Nous avons évalué une seule trousse ELISA à cause de problèmes de disponibilité auprès des compagnies ou de permis d'importation. La trousse de la compagnie IDEXX a été le seul évalué dans le projet. Les ELISA ont été réalisé sur les sérums tel que recommandé par le fabricant. Les valeurs de DO ont été converties en ratio S/P en utilisant la formule du fabricant. Les contrôles négatifs et positifs spécifiques d'espèces utilisés pour calculer les valeurs S/P étaient ceux fournis dans la trousse. Le tableau 2 suivant a été utilisé pour déterminer le statut des animaux.

**TABLEAU 2 :** Détermination du statut des animaux.

| Statut No. | S/P ratio | Statut de l'animal |
|---|---|---|
| 1 | ≤ 0.60 | Négatif |
| 2 | > 0.6 - < 0.7 | Suspect |
| 3 | ≥ 0.70 | Positif |

*Analyse en pools*

Afin de réduire les coûts d'un éventuel programme de contrôle ou de surveillance, nous avons voulu évaluer la possibilité d'analyser et de détecter la présence de MAP dans des pools d'échantillons de matières fécales. Nous avons fait différents pools de 5 échantillons. Les pools contenaient 1g d'échantillon contaminé à divers degrés et 1g chaque de 4 échantillons non contaminés (négatifs au PCR et issu d'un animal négatif en culture). Le tableau 3 suivant résume la stratégie employée. Nous avons déterminé différentes catégories de niveau de contaminations dans les fèces d'échantillons selon les valeurs Ct de PCR en temps réel. Plus le Ct est faible, plus la charge est élevée.

**TABLEAU 3.** Stratégies utilisées pour l'analyse en pool.

| Échantillon | Nom du pool | Type de pool |
|---|---|---|
| 1 | Très forte charge | Fèces d'un échantillon fortement contaminé (≤22 Ct) poolé avec 4 échantillons négatifs. |
| 2 | Forte charge | Fèces d'un échantillon contaminé (> 22 à ≤30 Ct) poolé avec 4 échantillons négatifs. |
| 3 | Faible charge | Fèces d'un échantillon faiblement contaminé (> 30 à ≤35 Ct) poolé avec 4 échantillons négatifs. |
| 4 | Très faible charge | Fèces d'un échantillon très faiblement contaminé (> 35 Ct value) poolé avec 4 échantillons négatifs. |
| 5 | Négatif | Fèces de 5 échantillons négatifs |

L'ADN des pools a été extrait avec la trousse « *Tetracore Fecal DNA Extraction system* ». L'ADN a été soumis aux deux types de PCR tels que décrits plus haut. Chaque échantillon a été testé en triplicata.

*Définition de cas (statut de l'animal)*

La définition d'un animal positif et négatif est donnée plus haut. Les animaux présentant des lésions histologiques et un Ziehl-Neelsen positif, mais négatifs en culture, ont été exclus des analyses.

*Analyses statistiques*

Des statistiques descriptives ont été utilisées pour présenter les résultats. La sensibilité et la spécificité ont été estimées pour chaque test (PCR maison, PCR Tetracore, ELISA). La sensibilité a été estimée comme étant la proportion d'animaux présentant un résultat positif parmi ceux avec un statut positif selon notre définition de cas. La spécificité a été estimée comme étant la proportion d'animaux avec un résultat négatif parmi ceux ayant un statut négatif. Les intervalles de confiance (95%) ont été calculés pour chaque proportion en ajustant la variable pour l'effet regroupement (i.e. appartenance à un même troupeau). Les analyses ont été réalisées avec la procédure Surveyfreq dans SAS v 9.3.

### *2.1.2. Résultats*

Au total, 80 brebis provenant de 7 troupeaux ont été incluses dans l'étude. Aucune brebis n'était en lactation ou gestante. Selon notre définition de cas, 46 brebis étaient infectées/infectieuses et 32 étaient non infectées/infectieuses. Deux brebis ont été exclues des analyses, car elles présentaient des lésions histologiques suggestives de paratuberculose, mais étaient négatives en culture (Tableau 1). Parmi les 78 brebis restantes, 72 furent testées avec le PCR maison, 76 avec le PCR Tetracore et 78 avec l'ELISA.

#### *2.1.2.1. Culture*

En général, les colonies étaient rugueuses, blanchâtres et petites (figure 1). Quelques isolats étaient de couleur jaunâtre. Le temps d'incubation avant l'apparition de colonies était très variable, allant de 8 à 32 semaines. Les isolats issus de fèces prenaient en général plus de temps à apparaitre en culture que les isolats issus de tissus. La culture fécale s'est révélée moins sensible que la culture de tissus, ne détectant que 10 des 45 (22%) animaux positifs en culture de tissus. Un seul animal a donné une culture positive à partir de fèces et une culture négative à partir des tissus. Le nombre de colonies isolé à partir des fèces était généralement plus faible que le nombre de colonies isolé de tissus. Un total de 20 isolats ont été obtenus sur les 2 milieux MB7H10 et LJ. Douze isolats ont été obtenus seulement sur LJ et 14 seulement sur MB7H10. Les colonies étaient en général plus petites sur milieu LJ.

#### *2.1.2.2. Histologie*

Seulement 7 des 46 brebis positives en culture se sont avérées positives à l'histologie (tableau 4). Ces résultats indiquent que l'histologie, utilisée comme seule méthode diagnostique pour MAP, risque de sous-estimer de façon importante la présence de la maladie. Ceci est d'autant plus vrai que les animaux utilisés dans cette étude sont les animaux qui risquent le plus de présenter des stades plus avancés de développement de la maladie étant pour la plupart maigres, réformés et âgés entre 2-9 ans.

**TABLEAU 4.** Distribution des brebis de réforme selon leur statut MAP basé sur la culture et l'histologie.

| Culture | Histologie | Statut MAP | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Positive | Négative | ND[a] |
| Positive | Positive | 7 | | |
| | Négative | 39 | | |
| | Douteux | | | |
| Négative | Positive | | | 1 |
| | Négative | | 32 | |
| | Douteux | | | 1 |
| ***Total*** | | ***46*** | ***32*** | ***2*** |

[a] Exclus des analyses

#### *2.1.2.3. PCR sur les fèces*

Étant donné que la PCR maison avait donné des résultats décevants pendant la phase I, nous avons modifié le système d'extraction d'ADN de fèces et utilisé celui de Zymo research (ZR) tout en gardant le même système d'amplification PCR (voir section matériel et méthodes). Le système Tetracore était le même que celui utilisé pendant la phase I. Comme le montre le tableau 3, le système PCR maison utilisant la nouvelle trousse d'extraction ZR s'est montré supérieur à la trousse Tetracore détectant plus de 84% des animaux positifs alors que la trousse Tetracore en détecte moins de 60%. La spécificité des deux systèmes est sensiblement la même.

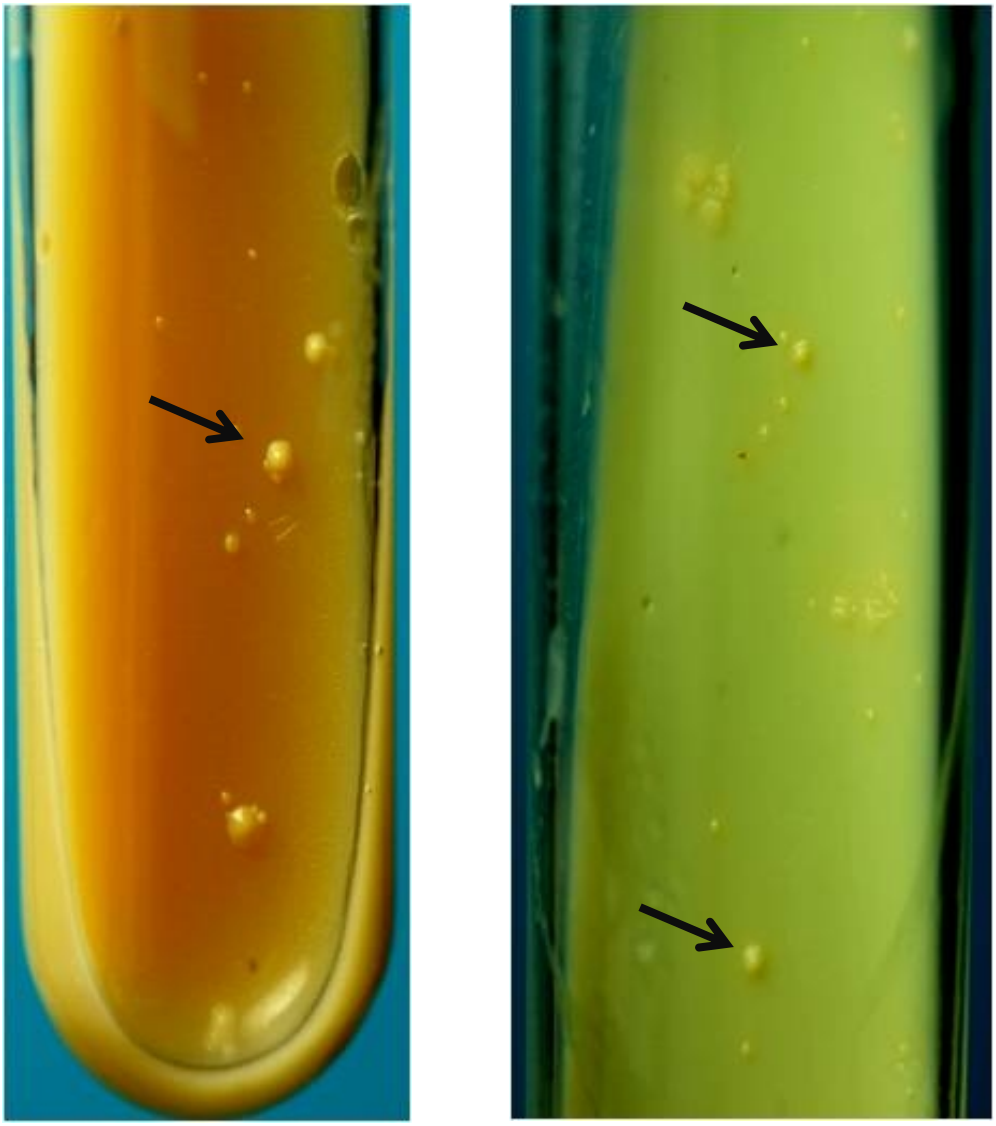
#### *2.1.2.4. Analyse PCR de pools de fèces.*

Seul l'échantillon 1 (fèces fortement contaminées diluées dans 4 parties de fèces négatives) a donné un résultat positif avec les 2 types de PCR (maison et Tetracore). Aucun des contrôles négatifs n'a donné de résultat positif.

#### *2.1.2.5. ELISA*

Tout comme lors de la phase I, l'ELISA s'est montré très peu sensible (13%), mais très spécifique (100%).

**FIGURE1.** Colonies typiques de MAP sur milieu MB7H10 et LJ.



MB7H10 LJ

**FIGURE 2.** Coupe histologique sur tissus intestinal ovin avec coloration ZN montrant les bacilles MAP colorés en rose.

