

Paratuberculose bovine

Mycobacterium Avium subsp. Paratuberculosis (MAP) Etude de la transmission Mère - Veau et Veau-Veau

Innovation dans le diagnostic précoce de la paratuberculose par la Méthode Actiphage™ PCR sur sang

Partenaires de l'étude : Laboratoire BIOSELLAL, GDS 88 et laboratoire Biotech PBD, 3 élevages vosgiens, les vétérinaires des exploitations, le LVDA55.

Pelletier Claire <BioDev@biosellal.com>; Carine HAAS carine.haas@gds88.com Eric SELLAL <eric.sellal@biosellal.com>; Vincent POTAUFEUX direction@gds88.com; Julie Colin <julie.colin54@laposte.net>; Claire Camille Caplain <camille.caplain@biosellal.com>; Clemence Dangien <Clemence.dangien@biosellal.com>; "faes.i@lvd55-segilab.fr"

Financements de l'étude : le laboratoire BIOSELLAL, le GDS 88

Edité le 16 avril 2019

Document rédigé par Carine HAAS, conseillère en santé animale au GDS 88 et co-chargée de cette étude avec le Dr Claire PELLETIER

Résumé : Dans les troupeaux surveillés en paratuberculose, il serait essentiel de détecter le plus tôt possible l'infection active chez les veaux nouveau-nés (transmis par la mère, les autres veaux, ou l'environnement) afin de les exclure du troupeau reproducteur.

Les outils de diagnostic actuels permettent une détection fiable à partir de seulement 18-24 mois et ne sont pas en mesure de faire la distinction entre une infection active et une infection passive. Par conséquent, il semble utile de développer de nouveaux outils de diagnostic, facilement utilisables par les laboratoires d'analyses de routine, pour détecter les faibles niveaux de Map potentiellement présents dans le sang des jeunes veaux. Nous avons présélectionné 24 femelles MAP-positives et 46 femelles MAP-négatives, vêlant en même temps, pour créer une cohorte de veaux nés de vaches excrétaut et non-excrétaut. Le statut des femelles a été confirmé par PCR (Bio-T kit® MAP, Biosellal) sur les échantillons fécaux avant et après le vêlage.

Chaque veau a été suivi mensuellement depuis la naissance, sur une période de plus de six mois, en utilisant le kit d'analyse Actiphage-PCR sur sang total (kit Actiphage™ Rapid, PBD Biotech et Bio-T kit® MAP) et également PCR sur des échantillons fécaux.

Une infection active naturelle a été identifiée par la détection de MAP dans des échantillons de sang en utilisant Actiphage-PCR dès le premier jour de vie, mais la bactériémie était transitoire. Une excrétion très précoce a aussi été détectée avec une PCR sur fèces de veaux (4g). Ces techniques semblent complémentaires et non en concurrence.

En utilisant un protocole Actiphage-PCR optimisé et facile à utiliser, il a été possible de détecter une infection active par MAP dans le sang des veaux avec une bonne reproductibilité des résultats.

La détection précoce de l'infection par MAP par Actiphage-PCR couplée à la PCR sur fèces sera très utile pour surveiller et améliorer les mesures préventives visant à limiter la propagation de la paratuberculose dans les élevages.

Cette étude nous a aussi permis d'enrichir les connaissances sur la contamination des veaux et d'adapter les conseils pour limiter l'amplification de la maladie en élevage.

I. Introduction :

1. La maladie

La paratuberculose est une maladie contagieuse, répandue en France comme dans le monde chez les ruminants domestiques ou sauvages, causée par *Mycobactérium avium paratuberculosis* (MAP). Elle se manifeste sous forme d'une entérite chronique. La maladie se caractérise par une phase d'infection subclinique très longue avec une excrétion intermittente pendant laquelle le dépistage des animaux infectés est difficile. La phase clinique se traduit par l'amaigrissement et de la diarrhée chez les bovins.

Mode de contamination, principalement Oro-fécale : généralement avant l'âge de 12 mois et plus particulièrement à la naissance(...), par ingestion de matières fécales contaminées, notamment par succion de mamelles souillées ou par l'environnement. Il existe également une transmission de la mère au veau par voie placentaire ou encore par le colostrum. (Document issu de l'intervention du Pr Yves Millemann janv 2014)