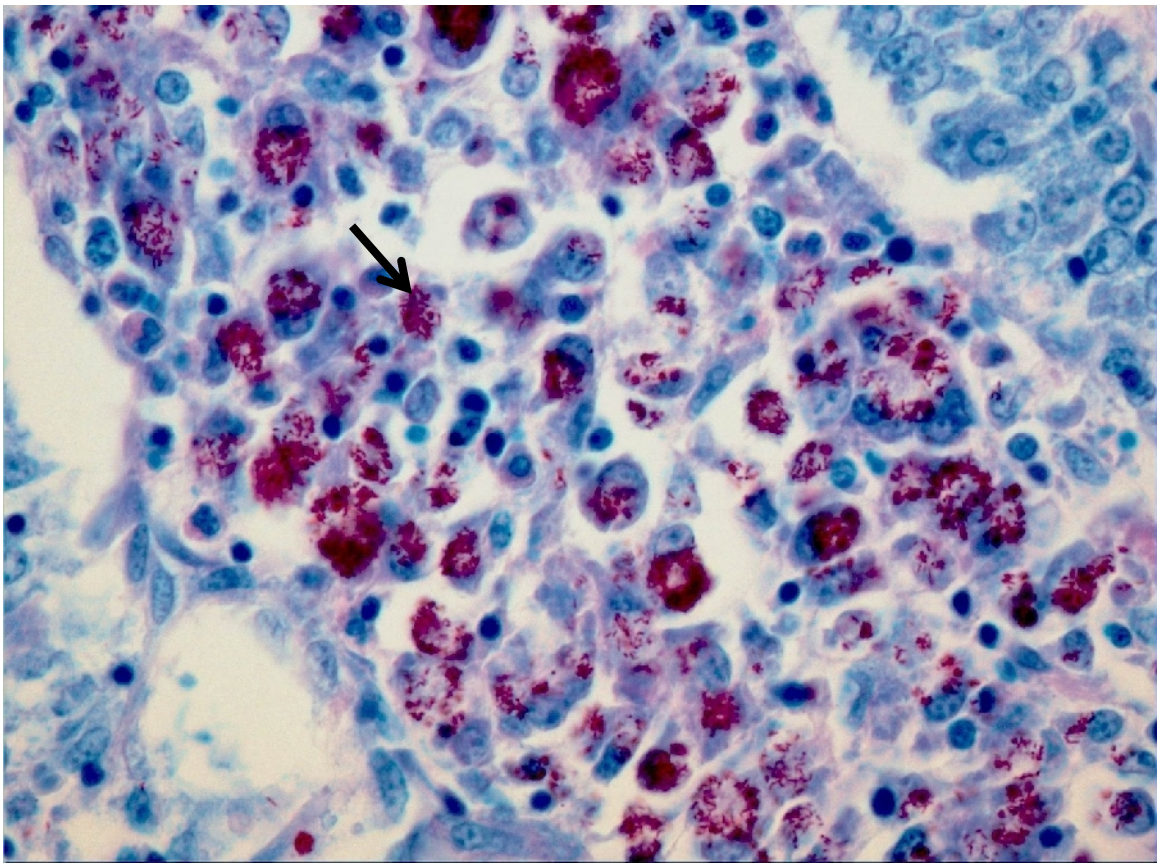


**TABLEAU 5.** Proportion de brebis infectées/infectieuses (MAP) selon leurs caractéristiques (n=78)

| Ferme | Nombre de brebis | % infectées |
|---|---|---|
| 1 | 4 | 75 |
| 2 | 15 | 73 |
| 3 | 14 | 43 |
| 5 | 6 | 83 |
| 6 | 17 | 65 |
| 8 | 13 | 54 |
| 9 | 9 | 33 |
| ***Couleur de la muqueuse orale*** | | |
| Pâle | 39 | 62 |
| Normal/hyperhémie | 39 | 56 |
| ***Age (années)*** [a] | | |
| ≤ 4 | 23 | 74 |
| 5-8 | 40 | 50 |
| ≥ 9 | 11 | 64 |
| ***Gras abdominal*** | | |
| Absent à faible | 58 | 62 |
| Normal à élevé | 20 | 50 |
| ***Condition de chair*** | | |
| ≤ 2.5 | 64 | 59 |
| > 2.5 | 14 | 57 |
| ***Raison de la réforme*** [b] | | |
| Age | 18 | 56 |
| Maigre +/- âge | 40 | 58 |
| autre | 14 | 65 |
| ***Condamnation de la carcasse*** [c] | | |
| Oui | 20 | 60 |
| Non | 52 | 56 |

[a] *Données manquantes pour 4 brebis.*

[b] *Données manquantes pour 6 brebis.*

[c] *Données manquantes pour 6 brebis*

**TABLEAU 6.** Sensibilité, spécificité et valeurs prédictives positives et négatives des PCR et ELISA donnant un statut infectieux MAP pour 76 brebis de réforme, Québec, Canada.

| Test évalué | Nb | Sensibilité estimé (95% CL) | | Nb | Spécificité Estimé (95% CL) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Tests individuels | | | | | | |
| ***PCR*** | | | | | | |
| maison | 45 | 84.4 | (59.9, 96.9) | 27 | 92.6 | (75.7, 99.1) |
| Tetracore | 46 | 58.7 | (18.5, 67.2) | 30 | 90.0 | (69.9, 98.5) |
| ***ELISA (IDEXX)*** | | | | | | |
| Selon recommandations | 45 | 13.3 | (1.9, 39.2) | 32 | 100.0 | (0.89, 100.0) |

### *2.1.3. Discussion*

Le présent projet a permis le développement d'un test PCR remarquablement sensible et spécifique. Cependant, la sensibilité évaluée dans cette étude a été déterminée à partir d'une population ovine spécifique : des animaux généralement âgés, et majoritairement réformés à cause d'un pauvre état de chair (tableau 2). Donc, la sensibilité obtenue n'est valable que pour des populations semblables et elle serait probablement moindre dans des populations de moutons plus jeunes ou en meilleur état de chair qui, par exemple, excréterait MAP en moindre quantité. La PCR maison développée dans cette étude pourrait servir dans un premier temps à déterminer la présence de MAP à l'intérieur de troupeaux en ciblant les animaux âgés et maigre ou de réforme (par exemple avant leur envoie à l'abattoir). De plus, le potentiel quantitatif du PCR pourrait permettre une quantification de la charge infectieuse à l'intérieur des troupeaux. Cependant, malgré une sensibilité analytique remarquable de la PCR maison, une mise en garde s'avère nécessaire. Il est reconnu que la culture de MAP n'est pas 100% sensible, et cela même à partir de tissus, particulièrement pour les souches ovines (S) qui sont particulièrement fastidieuses à cultiver. Les étapes de décontaminations préalables à la mise en culture et la culture sur milieu solide sont reconnues pour abaisser la sensibilité analytique de cette méthode en détruisant une partie de la population de MAP. La PCR étant comparée à la culture dans cette étude (qui n'est pas 100% sensible), ceci pourrait avoir augmenté artificiellement la sensibilité réelle de cette méthode. Par ailleurs, la spécificité apparemment imparfaite du système PCR maison (93%) pourrait également être due à une sensibilité imparfaite de la culture ce qui entraine des résultats « faux-positifs » en PCR. La culture de MAP n'étant pas 100% sensible, il est probable que ces animaux soient en fait de vrais positifs.

Les meilleurs résultats du système PCR maison par rapport à ce qui avait été obtenu lors de la phase 1 sont probablement dus à l'utilisation de la trousse ZR qui utilise plusieurs colonnes chromatographiques contribuant probablement à obtenir un ADN de qualité supérieure par rapport aux trousses Qiagen utilisées lors de la phase 1. De plus le PCR maison cible l'élément génétique répété IS900 qui est présent en 9-12 copies/génome de MAP. Le système Tetracore cible quant à lui un gène unique. Cette différence, jumelée à un

ADN de qualité, pourrait expliquer, du moins en partie, la plus grande sensibilité de la PCR maison. Les résultats montrent clairement que la PCR maison est supérieure en sensibilité et en spécificité à la PCR Tetracore et devrait être celle à privilégier dans les projets futurs et dans les laboratoires offrant un service diagnostic.

La culture étant encore aujourd'hui considérée comme un standard diagnostic pour MAP, il apparait important pour les études futures d'utiliser les 2 milieux de culture MB7H10 et LJ afin de maximiser les chances d'isoler MAP et d'utiliser des tissus intestinaux plutôt que des fèces individuelles. La culture de tissus n'étant possible que sur les animaux en post mortem, cette technique pourrait être utile dans les cas de surveillance à l'abattoir ou d'études de prévalence sur les animaux de réformes. La culture de fèces est nettement moins sensible que la culture de tissus probablement dû à la nature intermittente et variable de l'excrétion de MAP par les ovins. L'utilisation de la culture de fèces individuelle dans un but diagnostic entrainerait une sous-estimation importante de la prévalence réelle d'infection dans un troupeau. Il est toutefois intéressant de noter qu'un animal s'est révélé positif en culture de fèces, mais négatif en culture de tissus. Ceci pourrait suggérer 1) un animal ayant ingéré du MAP mais n'étant pas infecté (réservoir passif) ou 2) que dans ce cas particulier, les tissus étaient infectés sous le niveau de détection par culture.
Bien que notre étude comporte des animaux de réforme issus de troupeaux reconnus comme étant infectés par MAP lors de la phase 1 (sauf pour le troupeau #9), il est tout de même intéressant de noter qu'un fort pourcentage d'animaux (43-83%) était infecté au moment de la réforme. Ces données suggèrent que dans certains troupeaux infectés par MAP, une forte proportion d'animaux réformés est atteinte de paratuberculose, ce qui peut être une des causes de leur réforme.

Les analyses histopathologiques se sont montrées peu sensibles dans notre étude (15%). Il est possible que ces analyses ne réussissent à détecter que les animaux en phase avancée de la maladie (stade multibacillaire). À ce titre, il est important de souligner que les quelques études de prévalence réalisées au Québec l'ont été à partir de données histopathologiques, ce qui risque d'avoir sous-estimé de façon importante la prévalence réelle.

Tout comme l'histopathologie, l'ELISA a démontré une faible sensibilité (13%) et n'est pas applicable pour l'ovin. Plusieurs animaux démontrant une réponse ELISA positive excrétaient de grandes quantités de MAP dans leurs fèces (démontré par des Ct faibles en PCR) ce qui suggère que ces animaux étaient à une étape avancée de la maladie.

Il est intéressant de noter que 3/9 (33%) brebis du troupeau 9, dans lequel aucune suspicion de paratuberculose n'était présente, étaient en bon état de chair, mais tout de même infectées par MAP. Ces résultats indiquent que certains animaux infectés ne démontrent pas de signes cliniques typiques et que l'infection pourrait être présente à l'intérieur de troupeaux qui semblent a priori exempts. Ces résultats

suggèrent également que certains animaux, pour des raisons incomprises, ne semblent pas affectés par la maladie. Il serait intéressant, à ce titre, de connaître les données de productivité de ces animaux et la raison de leur réforme.

L'analyse de pools suggère qu'il serait risqué de former des pools 1/5 au hasard en ferme pour mettre en évidence la présence de MAP dans un troupeau. Une approche plus ciblée en utilisant des pools de fèces provenant uniquement d'animaux âgés, de réformes ou maigres pourrait être plus prometteuse, mais devra être validée au préalable. Les projets futurs devront s'attarder à cette question afin de réduire les coûts d'un futur programme de contrôle.

Une étude de prévalence utilisant la PCR développée dans ce projet est justifiée maintenant que cet outil est disponible. Par contre, avant l'utilisation de cette PCR, différents scénarios devront être élaborés d'après les valeurs estimées de sensibilité et de spécificité estimées, par type d'animal testé si pertinent. Ces scénarios visent à définir le nombre d'animaux qu'il est nécessaire de tester par troupeau ainsi que le type d'interprétation des tests (série vs. parallèle) pour atteindre des valeurs optimales de sensibilité et de spécificité pour la détection des troupeaux infectés dans le cadre d'un programme de surveillance. Des stratégies d'échantillonnage devront alors être évaluées (durant la phase analytique) afin d'obtenir une sensibilité et une spécificité acceptable à l'échelle du troupeau.

## *2.2. Diffusion des résultats*

Un premier article de vulgarisation paraîtra dans la revue Ovin Québec à l'hiver 2013 (Annexe 1). Celui-ci présentera la maladie qu'est la paratuberculose et décrira ce qui a été réalisé dans le cadre du projet ainsi que quelques résultats. Puisque le présent projet peut sembler complexe et aride pour les producteurs, un second article au printemps 2014 sera rédigé dans lequel le contenu sera axé principalement sur l'interprétation des résultats et les façons d'utiliser ce nouvel outil sur leur ferme avec l'aide de leur vétérinaire praticien. Une présentation au *5th Annual meeting of MAP Researcher,* qui se tenait à Banff du 11 au 13 octobre 2012, a également été faite (Annexe 2).

Au rapport d'étape, il avait été mentionné qu'une conférence sur le projet avait été présentée aux intervenants du milieu lors de la Journée de recherche en production ovine qui se tenait à Lévis le 7 juin 2012. Cette conférence n'a pas été remise en annexe, mais il est possible de la consulter sur le site Internet du CEPOQ à l'adresse suivante :

http://www.cepoq.com/admin/useruploads/files/map_jrpo2012.pdf

De plus, une présentation scientifique d'un poster sur le projet avait été présenté au 11e International Colloquium on Paratuberculosis en Australie. Le rapport d'étape qui présente la majeure partie des résultats de la phase 1 est également disponible sur le site Internet du CEPOQ au lien suivant :

http://www.cepoq.com/publications.php?cat=3. Par ailleurs, le présent rapport de recherche sera déposé sur le site Internet du CEPOQ et sur Agri-Réseau dans les prochaines semaines. Enfin, un article scientifique est prévu dans le projet, mais n'est entièrement complété. Une ébauche de l'article actuel vous est présentée en document complémentaire mais ne doit en aucun cas être diffusé. Nous avons rédigé jusqu'à maintenant les sections matériels et méthodes ainsi qu'une partie des résultats et discussions. Une portion des analyses statistiques a également été complétée. Nous comptons avoir terminé la rédaction au début 2014 et le soumettre à une revue scientifique pour publication. La revue sera parmi une de celles-ci : *Canadian journal of veterinary research*, *Veterinary microbiology* ou *Journal of clinical microbiology*. Notre équipe évalue présentement la portée de chacune de ces revues afin de choisir celle qui nous permettra d'avoir la plus grande visibilité.

# DIFFUSION DES RÉSULTATS

| *Activités prévues de l'ANNEXE A* | *Activités réalisées* | *Description (thème, titre, endroit, etc.)* | *Date de réalisation* | *Nombre de personnes rejointes* | *Visibilité accordée au PCAA (logo, mention)* |
|---|---|---|---|---|---|
| Article scientifique | EN COURS! | Voir section 2.2 pour le voir le nom de la revue potentielle où seront publiés les principaux résultats. Document complémentaire CONFIDENTIEL pour prendre connaissance de l'ébauche de l'article. | En cours d'écriture, sera publié en 2014. | La communauté scientifique mondiale en générale +++ | Mention indiquant la participation financière du PCAA |
| Rédaction d'articles de vulgarisation | OUI | Dans la revue Ovin Québec de l'hiver 2013 (Annexe 1 du présent rapport). Un second article sera publié en 2014. | Hiver 2013 | Varie selon la portée des revues choisies (1500 à 2000) | Mention et logo indiquant la participation financière du PCAA |
| Conférence à la Journée de recherche en production ovine | OUI | Conférence de 30 minutes présentée à la JRPO 2012 à l'Hôtel Oiselière de Lévis. Titre de la conférence : *Paratuberculose ovine : méthodes diagnostiques et défis. (Annexe 1 du rapport d'étape)* | 7 juin 2012 | 100 intervenants étaient présents, conférence disponible en ligne sur le site du CEPOQ | Mention et logo indiquant la participation financière du PCAA |
| Conférence sur demande… | OUI | Présentation des résultats préliminaires sous forme d'un poster scientifique au *11e International Colloquium on Paratuberculosis* en Australie (http://www.icp2012.com.au/) *(Annexe 2 du rapport d'étape)* | 3-4 février 2012 | International, communauté scientifique mondiale qui s'intéresse à la paratuberculose | Mention et logo indiquant la participation financière du PCAA |

| ***Activités prévues de l'ANNEXE A*** | ***Activités réalisées*** | ***Description (thème, titre, endroit, etc.)*** | ***Date de réalisation*** | ***Nombre de personnes rejointes*** | ***Visibilité accordée au PCAA (logo, mention)*** |
|---|---|---|---|---|---|
| Rapport de recherche sur le site Internet du CEPOQ et tout autre site pertinent | OUI | Rapport de recherche scientifique sur Internet et Agri-réseau | Automne 2013 | 2500 et plus | Mention et logo indiquant la participation financière du PCAA |
| Conférence sur demande… | OUI | Conférence au *5th Annual meeting of MAP Researcher* à Banff (Annexe 2 du présent rapport) | 11 au 13 octobre 2012 | International, communauté scientifique mondiale qui s'intéresse à la paratuberculose | Mention et logo indiquant la participation financière du PCAA |
| Conférence sur demande… | OUI | Conférence à l'AGA du CEPOQ (Annexe 3 du présent rapport) | 12 avril 2013 | Producteurs et intervenants en production ovine (environ 100 personnes) | Mention et logo indiquant la participation financière du PCAA |

# 3. CONCLUSIONS ET SUITE DU PROJET

Le projet a permis le développement et la validation d'une PCR remarquablement sensible et spécifique qui sera disponible aux producteurs et à l'industrie. Le projet a aussi permis l'évaluation de méthodes moins pratiques en situation diagnostique mais tout de même essentielles à de futurs projets telles la culture à partir de tissus. Par ailleurs, le projet a démontré la très faible sensibilité de l'ELISA qui en fait une technique non applicable dans l'ovin. L'analyse par pool s'est également révélée peu sensible et devra faire l'objet d'investigations futures afin de la mettre au point et de proposer des méthodes de dépistages économiques aux producteurs et à leurs vétérinaires. Avec ces outils en main, nous pouvons maintenant envisager entreprendre des projets qui permettront une meilleure connaissance de la prévalence de la maladie, de son impact sur les élevages, de son épidémiologie et mettre au point des stratégies de contrôle.

# 4. SOMMAIRE DES ACCOMPLISSEMENTS DU PROJET

Ce projet est important car l'agent causant la paratuberculose (*Mycobacterium avium paratuberculosis)* est responsable de pertes économiques importantes chez les ovins, en raison d'une diminution de la productivité et de la longévité des animaux. Le taux de mortalité dans les troupeaux ovins atteints de paratuberculose peut grimper jusqu'à 10% par année. Avant ce projet, il n'y avait pas de méthodes diagnostiques efficaces, accessibles et validées chez les ovins. Il était donc essentiel de développer des méthodes diagnostiques permettant la mise en évidence de MAP chez les ovins vivants afin de mieux comprendre son importance et son impact réel dans les troupeaux et d'aider à son contrôle.

Ce projet a été mis de l'avant afin de développer des méthodes diagnostiques qui permettront une meilleure connaissance de la maladie et, espérons-le, la mise en œuvre de programme de contrôle pour réduire son incidence afin d'améliorer la santé des ovins et ainsi augmenter la productivité des troupeaux. Par ailleurs, dans l'éventualité où le lien entre MAP et la maladie de Crohn chez l'humain serait démontrée, l'industrie serait mieux outillée pour faire face à la situation.

Au total, une centaine de brebis de réforme provenant de neuf troupeaux participants ont été échantillonnés et testés avec les différentes méthodes. Des méthodes de culture, de PCR, d'ELISA et d'histologie ont été comparées afin d'établir leur concordance et d'estimer les performances diagnostiques de la PCR et de l'ELISA. Ce projet a été réalisé grâce à la participation de chercheurs et vétérinaires de l'ACIA et de la FMV, ainsi que du personnel du CEPOQ et des producteurs participants et de leur vétérinaire. Le projet a permis le développement et la validation d'une PCR sensible (84%) et spécifique (93%) permettant la mise en évidence de MAP, l'agent responsable de la paratuberculose, dans les matières fécales d'ovins vivants. Le projet a aussi permis la mise en évidence de MAP par culture à partir de tissus intestinaux. On peut confirmer la présence

de MAP par PCR dans les matières fécales d'ovins vivants de façon suffisamment sensible et spécifique pour envisager l'utilisation de cette technique dans de futurs projets de recherche et programmes de contrôle. La culture peut aussi être utilisée à partir de tissus intestinaux d'animaux en post mortem.

Les prochaines étapes sont la détermination de la prévalence de MAP dans les troupeaux québécois, l'évaluation de son impact sur la productivité des élevages et le développement de stratégies d'échantillonnage basées sur ce nouvel outil pour déterminer le statut d'un troupeau. De plus, dès qu'une stratégie d'échantillonnage sera déterminée, l'industrie pourra adopter la technologie afin d'orienter les mesures de prévention et de contrôle et de suivre la progression de la maladie dans les troupeaux.

# *5. PLAN DE FINANCEMENT ET CONCILIATION DES DÉPENSES*

Toutes les factures et pièces justificatives sont présentées à l'annexe 4.

# *ANNEXE 1 : ARTICLE OVIN QUÉBEC*

**Yvan L'Homme**, Ph.D. ACIA et Université de Montréal
**Anne Leboeuf**, DMV, M.Sc. MAPAQ
**Julie Arsenault**, DMV, Ph.D. Université de Montréal

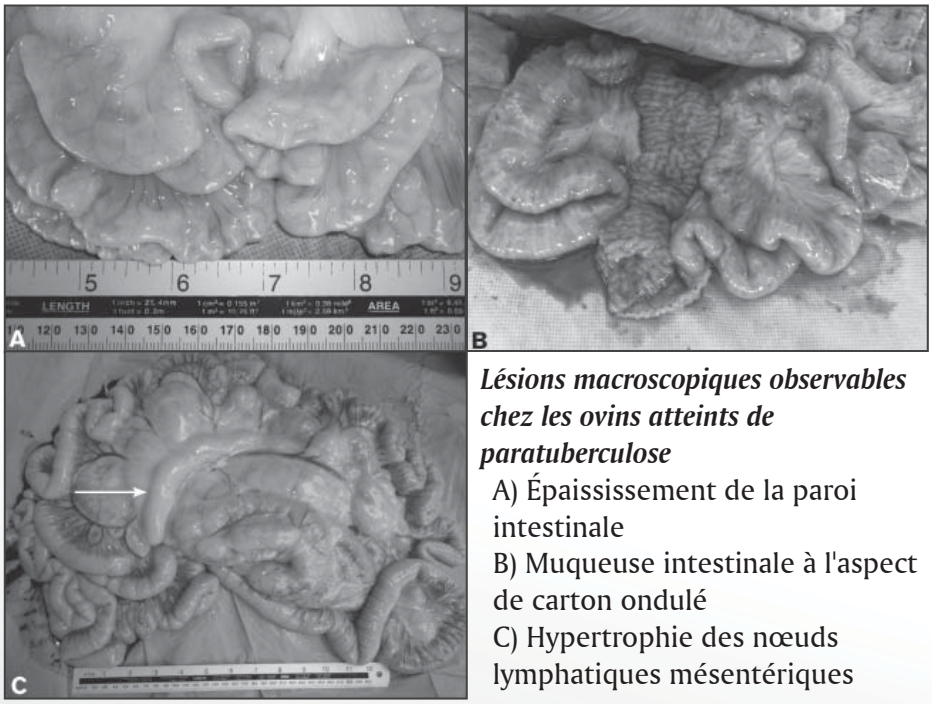
# *Enfin !* Une méthode applicable pour **diagnostiquer la paratuberculose** dans les troupeaux ovins

*La paratuberculose est une maladie incurable affectant le système digestif des ruminants. Elle se développe lentement, amenant un dépérissement progressif, une perte de productivité et une réforme précoce. Elle est causée par la bactérie Mycobactérium avium paratuberculosis (MAP). Si on connait bien cette maladie du côté des bovins, il en va tout autrement chez les petits ruminants où la paratuberculose est une maladie méconnue et négligée, quoique bien présente. Une des causes de cette méconnaissance est l'absence de méthodes diagnostiques accessibles et suffisamment sensibles pour les ovins. Cet article présente la maladie en survol (cause, facteurs de risque, transmission, prévalence, impact et diagnostic) et les premiers résultats d'un projet qui a permis le développement d'un bon outil de diagnostic. Un deuxième article suivra dans quelque temps pour exposer comment cet outil peut être utilisé au profit du bien-être animal et de l'industrie.*

**La communauté scientifique suspecte que MAP pourrait également être impliquée dans la maladie de Crohn (MC), une maladie intestinale chronique affectant les humains. En effet, MAP a été isolée des intestins de plusieurs patients atteints de la MC, et les lésions intestinales de ces patients présentaient certaines similitudes avec les lésions présentes lors de paratuberculose. Par contre, ces études ne permettent pas de conclure si MAP est une cause réelle du développement de la MC. La communauté scientifique demeure donc prudente et reconnait qu'il existe une association entre MAP et MC sans que l'on parle d'une relation causale, tout en préconisant le principe de précaution.**

### *La maladie chez l'animal*

Suite à l'ingestion, MAP se localise dans la partie terminale du petit intestin (iléon) et les nœuds lymphatiques mésentériques. La bactérie s'y multiplie et provoque éventuellement une réponse immunitaire de l'animal (inflammation), qui se traduit par un épaississement de la paroi intestinale. Cet épaississement mène à une malabsorption des aliments et à un dépérissement progressif; en réalité, lors des stades plus avancés de la maladie, l'animal est en train de mourir de faim même s'il continue à manger normalement. Il devient très maigre malgré un appétit souvent normal et peut être léthargique. L'évolution est lente et la




***Lésions macroscopiques observables chez les ovins atteints de paratuberculose***

A) Épaississement de la paroi intestinale
B) Muqueuse intestinale à l'aspect de carton ondulé
C) Hypertrophie des nœuds lymphatiques mésentériques

* Cette photo a initialement été publiée dans The Canadian Journal of Veterinary Research dans l'article Transabdominal ultrasonographic findings in goats with paratuberculosis par les auteurs suivants : M. Tharwat, F. Al-Sobayil, M. Hashad, S. Buczinski. Son utilisation dans le présent article de l'Ovin Québec est possible avec la permission de The Canadian Veterinary Medical Association. Son utilisation et sa reproduction sont interdites sans une nouvelle autorisation.

Avec l'autorisation de l'auteur, Mme Susan Schoenian.

maladie peut prendre des années avant de se manifester cliniquement. Les animaux en début d'infection n'ont pas ou peu de réaction immunitaire et excrètent peu de bactéries dans leurs fèces, ce qui rend l'infection si difficile à détecter, particulièrement chez les jeunes animaux. En effet, une confirmation en laboratoire est nécessaire pour confirmer un diagnostic clinique de paratuberculose (voir section *Diagnostic*), puisque les signes cliniques ne sont pas spécifiques à cette maladie et pourraient être causés par d'autres conditions comme le parasitisme ou le maedi visna. Par contre, chez un animal cliniquement atteint, le diagnostic de paratuberculose peut être obtenu relativement facilement par un examen en nécropsie.