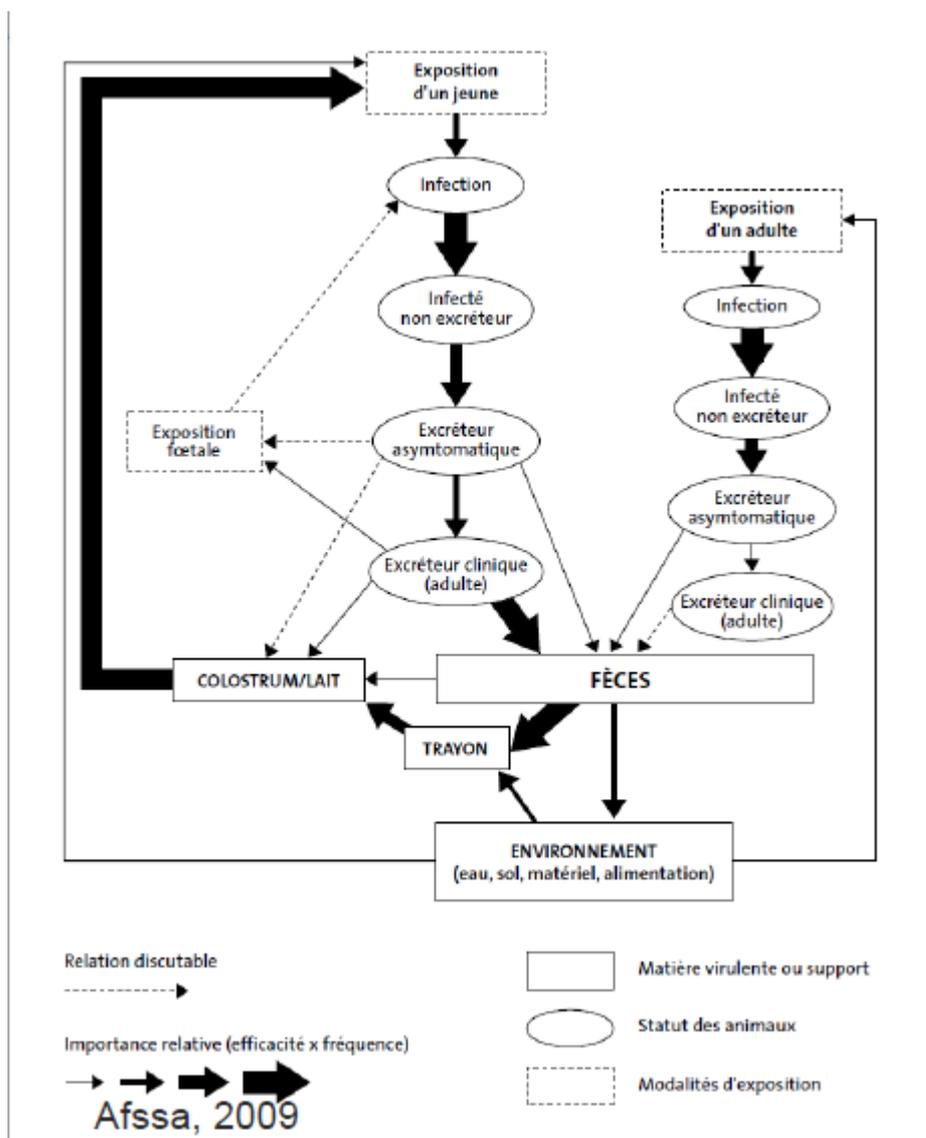
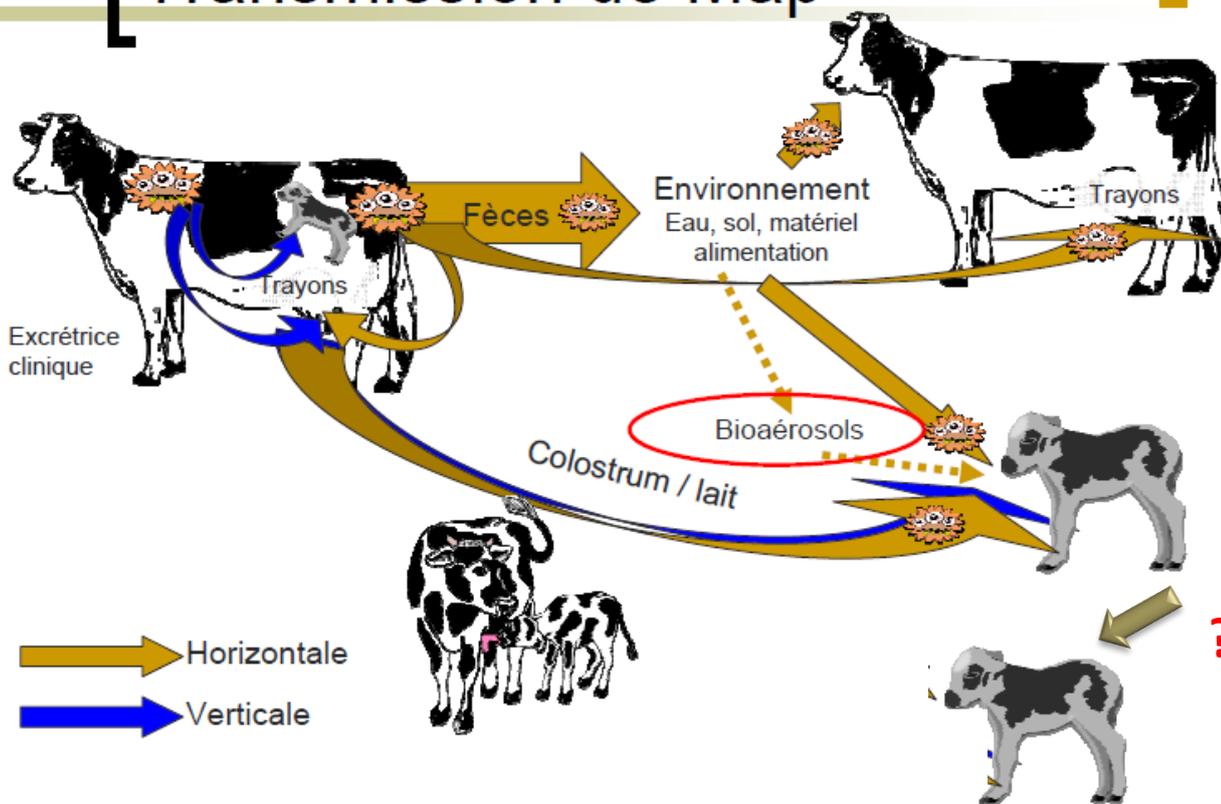


Schéma de contamination dans un élevage (doc issu de l'intervention du Pr Yves Millemann janv 2014)

Bilan Transmission de Map



D'après le Dr Jacquemine. VIALARD: 10 000 germes semblent suffisant pour contaminer un veau.

Les équivalences /

- 1g de fèces d'un bovin clinique contient 10^6 germes de MAP par gramme de fèces
- un bovin excréteur positif en culture peut avoir 10^2 germes de MAP par gramme de fèces.

Il y a des variabilités de virulence entre les souches qui peuvent avoir un impact en traduction "dose infectante"

2. Actions paratuberculose mises en place dans les Vosges.

La paratuberculose est très largement répandue en élevage dans les Vosges, comme en France ou dans le monde. Seulement, ces dernières années, elle a réellement pris de l'ampleur en raison des nombreux regroupements d'élevage (sans information préalable sur la paratuberculose des animaux mélangés), mais aussi des pratiques d'élevage.

A court terme, elle ne représente pas forcément un problème financier majeur dans les élevages faiblement touchés et qui n'ont qu'un cas clinique de temps en temps. De plus, en raison de la résistance de la maladie et surtout des pratiques des éleveurs, cette maladie ne fait que de s'amplifier dans les élevages. Aussi, les éleveurs ne s'en inquiètent que quand la maladie est trop handicapante financièrement pour eux (2-3 cas cliniques par

an). Or, lorsque ces cas apparaissent, la prévalence animale de ces élevages est souvent assez élevée et la gestion de l'assainissement s'avère plus complexe dans ces conditions.

Comme cette maladie est très compliquée à gérer pour les éleveurs lorsque la prévalence dépasse 10% des animaux adultes et afin de maximiser la réussite d'un assainissement, le conseiller sanitaire demande systématiquement la mise en place de mesures correctives avant le début d'un plan d'assainissement paratuberculose.

L'identification de ces pratiques à risque et la mise en œuvre des modifications adaptées, se font suite à l'audit initial réalisé avant tout dépistage. Elle passe forcément :

- par la limitation de l'amplification de la maladie par la gestion des contaminations des jeunes et
- par la limitation de l'expression clinique en agissant sur la gestion de l'alimentation des adultes (ainsi que tous les facteurs influant sur leur digestion).

La plus grande contrainte pour les éleveurs est l'utilisation d'un vrai box de vêlage avec une hygiène adaptée, ainsi que des soins appropriés aux veaux pour limiter leur contamination. Pour les élevages allaitants, le plus gros point est la séparation des animaux positifs (avec leurs veaux), des femelles reproductrices « connues négatives » avec leurs veaux.