### Comment MAP entre dans un troupeau ?

L'introduction de MAP dans un élevage se fait généralement à l'insu du propriétaire par l'achat d'un animal infecté, mais ne présentant pas encore les signes de la maladie (porteur sain). Cet animal peut cependant excréter la bactérie dans ses fèces et commencer à contaminer l'environnement de la ferme et, s'il s'agit d'une brebis, contaminer également ses agneaux.

Les agneaux de moins de 6 mois sont reconnus comme étant les plus susceptibles de contracter la maladie. En effet, la plupart des infections se produisent en tout jeune âge suivant l'ingestion du colostrum ou du lait d'une brebis infectée, ou encore d'aliments ou d'eau contaminés par des matières fécales provenant d'un animal infecté. Les jeunes agneaux peuvent aussi contracter la maladie par la tétée de mamelles contaminées par des matières fécales. MAP est une bactérie particulièrement résistante, qui peut survivre dans l'environnement de la ferme ou dans les champs pendant plusieurs mois, ce qui facilite sa propagation et favorise sa persistance dans l'élevage. D'une façon générale, les animaux âgés de plus de 2 ans qui sont infectés depuis leurs premiers mois de vie sont ceux qui sont les plus susceptibles de présenter des signes cliniques et d'excréter MAP de façon massive. Les animaux en phase clinique (dépérissement chronique) représentent donc d'importants réservoirs infectieux pour leur descendance et pour l'ensemble du troupeau et devraient être réformés.

### Lorsque MAP est installée dans un troupeau

Lorsque la maladie est bien installée dans un troupeau, on peut schématiser sa présence par l'image d'un iceberg (**figure 1**). Comme dans le cas d'un iceberg, la plus grosse partie (les animaux infectés, mais sans signes cliniques dans ce cas) est invisible à première vue et seule une fraction des animaux infectés expriment des signes cliniques évidents de paratuberculose. La grande majorité des animaux infectés (les porteurs sains et ceux au début de l'expression clinique) passent inaperçus, bien que leur potentiel de contagiosité soit réel, surtout quand ils sont au début de l'expression clinique. Lorsqu'un cas de paratuberculose est confirmé dans un troupeau, il est donc fort probable que plusieurs autres animaux du troupeau soient également infectés et infectieux, même s'ils apparaissent en bonne santé. ►►►

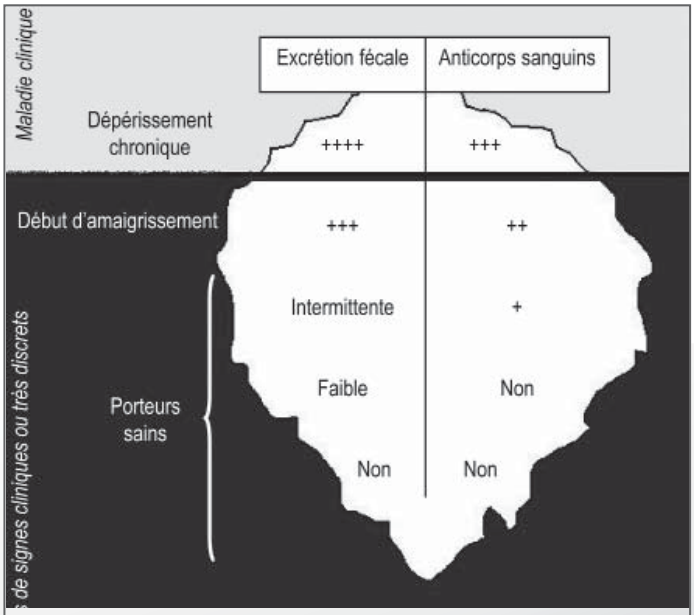



*Figure 1.* Répartition des animaux infectés en fonction du statut clinique et des possibilités diagnostiques

### Les bovins, caprins et ovins peuvent-ils se transmettre MAP ?

Les espèces domestiques les plus fréquemment atteintes de paratuberculose sont les bovins, les ovins et les caprins. Les souches infectant les ovins sont généralement différentes de celles qui affectent les bovins et beaucoup plus difficiles à isoler en laboratoire, ce qui n'est rien pour aider le diagnostic. On les appelle les souches « S » pour *sheep*, alors que les souches normalement retrouvées chez les bovins sont les souches « C » pour *cattle*. Les ovins, caprins et bovins peuvent cependant s'échanger les souches « S » et « C » entre eux. Les chèvres peuvent être infectées par les souches « C » ou « S ». Plusieurs espèces sauvages, dont les cerfs et les lapins, peuvent également être porteuses de MAP et représenter des réservoirs potentiels d'infection pour les élevages.

### La paratuberculose est-elle fréquente en élevage ovin ?

Étant donné la difficulté posée par le diagnostic d'une infection par MAP chez les animaux vivants, la prévalence de l'infection chez les ovins est inconnue au Québec et ailleurs en Amérique du Nord. On sait toutefois que l'infection par MAP est bien présente dans certains troupeaux québécois comme le démontrent nos travaux et certaines études moins récentes. Ainsi, dans une étude réalisée en 2001 dans 30 troupeaux ovins de l'Estrie et du Bas-Saint-Laurent (Arsenault et collaborateurs*) la paratuberculose s'est révélée être la cause de mortalité la plus fréquente chez les animaux adultes. De plus, parmi 485 animaux de réforme échantillonnés en abattoir, près de 3 % avaient des lésions intestinales suggestives de la paratuberculose. Cependant, il est important de noter que la méthode diagnostique utilisée dans cette étude (histopathologie) est peu sensible et a probablement sous-estimé la prévalence réelle. Il est donc fort probable que l'infection soit répandue dans le cheptel québécois.

### Impact économique négatif

L'impact économique négatif de la paratuberculose sur la productivité des élevages est de plus en plus reconnu chez les bovins, particulièrement pour les troupeaux fortement infectés. Des réformes précoces, des baisses de production laitière, une fertilité réduite, un risque accru de mammite, des retards de croissance et des mortalités élevées sont associés à la maladie. Cet impact est plus difficile à estimer en élevage ovin étant donné l'absence de tests diagnostiques efficaces et éprouvés, mais on peut émettre l'hypothèse que les pertes de productivité y sont aussi importantes. Selon certaines données, les troupeaux ovins infectés peuvent perdre jusqu'à 10 % de leurs animaux adultes à chaque année à cause de la paratuberculose.

### Diagnostic

L'infection par MAP est difficile à diagnostiquer entre autres parce que la maladie progresse lentement et que les signes cliniques ne sont pas spécifiques et ne deviennent visibles que tardivement. De plus, les animaux excrètent la bactérie en quantité variable et de façon intermittente, ce qui influence grandement la sensibilité des différents tests. Par ailleurs, la culture de la bactérie est particulièrement longue et fastidieuse, surtout pour les souches ovines (jusqu'à 8 mois en culture).

En simplifiant, deux approches diagnostiques sont disponibles :

- ✓ la détection de la bactérie ou de son ADN à partir d'un échantillon de selles ou de tissus (histopathologie, culture, PCR) ;
- ✓ la détection d'anticorps (sérologie) par diverses techniques (ELISA, fixation du complément, ...).

Les tests disponibles jusqu'à maintenant pour le diagnostic des infections à MAP sont peu sensibles, surtout en ce qui concerne les animaux qui ne présentent pas encore de signes cliniques (en début d'infection). Les porteurs sains, qui sont les plus nombreux dans un élevage, n'excrètent pas ou peu de MAP et n'ont souvent pas commencé à produire des anticorps détectables. Les procédures diagnostiques disponibles avant le présent projet sont donc inadéquates pour détecter ces animaux. Aux stades plus avancés, à mesure que les signes cliniques progressent et que l'excrétion de la bactérie devient fréquente, le dépistage devient plus performant (voir **figure 1** ).

* Arsenault, J., Girard, C., Dubreuil, P., Daignault, D., Galarneau, J. R., Boisclair, J., Simard, C. & Belanger, D. (2003). Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. Prev Vet Med 59, 67-81.

## Le projet

*Le projet avait pour but principal de développer un test diagnostique moléculaire appelé PCR afin de détecter la présence de MAP dans les matières fécales des ovins. La PCR pourra ensuite servir de pilier pour identifier les troupeaux hébergeant la bactérie causant la paratuberculose et élaborer des stratégies de contrôle de l'infection, mais aussi contribuer aux connaissances présentement fragmentaires concernant MAP en troupeaux ovins. Accessoirement, une épreuve ELISA qui permet la détection des anticorps contre MAP chez les animaux infectés a aussi été évaluée.*

***Méthodologie* | La PCR détecte et identifie hors de tout doute l'ADN de la bactérie (l'ADN de la bactérie lui est unique, un peu comme les empreintes digitales pour chaque humain).**

L'évaluation de la PCR s'est faite uniquement chez des animaux de 2 ans et plus étant donné qu'ils sont plus à risque d'excréter la bactérie dans un troupeau infecté.

### Le projet s'est déroulé en deux phases.

**PHASE 1 |** Elle avait pour but d'identifier des troupeaux infectés et de développer les techniques de laboratoire pour la culture, la PCR et l'ELISA. Vingt-trois (23) animaux de réforme provenant de 8 troupeaux fortement suspectés d'être infectés par MAP ont été inclus dans l'étude. Les animaux choisis étaient ceux qui présentaient un amaigrissement marqué et étaient donc les plus susceptibles d'être atteints de paratuberculose. La paratuberculose fut confirmée dans 6 de ces 8 troupeaux. Toutes les analyses ont été réalisées au laboratoire de l'Agence canadienne d'inspection des aliments situé à St-Hyacinthe.

**PHASE 2 |** Quatre-vingts (80) brebis de réforme âgées de réforme âgées entre 2 et 9 ans et provenant des 6 troupeaux positifs issus de la phase 1 et d'un troupeau présumé indemne ont été échantillonnées. Les échantillons ont été récoltés à l'abattoir et envoyés à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal où les prélèvements de tissus intestinaux et de matière fécale furent réalisés. Ces animaux forment la base qui a permis l'évaluation de la PCR et d'un ELISA commercial, ce qu'on appelle la validation d'un test.

### Comment valider un test ?

Afin de vérifier si la PCR développée peut être utilisée avec confiance dans les troupeaux ovins, on doit la comparer avec une méthode de référence (évaluation des performances du test). Cette comparaison nous permet d'établir la sensibilité et la spécificité des tests. Dans le cas de notre étude, la culture des fèces et des tissus (**figure 2**) est la méthode de référence à laquelle la PCR et l'ELISA ont été comparés.

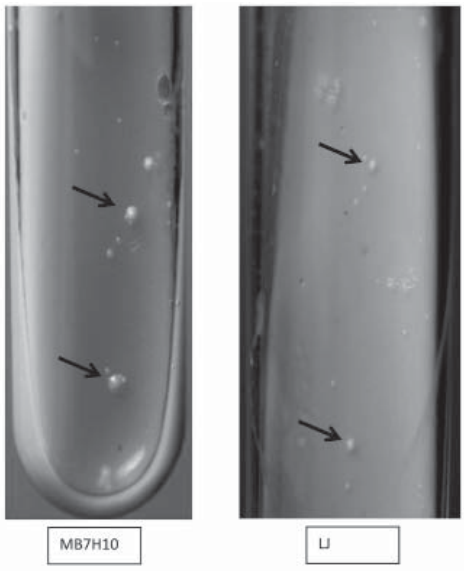



*Figure 2.* Colonies typiques de MAP sur milieu MB7H10 et LJ

La sensibilité de la PCR (ou de l'ELISA) est estimée en calculant la proportion de brebis qui auront une PCR (ou un ELISA) positive parmi toutes celles considérées comme infectieuses ou positives avec la culture. La spécificité est ensuite estimée en calculant la proportion de brebis ayant une réaction négative à la PCR (ou à l'ELISA) parmi toutes celles considérées comme non-infectieuses ou négatives avec la méthode de référence (absence de croissance de MAP sur les milieux de culture ou de lésions spécifiques à la paratuberculose dans les tissus étudiés).

***Ultimement, on cherche un test qui détecte un fort pourcentage des animaux infectés sans faussement déclarer positifs des animaux non infectés.*** ►►►

### Principaux résultats

Selon les résultats de la culture, 45 brebis étaient infectieuses pour MAP et 32 étaient non infectieuses (3 brebis ont été éliminées des analyses). Cette population a servi de base pour l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité des tests PCR et ELISA. Comme le montre le **tableau 1**, la PCR s'est montrée sensible (84 % des animaux « infectieux » ont été détectés par le test) et spécifique (93 % des animaux « non-infectieux » étaient négatifs à la PCR). L'ELISA quant à lui s'est montré très peu sensible (13 % seulement des animaux «infectieux» ont été détectés), mais très spécifique (100 % des animaux « non-infectieux » ont reçu un résultat négatif au test ELISA). L'utilisation de l'ELISA seul est donc fortement déconseillée chez les ovins étant donné sa très faible sensibilité.