La contamination des veaux par leur mère positive est « considérée » comme systématique ; l'accent est mis surtout, pour limiter les contaminations des veaux potentiellement issus de vache négative pour essayer d'assurer l'avenir du troupeau de renouvellement.

Dès les améliorations conseillées sont effectuées, un test sérologique initial est alors réalisé sur l'ensemble des reproducteurs de plus de 18 mois. Ensuite, des analyses sur bouse, Culture fécale (CF) jusqu'en 2016 et PCR depuis 2017, sont demandées sur les animaux séronégatifs afin d'identifier les animaux les plus à risques : les excréteurs.

Les animaux positifs, tant en sérologie qu'en PCR sont, dans la mesure du possible, réformés, mais dans le cas contraire une gestion particulière est alors mise en œuvre.

L'objectif de ce cumul d'analyses faites les 2^{èmes} années de plan (au minimum), a pour but de connaître les animaux les plus à risque pour limiter les contaminations des jeunes et faire prendre conscience aux éleveurs de maintenir les actions techniques. En terme de résultat de routine, il a été constaté que les animaux séropositifs (kit Idvet) sont aussi nombreux (surtout lors de CF), voire moins nombreux, que les animaux séronégatifs et PCR positifs (2 à 3 fois plus en général).

3. Quels sont les besoins des éleveurs en termes de gestion de la paratuberculose ?

Une grande variabilité de prévalence existe parmi les élevages touchés en paratuberculose : certains ont moins de 5% d'animaux positifs et d'autres peuvent dépasser les 30% et ce, quels que soient le nombre de cas cliniques.

Dans ces élevages où la maladie sévit, les éleveurs cherchent à identifier, au plus juste et le plus rapidement possible au cours de la carrière de l'animal, les animaux qui risquent d'être malades (le plus pénalisant financièrement à court terme) et ceux à l'origine de la contamination de leur environnement. Pour eux, il serait intéressant de pouvoir les identifier le plus tôt possible et surtout avant leur 1^{ère} insémination.

Leur but est d'assurer un renouvellement rapide et propre de leur troupeau : agir et moins subir la paratuberculose.

4. Les techniques d'analyse disponibles

Aucune méthode n'est actuellement reconnue comme Gold standard, même si la culture fécale a fait office de méthode de référence. Cet outil de diagnostic direct permettait de vérifier la présence de bactéries (MAP) vivantes dans les bouses d'animaux adultes porteurs et excréteurs de la maladie. La MAP pousse alors durant les 4 mois de mise en culture.

La culture fécale a été arrêtée dans le cadre des dépistages collectifs, en 2016 dans les Vosges, en raison de son temps de culture, de ses difficultés de lecture, des difficultés d'approvisionnement des milieux de culture, de la contrainte technique nécessaire au laboratoire. Actuellement, la PCR semble la seule technique directe, utilisable dans le dépistage de masse de la paratuberculose dans les élevages contaminés. Seulement, la PCR, technique très sensible, permet de détecter toutes les traces d'ADN de MAP présentes dans un gramme de bouse.

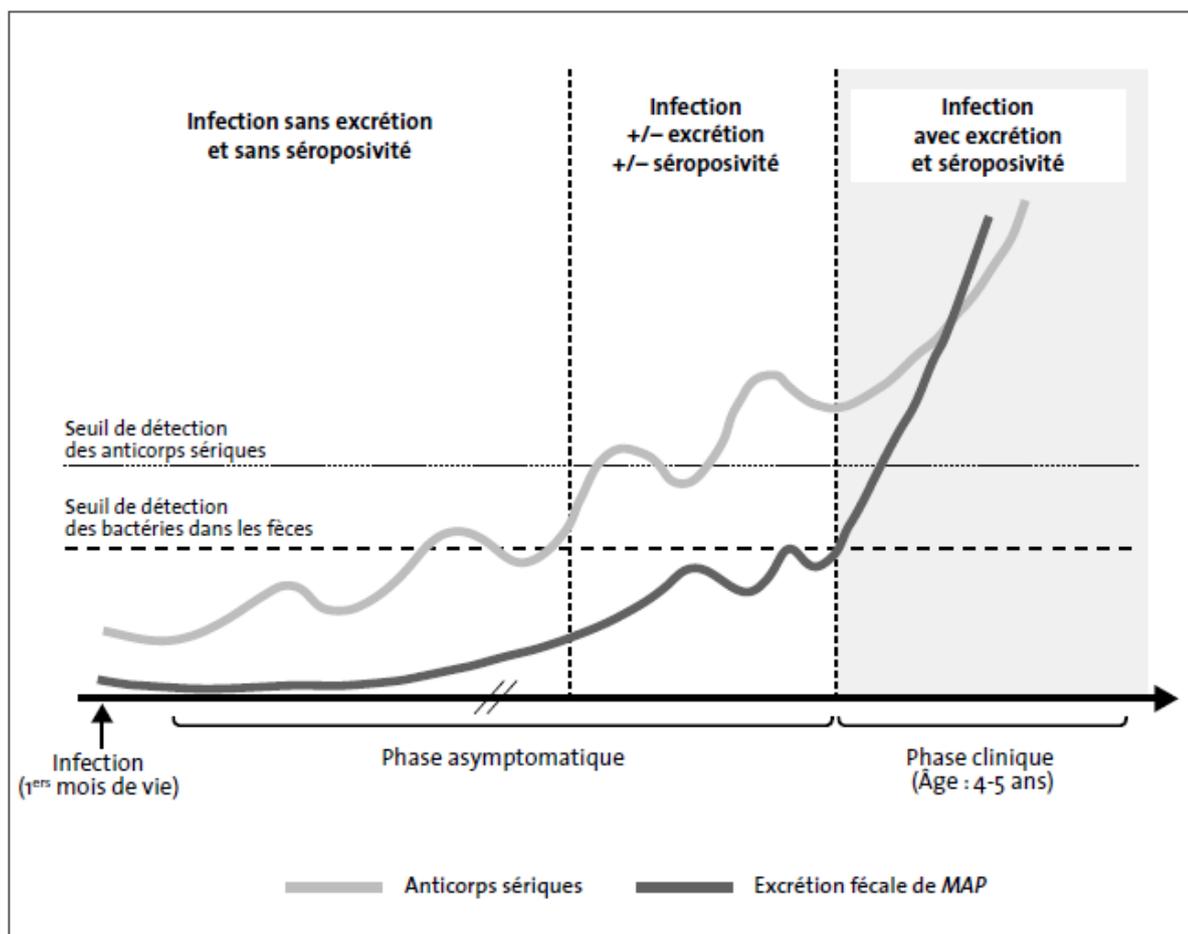
La présence de l'ADN ne signifie pas pour autant que la bactérie soit vivante et contaminante et ne signifie pas pour autant que l'animal positif en PCR risque d'être malade.

Les techniques de diagnostic directes mettent en évidence la MAP dans différentes matrices : dans les bouses (Dr J. VIALARD), dans l'environnement des animaux : prélèvements d'environnement (thèse vétérinaire de M. M Mauriceau oct. 2013 – R. Guattéo), dans les digestats issus de méthanisation (Etude méthanisation et paratuberculose C HAAS-GDS 88), dans le lait (soit par contamination directe ou indirecte), dans l'eau, voire dans l'air... Cette bactérie est très résistante dans l'environnement (Pr Yves Millemann).

N'ayant aujourd'hui aucune technique de référence officialisée pour cette maladie, les laboratoires peuvent créer des kits d'analyse directe ou indirecte en les comparant avec les techniques actuelles courantes. Mais cela ne facilite pas forcément la gestion de la maladie dans les élevages, ni l'efficacité d'une action avec les éleveurs. *D'ailleurs une étude (présentée par le Dr Christelle ROY à l'ICP à Nantes en 2016) comparant les différentes techniques de diagnostic indirect dans des élevages attestés négatifs, montre une grande variation de résultat entre les kits utilisés sur le marché : « plus d'un élevage considéré négatif avec un test ELISA ne le serait peut-être plus avec un autre test ELISA » !*

Les techniques actuelles à usage courant (l'interféron Gamma n'en fait pas partie : diagnostic le plus précoce connu mais non utilisable en routine en raison de la difficulté de traitement du prélèvement qui doit se faire dans les 6 heures suivant le prélèvement), permettent un début de dépistage des animaux à partir de 18 mois : recherche d'anticorps et excrétion à partir de 24 mois (Paratuberculose des ruminants AFSSA mars 2009).

Évolution de l'excrétion et de la sérologie au cours d'une infection paratuberculeuse



5. Infection d'un veau par Map

La 1^{ère} étape de l'infection consiste en un passage de la muqueuse intestinale, plus précisément au niveau des plaques de Peyer, tissu lymphoïde associé à l'intestin au niveau jéjunale et iléocœcale créant des lésions granulomateuses.

Les cellules M, tapissant la bordure en brosse des microvillosités intestinales à ce niveau, sont chargées de la transcytose du microorganisme, et ce dans la ½ h suivant l'infection (KHARE et al, 2009). Ce mécanisme passe par l'expression du bacille de protéines d'attachement de la fibronectine, qui se lie ensuite à l'intégrine des cellules M et permettent l'entrée de Map dans celles-ci (WOO et CZUPRYNSKI,2008).