**Chez les animaux âgés de 2 ans et plus destinés à la réforme, la nouvelle PCR développée peut détecter 84 % des animaux infectieux pour MAP alors que l'ELISA ne peut en détecter que 13 %. Entre les 2, si un seul test est utilisé, le choix est assez simple.**

### Conclusion et pistes futures

Le projet a permis le développement d'un test PCR remarquablement sensible et spécifique.

Bien que la sensibilité ne soit pas parfaite, les résultats sont tout à fait acceptables (compte tenu des caractéristiques propres à la paratuberculose) et rendent envisageable l'utilisation de cet outil dans le futur. La PCR développée pourrait ainsi servir à déterminer la présence de MAP à l'intérieur d'un troupeau en ciblant les animaux âgés, maigres ou destinés à la réforme (par exemple, avant leur envoi à l'abattoir). De plus, maintenant que cet outil est validé, une étude de la prévalence de paratuberculose dans les troupeaux ovins québécois devient possible. Une telle étude permettrait d'estimer l'ampleur du problème à l'échelle provinciale pour ensuite favoriser la mise en place de stratégies de contrôle individuelles et collectives.

Par ailleurs, afin d'optimiser l'utilisation de cette PCR par les producteurs et leurs médecins vétérinaires praticiens, différents scénarios diagnostiques doivent maintenant être élaborés à partir des valeurs de sensibilité et de spécificité estimées. Ces scénarios visent à préciser le nombre et la catégorie d'animaux (stratégie d'échantillonnage) qu'il est nécessaire de tester pour déterminer avec un maximum de certitude le statut d'un troupeau face à la paratuberculose.

Des résultats plus détaillés ainsi que les pistes et façons d'utiliser le test seront abordés lors d'une prochaine parution de l'*Ovin Québec*.

***Tableau 1**. Sensibilité et spécificité de la PCR et de l'ELISA donnant un statut infectieux pour MAP chez des brebis de réforme.*

| | Sensibilité | Spécificité |
|---|---|---|
| Test évalué | Estimation | Estimation |
| PCR | 84,4 | 92,6 |
| ELISA | 13,3 | 100,0 |

*Remerciements.* Une partie du financement de ce projet a été fournie par l'entremise des conseils sectoriels du Québec et de l'Ontario qui exécutent le Programme canadien d'adaptation agricole (PCAA) pour le compte d'Agriculture et Agroalimentaire Canada. Nous tenons à remercier les personnes suivantes qui ont été essentielles à la réalisation du projet : Dr. Jagdip Singh Sohal (maintenant à Amity University, Inde), Dr. Pierre Hélie (FMV), Dr. Yves Robinson (ACIA), Dre Virginie Lachapelle (FMV), M. Mourad Ouardani (ACIA), Dre Fatima Belayat (ACIA), les gens du CEPOQ, le personnel d'inspection et les employés de l'abattoir Lafrance à Grand-Mère sans oublier les producteurs ayant participé au projet et leurs médecins vétérinaires praticiens.

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Agriculture, Pêcheries et Alimentation Québec

*Une partie du financement de ce projet a été assurée par Agriculture et Agroalimentaire Canada, par l'entremise du Programme canadien d'adaptation agricole (PCAA). Au Québec, la part destinée au secteur de la production agricole est gérée par le Conseil pour le développement de l'agriculture du Québec.*

Agriculture et Agroalimentaire Canada — Agriculture and Agri-Food Canada

Agence canadienne d'inspection des aliments — Canadian Food Inspection Agency

CEPOQ

## *ANNEXE 2 : PRÉSENTATION AU CONGRÈS DE BANFF*

# Johne's disease in Small Ruminants : Quebec 2011-12

Jagdip S Sohal, Anne Leboeuf, Yves Robinson, Virginie Lachapelle, Pierre Hélie, Julie Arsenault, Gilles Fecteau and Yvan L'Homme

*Funding for this project has been provided in part through the Canadian Agricultural Adaptation Program (CAAP) on behalf of Agriculture and Agri-Food Canada. In Quebec, the portion intended for the agricultural-production sector is being managed by the Conseil pour le développement de l'agriculture du Québec (CDAQ).*

Agriculture and Agri-Food Canada / Agriculture et Agroalimentaire Canada

Canadian Food Inspection Agency / Agence canadienne d'inspection des aliments

CEPOQ Centre d'expertise en production ovine du Québec

Agriculture, Pêcheries et Alimentation Québec

Université de Montréal

# ***Investigation of Paratuberculosis in Quebec Sheep Flocks***

## ***Introduction***

• Paratuberculosis or Johne's disease is caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). MAP is very difficult to isolate and culture.

• Paratuberculosis is an important disease of small ruminants with significant economic impact and potential zoonotic concerns.

• Paratuberculosis has been reported in 3% of Quebec sheep sent to the abattoir (n=485) based on histopathological criteria (Arsenault et al., 2003).

• There is no information about MAP genotypes in small ruminants of Quebec.

• To gain more knowledge about the disease status of the provincial flock and its epidemiology and to design subsequent disease control measures, it is important to have validated diagnostic tools and knowledge about the genotypes of circulating strains.

# ***Investigation of Paratuberculosis in Quebec Sheep Flocks***

***Objectives :***

- Development/ adaptation/ evaluation of diagnostic methods for sheep paratuberculosis

- Investigate the genetic diversity of infecting strains

***PHASE I***

Design/ Optimization of diagnostic tools

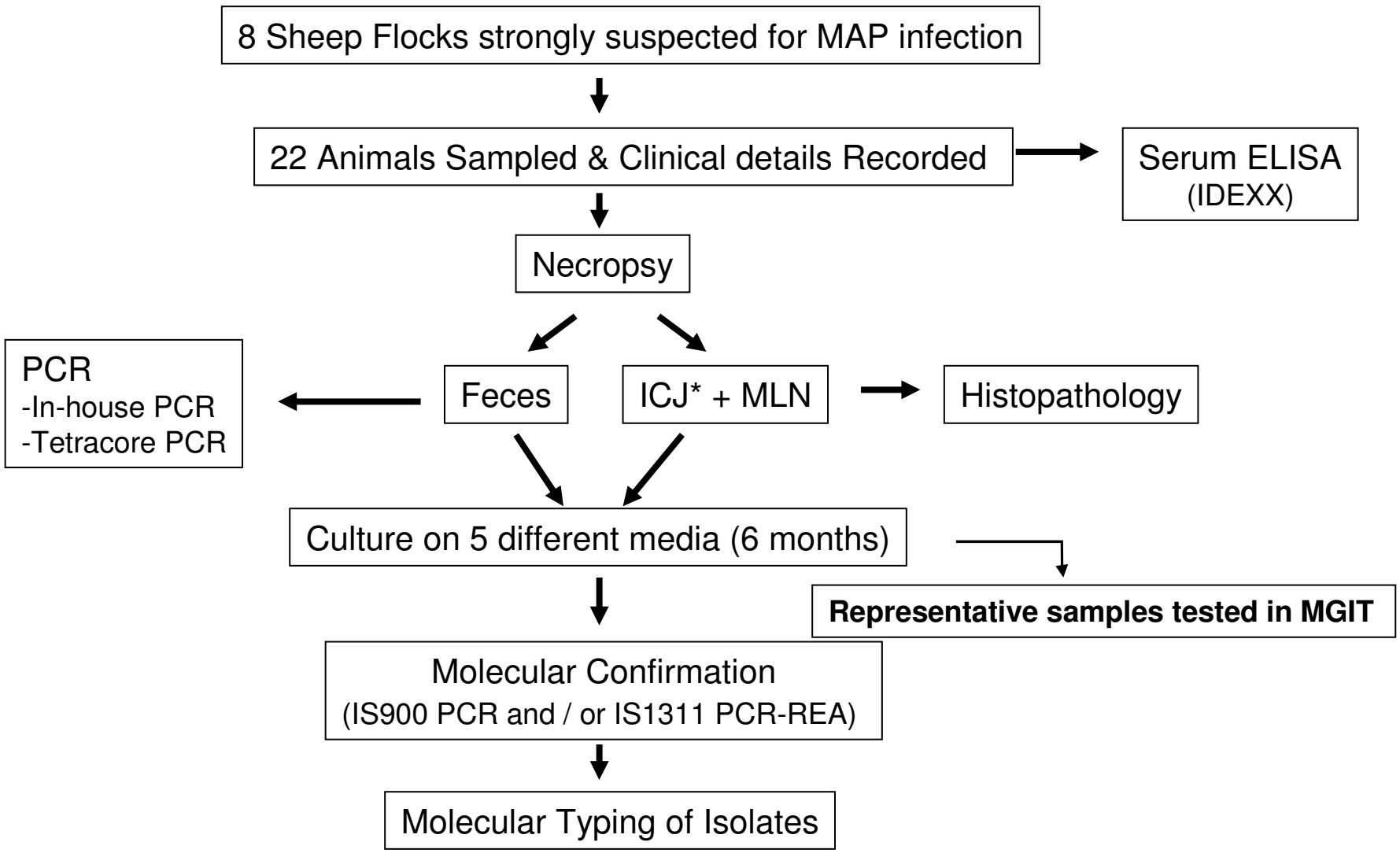
***PHASE II***

-Validation of diagnostic methods

-Studies on genomic diversity of MAP in sheep flocks

**PHASE I**

# MATERIALS & METHODS

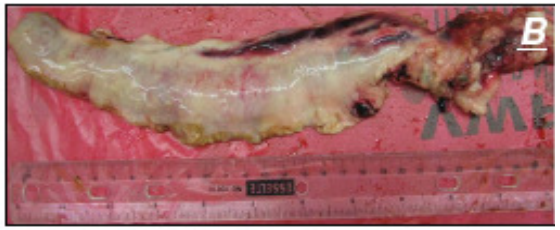


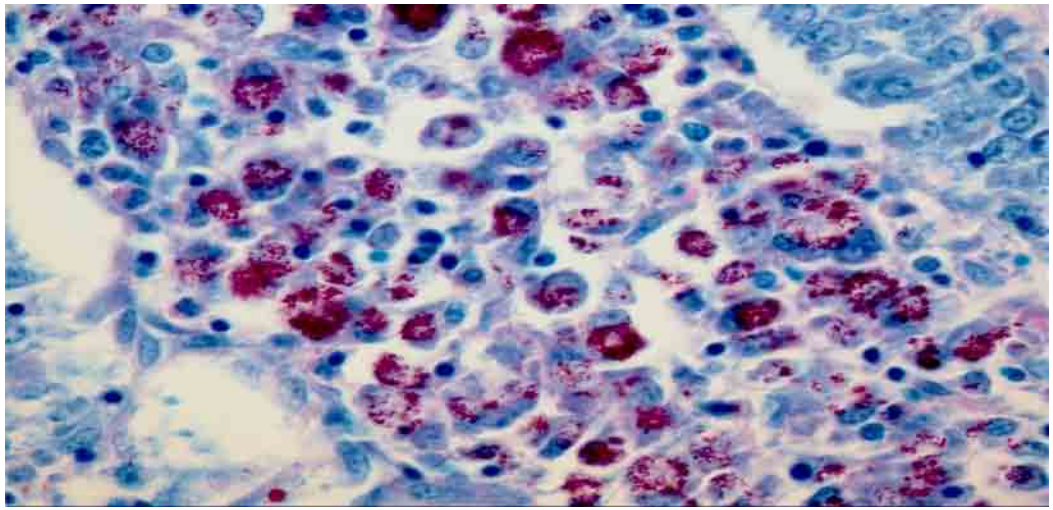

*ICJ- Intestine near Ileo-cecal Junction

**PHASE I**

# RESULTS

## Pathology, Histopathology & Culture



**PHASE I**

# RESULTS

## *Inhouse* PCR

Inhouse PCR is based on *IS900* element of MAP widely used for molecular diagnosis paratuberculosis infection

DNA extraction for inhouse PCR is based on QIAmp Stool DNA kit

Inhouse PCR was only able to detect MAP in feces of clinically advanced cases (Animal 1, 3 & 4) and failed to detect MAP in feces of other cases, hence, commercial PCR was opted as alternative to inhouse PCR

Attempts will be made in Phase II to improve inhouse PCR (discussed later in the presentation)

## *hspX* PCR

*hspX* gene product has role in survival of MAP within macrophages !!! (Bannantine & Stabel, 2000)

*hspX* gene, contains specific DNA sequences that allow for molecular discrimination of MAP from other *Mycobacterium* species (Tetracore)

*hspX* gene is unique and species-specific to MAP (Ellingson et al., 1998)