Il a été montré que les amygdales sont une 2^{ème} porte d'entrée de Map, qui s'y propage vers les nœuds lymphatiques mésentériques et l'iléon par voie hématogène ou lymphatique (WATERS et al. ; 2003)

La réponse immunitaire à médiation cellulaire est la première à se mettre en place, généralement entre un et dix mois d'âge (LEPPER et al,1989). Les tests diagnostiques visent à prouver que l'existence de la réponse immunitaire cellulaire semble associée à l'apparition de signe clinique (KOO et al, 2004)

La diversité des profils d'expression de la maladie. Trois catégories d'animaux peuvent ainsi être déterminés : (GOURREAU et al.2011)

- Les animaux infectés résistants : l'infection est contrôlée, les animaux deviennent rapidement résistants et ne sont pas excréteurs.
- Animaux excréteurs sains : l'infection est partiellement jugulée et l'excrétion est intermittente
- Animaux devenant à terme malades, avec une persistance de la bactérie.

Ces différents groupes d'animaux, tous infectés, montrent la complexité de la relation mycobactérie-hôte, et à ce jour les mécanismes exacts à l'origine de ces réponses restent relativement méconnus.

6. La bactériémie

La contamination d'un animal qui serait à l'origine de la maladie, serait due à une invasion de la bactérie dans le tube digestif et le sang.

Il existe une bactériémie sur les animaux proches de la phase clinique : test possible sur le sang (Document extrait de : « Paratuberculose des ruminants » AFSSA mars 2009 ci-après). Une Etude récente, en Angleterre, a mis en évidence la bactérie vivante dans le sang d'animaux en phase clinique avec une technique de PHAGE PCR (2013 Sep ; 94(3) : 175-179.