*hspX* gene based PCR specifically detects MAP (Ellingson et al., 2000)

*hspX* based Tetracore kit has been used in many studies of cattle paratuberculosis

PHASE I

# RESULTS

## ELISA

-Commercial IDEXX ELISA kit recommended for ruminants

-Based on indirect ELISA

-Results are interpreted as S/P (sample/positive) ratio

$$S/P = \frac{\text{Sample mean OD} - \text{NC OD}}{\text{PC OD} - \text{NC OD}}$$

### S/P Ratio Table

| S/P Ratio | Disease Status | Inference |
|---|---|---|
| 0.00 -0.09 | Negative | - |
| 0.10 -0.24 | Suspected | Early stages of infection |
| 0.25 - 0.39 | Low Positive | Sub-clinical, low shedder |
| 0.40 -0.99 | Positive | Clinical, high shedder |
| 1.0 – 10.0 | Strong Positive | Terminal, Super shedder |

**PHASE I**

# RESULTS
## Diagnostics : compilation

| Farm | Lab Animal | Fecal PCR (Ct value) | Serum ELISA | Culture | | | Histopathology |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Feces | MLN | ICJ | |
| 1 | 1 | Pos | Pos | +++ | ++++ | ++++ | Pos |
| 2 | 2 | Pos | - | - | + | + | - |
| | 3 | Pos | Pos | +++ | +++ | +++ | - |
| | 4 | Pos | Pos | + | +++ | +++ | Pos |
| 3 | 5 | - | - | - | + | - | - |
| | 6 | Pos | - | - | + | - | - |
| | 7 | Pos | - | - | + | - | - |
| 4 | 8 | - | - | - | - | - | - |
| 5 | 9 | Pos | Pos | + | ++ | ++ | - |
| | 10 | Pos | - | - | - | - | - |
| | 11 | Pos | - | + | + | - | - |
| 6 | 12 | Pos | - | - | - | - | - |
| | 13, 14 | - | - | - | - | - | - |
| 7 | 15, 16, 17 | - | - | - | - | - | - |
| 2 | 18 | Pos | - | - | - | - | - |
| | 19 | - | - | - | - | - | - |
| 8 | 20 | Pos | - | - | +++ | +++ | - |
| | 21 | - | - | - | - | - | - |
| | 22 | Pos | - | - | + | - | - |

**PHASE I**

# RESULTS
## Performance of different Media

| Medium | Number of Positive Samples | Exclusively Positive Samples | Number of LG Cultures |
|---|---|---|---|
| MB7H10 | 7/16 (43.7%) | 3/16 (18.7%) | 4/7 (57.1%) |
| MB7H11 | 1/16 (6.25%) | - | 1/1 |
| LJ | 12/16 (75.0%) | 7/16 (43.7%) | 3/12 (25.0%) |
| HEYM | 2/16 (12.5%) | - | - |
| HEYM-SP | 2/16 (12.5%) | - | - |

LG : >10 colonies

**PHASE I**

# Discussion

## CULTURE

•A total of 5/8 herds & 50% of the animals were positive by culture (tissue culture more sensitive).

• The 2 media MB7H10 & LJ seemed best suited for isolation of ovine MAP.

• MGIT was not found suitable for isolation of ovine MAP based on the results for samples (feces, MLN & ICJ) from Animal No. 1, 3 & 4.

## FECAL PCR

• A total of 6/8 herds & 59% of animals were positive by PCR.

• 9/13 samples correlated with culture results: sensitivity/ specificity of PCR need to be further analyzed on larger sample size.

## SERUM ELISA (IDEXX)

• A total of 3/8 herds & 18% of the animals were positive - poor sensitive (could only detect super-shedders/ terminally sick animals).

• Other commercial ELISA tests need to be tested for sheep and/or change in parameters of the test cut-off .

## PATHOLOGY

• Seems to confirm only clinically advanced (terminally sick) cases.

**PHASE I**

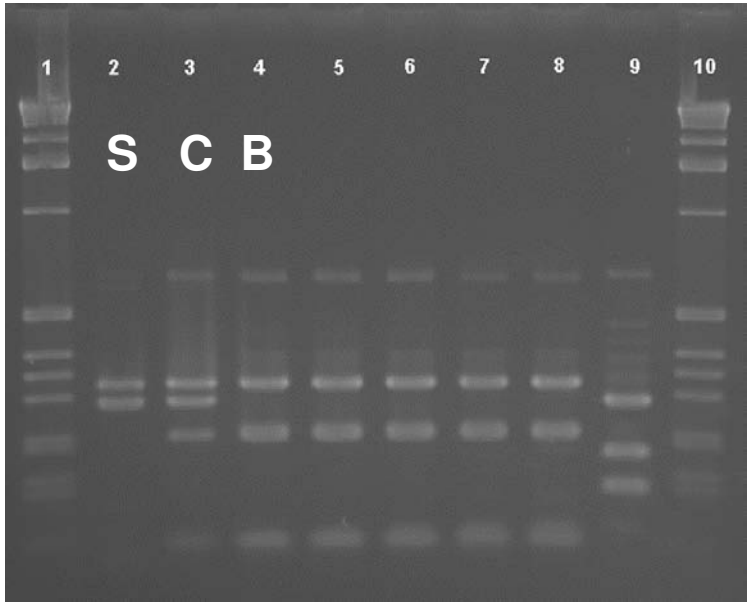
# Typing of Isolates

- Primary genotyping was done using IS*1311* PCR-REA and sub-typing was done using SSR typing and MIRU-VNTR typing

## IS*1311* PCR-REA

- Based on amplification of *IS1311* element and then restriction digestion to target C/T polymorphisms at 223rd position of the element.

- It classifies MAP isolates into 3 principle genotypes: Cattle (C) type, Sheep (S) type & Bison (B) type




Sevilla et al. (2005). Rev. Sci. Tech. 24: 1061-1066

PHASE I

# Typing of Isolates

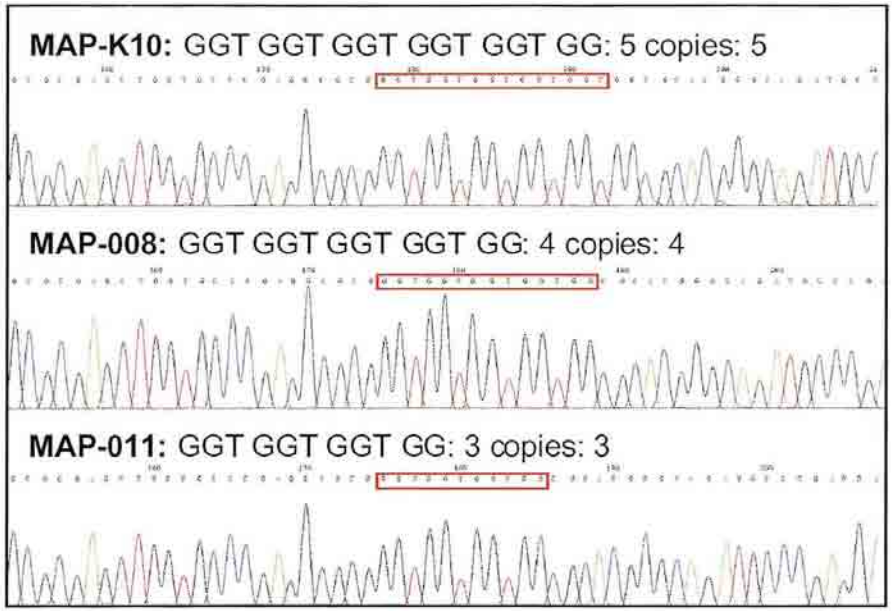
## Short Sequence Repeat (SSR) Typing

-SSRs or microsatellites are tandem repeating units of 2-10 base pairs

- A number of SSRs have been described for MAP, however, 20G, 10G, GGT & TGC loci have been described as highly polymorphic loci (Amonsin et al., 2005), hence, these 4 loci were tested in the present study

- Strains are characterized by sequening of SSR loci and counting the number of repeat units

**SSR Typing**




Common SSR types for sheep MAP Isolates:

7g-4ggt, 7g-5ggt, 10g-5ggt, 15g-5ggt, 14g-5ggt, p7g-3ggt, pg-3ggt, 15g-3ggt

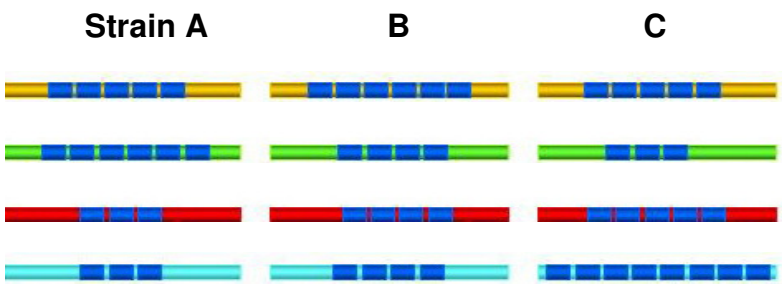
PHASE I

# Typing of Isolates

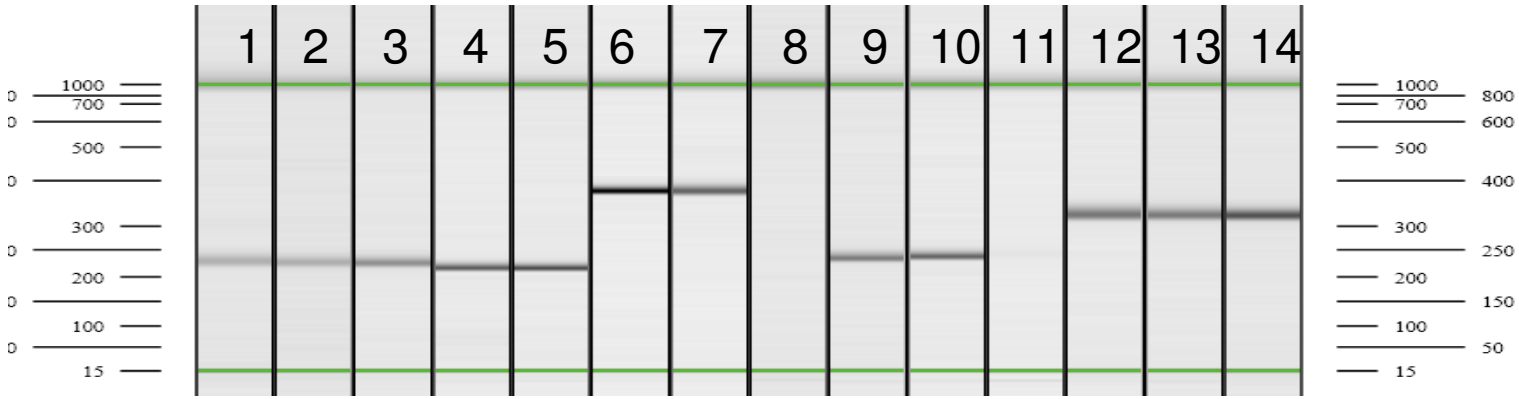
## MIRU-VNTR Typing

-Mycobacterial Interspersed Repetitive Units (MIRU) and Variable Number Tandem Repeat (VNTR) is a location in a genome where a short nucleotide sequence (10-100 bp) is organized as a tandem repeat

- Strains are characterized by length of their MIRU-VNTR loci in PCR reaction based on number of tandem repeat units




**MIRU-VNTR Pattern**




**MIRU-VNTR PCR**

PHASE I

# Typing of Isolates

## MIRU-VNTR Typing

-In the present study we tested 12 MIRU-VNTR loci, VNTR 3, 7, 10, 32, 47, 259, 292, X3, 1067, 3527, MIRU 1 & MIRU 4

- Interpretation of results was done using INRA-Nouzilly INMV database, INMV stands for INRA Nouzilly MIRU-VNTR typing.

-INMV is a universally accepted database for MIRU-VNTR typing of *Mycobacterium avium* complex isolates

**INMV types from ovine MAP isolates across the world**

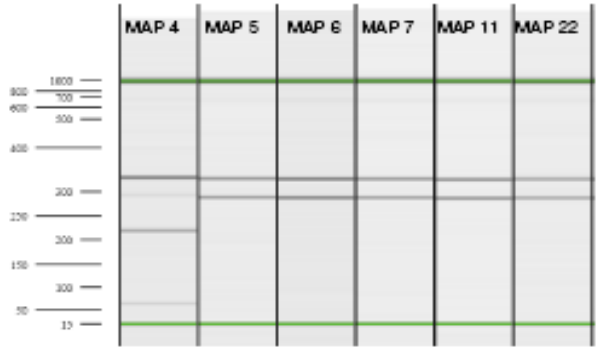
| INMV Pattern | INMV Type | Country |
|---|---|---|
| 41331118 | INMV 72 | New Zealand, Spain |
| 71331118 | INMV 70 | UK, Norway, Spain |
| 51331118 | INMV 21 | UK, Spain |
| 61331118 | INMV 32 | UK |
| 91331119 | INMV 84 | Spain |
| (11)1331118 | INMV 85 | Spain |
| 20331118 | INMV 73 | Iceland |

**PHASE I**

# RESULTS & DISCUSSION: Typing of Isolates

- 10/11 isolates were of the S (sheep) type and 1 belonged to C (cattle) type.
- C type strain was isolated from a mixed herd of sheep and goats.
- Results suggest interspecies transmission of MAP strains.
- Sub-typing was carried out for 4 isolates so far
- SSR profiles of S type strains matched to reported profiles of S strains
- Sub-typing identified unique MIRU-VNTR profiles for S type isolates
- MIRU-VNTR profile of C type strains was identical to typical C strains*.

IS1311 PCR-REA of 6 isolates

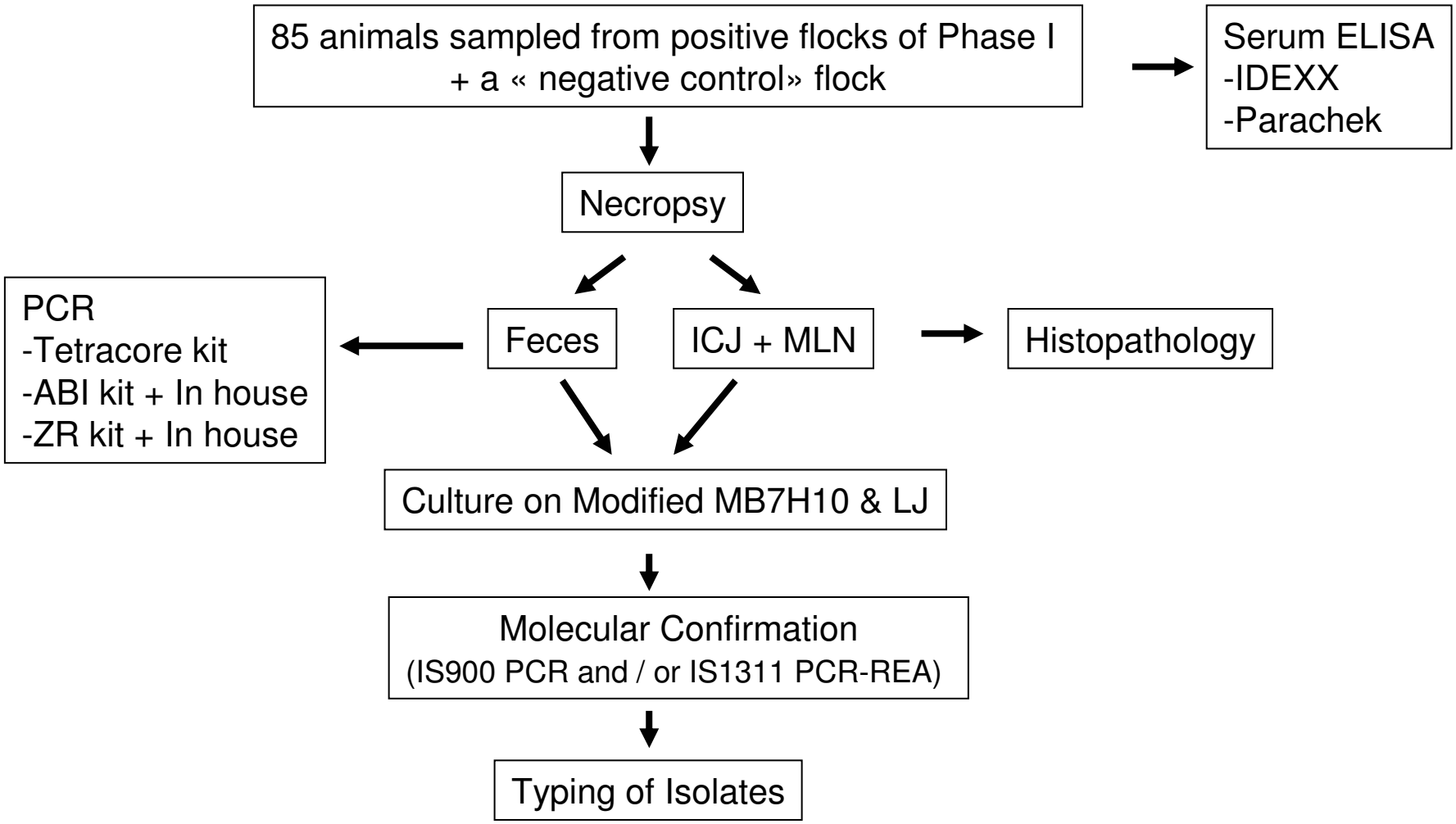



(Band pattern analysis as per Sevilla et al. (2005)

| Isolate | INMV Profile | INMV Type |
|---|---|---|
| MAP Sheep 1 | 41331218 | **Unique 1** |
| MAP Sheep 2 | 41331218 | **Unique 1** |
| MAP Sheep 3 | 71331218 | **Unique 2** |
| MAP Sheep 4* | 32332228 | INMV 2 |

**PHASE II**

# MATERIALS & METHODS



***PHASE II***

***Preliminary RESULTS***
***(Sep 10, 2012)***

## CULTURE

• 17/40 animals of Phase II yielded minute colonies (suspected as MAP).

## SERUM ELISA (IDEXX)

• A total of 2 animals were positive from first 40 animals of Phase II.

# *Genomic Diversity of Caprine MAP Isolates*

- 12 isolates from CLA Lymphadenitis Project (SECLRQ, RECBQ, UdeM and MAPAQ) grown on MGIT were sent to our Lab.

- Bulk culture of primary MGIT growth was done on MB7H10 & HEYM

- 10 of 12 were sub-cultured

- Eight isolates typed as **C** type & 2 isolates as **S** type

- 4 different MIRU-VNTR sub-types reported for 10 isolates

- 3 sub-types for C type isolates & 1 unique subtype for S type isolates

| Isolate | Primary Genotype | INMV Profile | INMV Type |
|---|---|---|---|
| C7 | Cattle type | 42332218 | INMV 5 |
| C14, C42 | Cattle type | 32332228 | INMV 2 |
| C29, C30, C41, C56, C64 | Cattle type | 42332228 | INMV 1 |
| C51 | SHEEP TYPE* | 511--218 | **UNIQUE** |
| C60 | SHEEP TYPE* | 511--218 | **UNIQUE** |

## ***Genomic Diversity of Caprine MAP Isolates, preliminary thoughts.***

- Ability of certain sub-types of "S" strains (from goats) to grow on MGIT suggests the certain possibility of changing this medium for the growth of other sub-types of "S" strains

- Results suggests that goats are susceptible to both S & C strains

# ***Present Considerations & Future Perspectives***

- Validation of PCR and ELISA on greater sample size
- Optimization of MGIT to support growth of S strains
- Assessment of pooling faecal and environmental samples to detect positive flocks.
- Estimation of disease flock prevalence in small ruminants
- Studies of candidate genes in relationship with resistance/susceptibility to the disease (collaboration with Nathalie Bissonnette, AAC)
- Designing disease control measures

# ACKNOWLEDGEMENTS

-Funding : A portion of project funding was provided by the sector councils of Quebec and Ontario who administer the Canadian Agricultural Adaptation Program (CAAP) for Agriculture and Agri-Food Canada.

- CEPOQ for their continued support

-Farmers & Veterinary Practitioners for their cooperation and samples for this study

-Mourad Ouardani and, Marc-André Laurin, Virology Research Lab, CFIA, St. Hyacinthe for lab assistance

-Sébastien Buzinsky and Olivia Labrecques, University of Montreal and MAPAQ for providing caprine isolates

Agriculture and Agri-Food Canada
Agriculture et Agroalimentaire Canada

CEPOQ
Centre d'expertise en production ovine du Québec

Agriculture, Pêcheries et Alimentation Québec

Canadian Food Inspection Agency
Agence canadienne d'inspection des aliments

Université de Montréal

# *ANNEXE 3 : PRÉSENTATION À L'AGA DU CEPOQ*

# PARATUBERCULOSE :

# avancées pour un dépistage efficace

Présenté par Anne Leboeuf (MAPAQ) et Yvan L'Homme (ACIA)

AGA du CEPOQ, 12 Avril 2013

Une partie du financement de ce projet a été fournie par l'entremise des conseils sectoriels du Québec et de l'Ontario qui exécutent le Programme canadien d'adaptation agricole (PCAA) pour le compte d'Agriculture et Agroalimentaire Canada (AAC).

CEPOQ Centre d'expertise en production ovine du Québec

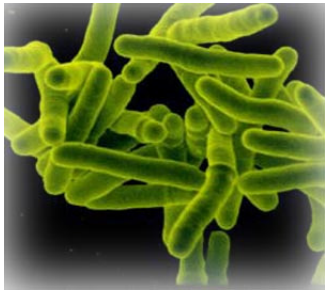
Agriculture, Pêcheries et Alimentation Québec

Université de Montréal

Canadian Food Inspection Agency

Agence canadienne d'inspection des aliments

# Agent étiologique



- Genre *Mycobacterium* - Mycobactéries
  - Pathogènes – Tuberculose, Lèpre, Paratuberculose
  - Non pathogènes/opportunistes – plusieurs 10aines d'espèces omniprésentes dans l'environnement
- *Mycobacterium avium* sous-espèce *paratuberculosis* (MAP)
  - fait partie du complexe *M. avium* (bactéries pathogènes, opportunistes et environnementales)
  - 2 souches principales – C (cattle) et S (sheep)
- Paroi cellulaire unique leur donnant des caractéristiques communes
  - Grande résistance environnementale et à plusieurs antibiotiques
  - Coloration unique histologie (Ziehl-Neelson) - diagnostic

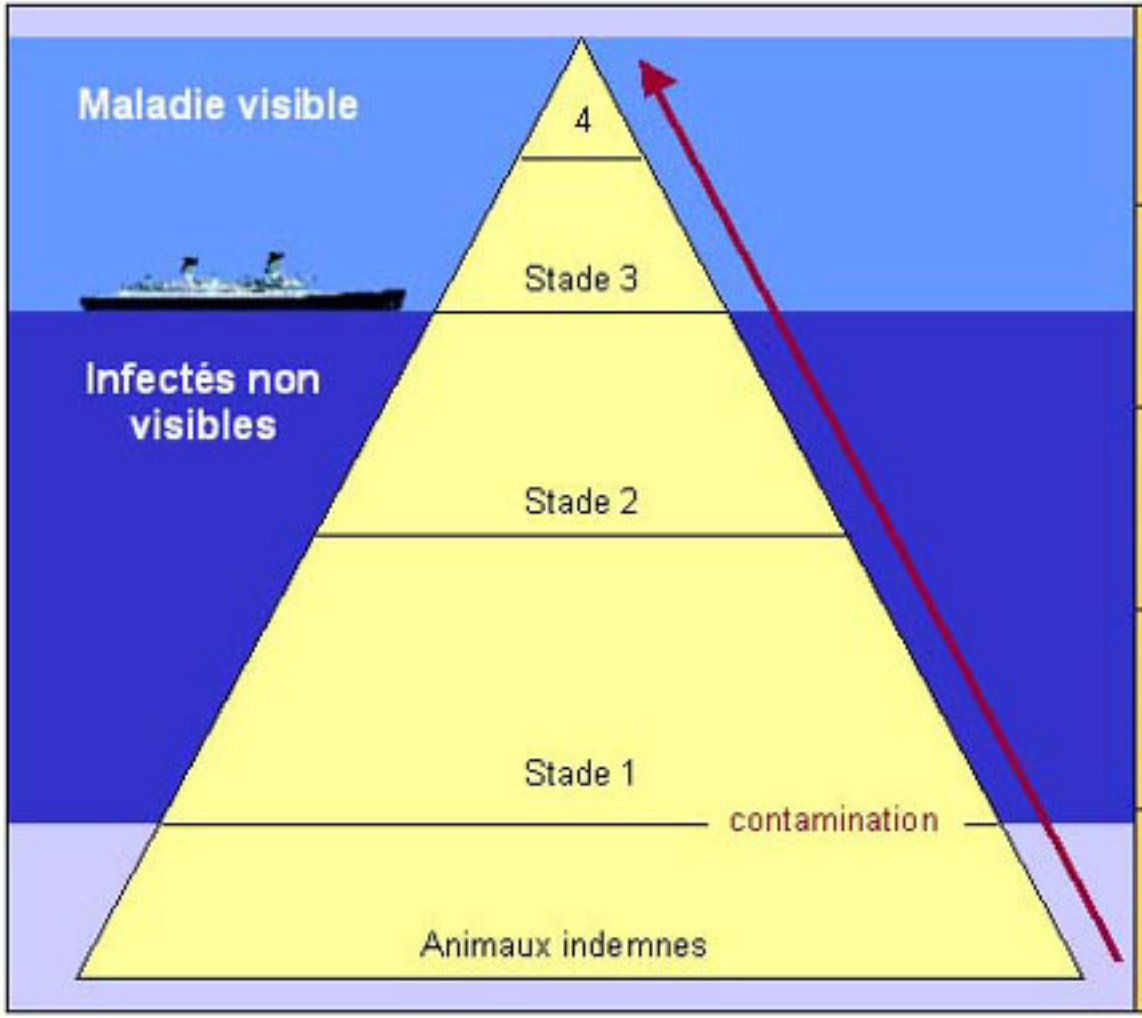
# MAP-Pathologie ovins

*A sheep showing signs of OJD.*

- Prédominance de la souche « S »
  - Culture fastidieuse
- Cause une entérite chronique progressive
  - période de latence silencieuse – difficulté diagnostique
- Signe clinique – perte de poids chez les animaux + de 2 ans, diminution de la productivité **(pertes économiques $$)?**
- Porteurs asymptomatiques?
- Susceptibilité génétique
- Les moutons ont-ils la même susceptibilité à la maladie que les bovins et les caprins?