Document extrait de : « Paratuberculose des ruminants » AFSSA mars 2009

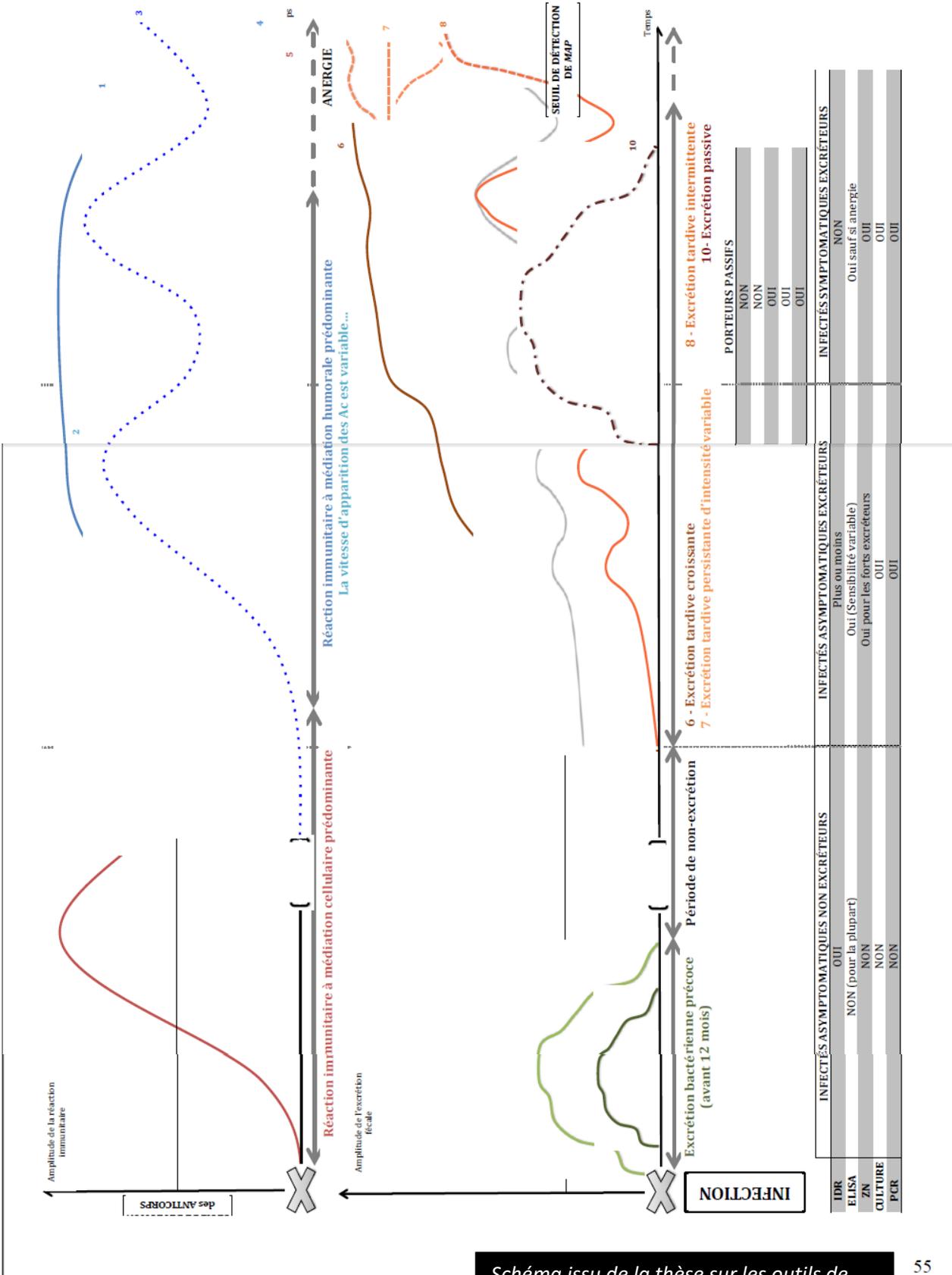


Schéma issu de la thèse sur les outils de diagnostics par C,M MAURICEAU 2013

Bactériémie

Dans un modèle expérimental d'inoculation intra-intestinale, la colonisation du foie et des nœuds lymphatiques est intervenue très rapidement (une heure après l'inoculation) (Wu *et al.*, 2007).

Dans les conditions naturelles, MAP peut être disséminé par voie lymphatique puis sanguine, probablement par les phagocytes mononucléés.

Des acides nucléiques de MAP ont été détectés par des techniques de PCR dans la fraction leucocytaire du sang, chez des ovins en phase clinique (Gwozdz *et al.*, 1997; Bhide *et al.*, 2006) et chez des bovins en phase asymptomatique ou clinique (Buergelt et Williams, 2004; Bhide *et al.*, 2006). Chez les bovins testés, les résultats positifs en PCR semblaient liés positivement à la détection d'anticorps sériques, avec de rares cas sur des bovins séronégatifs (Buergelt et Williams, 2004). Les cellules sanguines, supports de la détection positive par PCR, n'ont pas été identifiées.

La dissémination lymphatique et sanguine explique la contamination d'organes autres que digestifs, notamment le foie, la mamelle, les organes génitaux mâle et femelle ainsi que le fœtus.

Ainsi, l'isolement de MAP à partir d'organes extradiestifs est possible, y compris en l'absence de signes cliniques ou de lésions macroscopiques intestinales patentes (Antognoli *et al.*, 2008). L'existence d'une véritable bactériémie est démontrée indirectement par la présence de lésions sur des organes autres que digestifs, comme le foie par exemple (Antognoli *et al.*, 2008). La fréquence des bactériémies et le stade de l'infection auxquelles elles surviennent sont encore incomplètement connus.

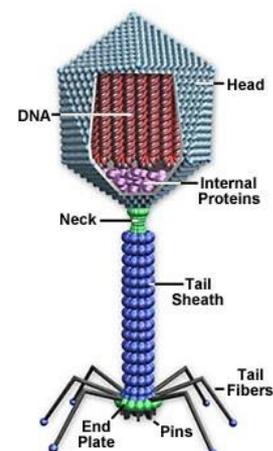
- Une publication récente de Corbett et al. Vet Res 2017 a mis en évidence la transmission entre veaux de la mycobactérie paratuberculosis par une excrétion fécale des veaux.

Il existe une contamination des veaux nouveaux nés avec une excrétion au niveau des fèces (étude Corbett et al. Vet Res 2017)

7. La méthode ACTIPHAGE™ PCR sur sang

Les bactériophages sont des virus qui infectent les bactéries avec une spécificité d'hôte au niveau de la famille, du genre, voire de l'espèce

- *Structure*
 - *Tête qui contient le matériel génétique (ADN)*
 - *Queue qui permet l'adhésion à la bactérie et l'injection du matériel génétique viral*



*Elles infectent **uniquement des bactéries vivantes et en phase de multiplication***