# MAP - Épidémiologie

- Infecte les ruminants domestiques et sauvages ainsi que plusieurs espèces de mammifères (réservoir)
- Endémique à travers le monde chez les ruminants d'élevages (> 50% des élevages bovins en Europe et USA)
- Transmission fécale-orale (lait, mamelles, eau, aliments, litière contaminés)
- Zoonose potentielle – maladie de Crohn
- Susceptibilité liée à l'âge (inversement proportionnel)
  - À la base des mesures de contrôle chez les bovins laitiers
- Prévalence peu connue chez les petits ruminants
  - 60% des troupeaux en NZ
  - Entre 0-40% des troupeaux Australiens
  - Canada ??




**Stade 4** : les animaux en phase terminale (5% des contaminés seulement) .

**Stade 3** : les animaux sont de plus en plus contagieux, et commencent à présenter quelques signes cliniques, comme un amaigrissement (5 à 10 % des contaminés).

**Stade 2** : les animaux ne sont toujours pas malades cliniquement, mais ils sont devenus contagieux et excréteurs (20 à 40 % des contaminés).

**Stade 1** : les animaux sont infectés, non-excréteurs. Ils sont porteurs de la bactérie, mais celle-ci n'a pas encore colonisé les intestins. Ils ne sont donc pas contagieux (50 à 70 % des contaminés).

Les Animaux indemnes : ils n'ont pas été en contact avec le microbe ou ils ont guéri spontanément.

http://common.chezmonveto.com/medias/public/img/Fiches_conseil/Divers/Vetel_schema_paratuberculose.jpg

# Défis: diagnostic et contrôle

- Les outils diagnostics actuels sous-estiment la prévalence réelle
- Options diagnostiques:
  - Lésionnel: sur carcasse – peu sensible
  - Sérologie: très peu sensible chez l'ovin
  - Culture: «standard» mais long et fastidieux (peu sensible à partir de fèces)
  - Option : PCR dans les matières fécales

**Besoin d'outils validés**

# Développement d'un test de dépistage rapide pour la paratuberculose chez les ovins vivants.

- Yvan L'Homme, ACIA, responsable du projet
- Jagdip Singh, ACIA, post-doctorant
- CEPOQ, organisme demandeur

Collaborateurs:

- Anne Leboeuf, MAPAQ
- Julie Arsenault, FMV
- Pierre Hélie, FMV
- Gilles Fecteau, FMV
- Yves Robinson, ACIA
- Producteurs ovins et médecins vétérinaires praticiens participants

# Objectifs

- Développement/adaptation/évaluation de méthodes diagnostiques

- Étude sur la diversité des souches

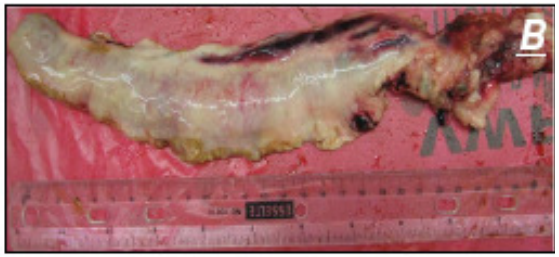
# Méthodologie

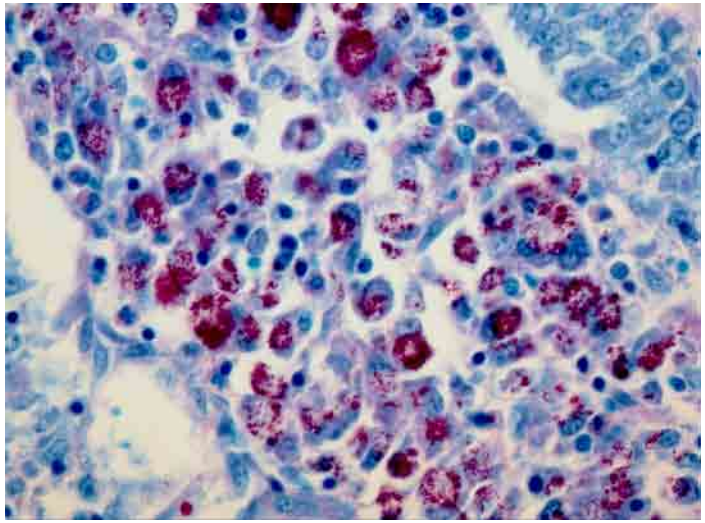
- Phase 1 – Mise au point de la logistique et des méthodes en laboratoire
  - 22 animaux de 8 troupeaux suspectés/infectés MAP
- Phase 2- validation
  - 80 animaux de réforme/7 troupeaux
  - Prélèvement en abattoir du système digestif
  - Prélèvements des tissus à la FMV (St-Hyacinthe)
  - Histopathologie à la FMV
  - Culture de tissus, PCR, ELISA à l'ACIA
- Animal positif – Positif en culture (standard)
- Animal négatif – Négatif en culture et en histopathologie

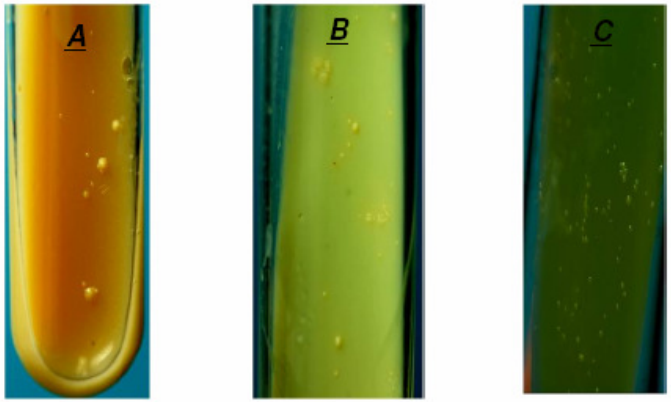
# Descriptif des animaux échantillonnés pour la phase 2

| | | | Brebis de réforme échantillonnées | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ID troupeau | Région | Taille troupeau | Nb | Âge moyen (en années) | État de chair moyen (cote de 1 à 5) |
| 1 | Mauricie | 95 | 5 | 7,5 | 2,5 |
| 2 | Lanaudière | 120 | 15 | 5,1 | 2,2 |
| 3 | Bas-St-Laurent | 400 | 15 | 6,7 | 1,2 |
| 5 | Bas-St-Laurent | 400 | 6 | 5,3 | 1,3 |
| 6 | Bas-St-Laurent | >800 | 20 | 6,5 | 1,9 |
| 8 | Bas-St-Laurent | 525 | 14 | 5,4 | 2,1 |
| 9 | Bas-St-Laurent | 350 | 10 | 8 | 3,5 |

# Résultats

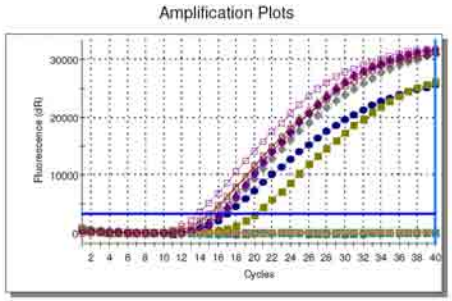




# Résultats

- 46 animaux positifs en culture, 32 négatifs et 2 exclus
- **PCR maison sensibilité (se) = 84% et spécificité (sp) = 93%**
- PCR commercial se = 59%, sp = 90%
- Histopathologie se = 15,2%
- ELISA (IDEXX) se = 13%, sp 100%
- Prédominance de la souche « S »



# Qu’est-ce que ça veut dire ?

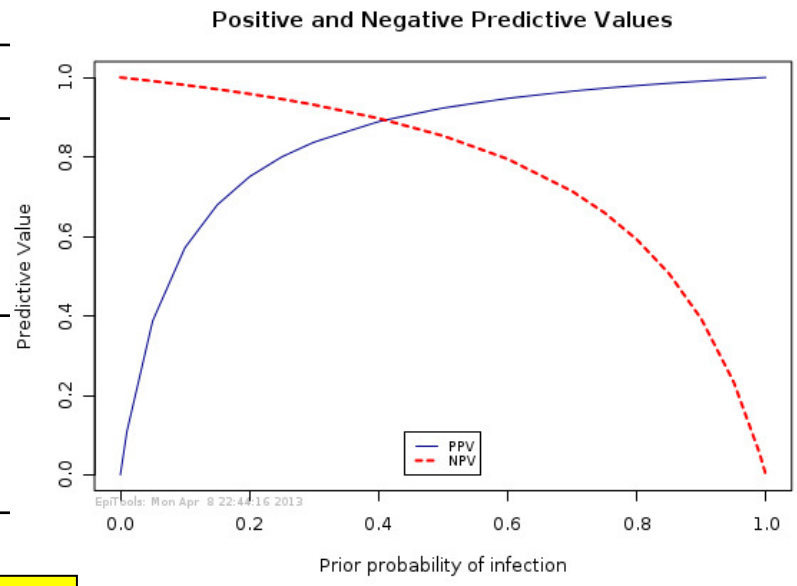
| | | **Infectieux** (ou résultat de la culture des tissus) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **positif** | **négatif** | |
| **Résultat du PCR** | **positif** | **Vrai positif** | **Faux positif** | **Valeur prédictive positive** VP / VP+FP |
| | **négatif** | **Faux négatif** | **Vrai négatif** | **Valeur prédictive négative** VN / FN+VN |
| | | **Sens: 84 %** | **Spéc: 93 %** | |

# Si prévalence de **5%** dans un troupeau de 1000 brebis

| | | **Infectieux** (ou résultat de la culture des tissus) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **positif** | **négatif** | |
| **Résultat du PCR** | **positif** | **42** | **67** | **Valeur prédictive positive** 39% |
| | **négatif** | **8** | **883** | **Valeur prédictive négative** 99% |
| | | **Sens: 84 %** | **Spéc: 93 %** | |

# Si prévalence de **30%** dans un troupeau de 1000 brebis

| | | **Infectieux** (ou résultat de la culture des tissus) | |
|---|---|---|---|
| | | **positif** | **négatif** |
| **Résultat du PCR** | **positif** | **252** | **49** |
| | **négatif** | **48** | **651** |
| | | **Sens: 84 %** | **Spéc: 93 %** |



# Et maintenant ?

## On fait quoi avec le PCR fécal?

Test individuel

vs

Test troupeau ?

http://www.genomics.agilent.com/files/Media/8800_withHelix.jpg

# 1. L’utiliser pour déterminer si troupeau infecté ou non

- Choisir les brebis de réforme de plus de 2 ans (nb à préciser ultérieurement)
- Favoriser celles qui ont un faible état de chair et/ou âge avancé

## Si infecté

2. Limiter la transmission
3. Réformer précocement les animaux cliniques
4. Optimiser la régie et l'alimentation
5. Identifier et réformer les excréteurs ?

## Si non infecté

2. Acheter uniquement dans troupeau non infecté
3. Biosécurité +++++

# Limiter la transmission féco-orale (et colostrum/lait)

**Les jeunes sont les plus vulnérables**

- Aires de mise bas propres et sèches, avec litière renouvelée abondante
- Rotation (ou N&D) des aires de mise bas pour limiter la ch microbienne.
- Faire agneler à part:
  - les brebis présentant des signes cliniques et suspectes
  - les brebis dont on veut garder la descendance.
- Attention aux agneaux voleurs.
- Limiter la contamination des aliments et de l'eau par du fumier.
- Séparer les jeunes animaux des adultes.

# Perspectives de recherche

- Déterminer la prévalence et l'épidémiologie
- Caractériser les facteurs de risques
- Étudier l'impact économique de la maladie
- Vaccination?

# *ANNEXE 4 : PLAN DE FINANCEMENT & CONCILIATION DES DÉPENSES*