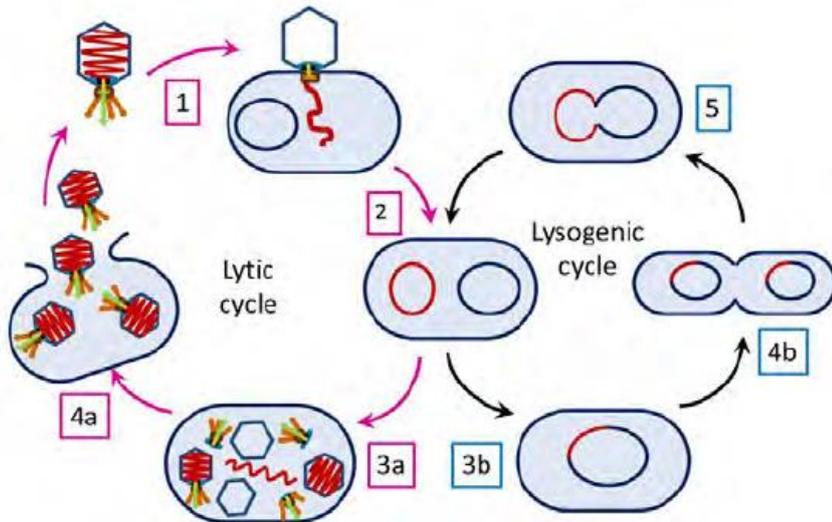
Les Phages reconnaissent la paroi bactérienne.

Elles ont une phase d'adhésion réversible à l'acide mycolique pour Mycobactéries – facilitée par ions Ca^{2+} . Et une phase d'adhésion irréversible (récepteur inconnu).

L'inoculation du matériel génétique suite à adhésion irréversible

Mécanisme d'action du phage

- Réplication du matériel génétique selon deux modes principaux
 - **Cycle lysogénique** = intégration du matériel génétique viral répliqué dans les plasmides ou K bactériens = application pour transfert de gènes naturels (ex shigatoxines *E. coli*) ou volontaires en génie génétique
 - **Cycle lytique** = destruction de la paroi de la bactérie pour libération des particules virales = plages de lyse sur cultures bactériennes, dissémination par diffusion dans milieu agar aux bactéries voisines

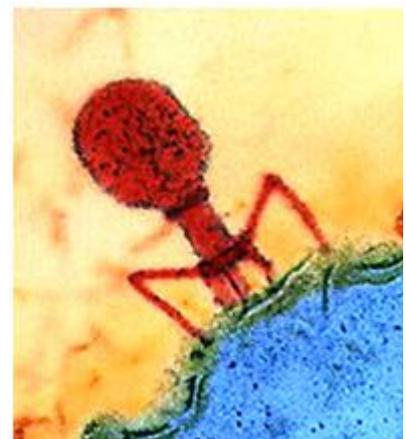


Actiphage est un test sur le sang mais aussi sur le lait, créé à l'Université de Nottingham par les Docteurs Cath Reest et Ben Swift. Un système lancé en 2017, mis au point dans la lutte contre la tuberculose bovine et basé sur une analyse cutanée de la réponse du système immunitaire. Dans des mots du Dr Reest « notre nouveau test est unique puisque c'est la preuve unique qui détecte directement les bactéries vivantes dans le sang ou le lait, et il est rapide, spécifique et hautement sensible. De plus, il permet de distinguer la différence entre un animal vacciné et un animal infecté, en ouvrant le chemin vers de nouveaux types de contrôles de maladies dans l'avenir, quand il y aura des vaccins disponibles. »

Qu'apporterait la Phage PCR comparée (matrice sang et bouse) à une PCR classique

La phage en préalable à la PCR

- Infection uniquement de bactéries vivantes et en phase de multiplication
- Reconnaissance de la paroi bactérienne
 - Phase d'adhésion réversible à l'acide mycolique pour Mycobactéries – facilitée par ions Ca^{2+}
 - Phase d'adhésion irréversible (récepteur inconnu)
- Inoculation du matériel génétique suite à adhésion irréversible
- Lyse des cellules MAP vivantes infectées
- Détection du matériel génétique de la MAP lysées par PCR



L'objectif de cette étude était de développer une méthodologie pour détecter rapidement *Mycobacterium avium* subsp **viable**, paratuberculosis (MAP) dans des échantillons de bouse et de sang.

Le temps de dosage total est de 48 h et, contrairement aux tests de détection basés sur la PCR, seules des cellules **viables** sont détectées.

Une méthode rapide pour détecter la MAP vivante dans le sang et bouse pourrait favoriser la compréhension de l'infection disséminée chez les animaux atteints de paratuberculose ou maladie de Johne.

Intérêts dans le diagnostic de la Paratuberculose

- Limites des techniques actuelles
 - Limites du diagnostic indirect
 - ELISA = problème de spécificité par rapport aux Mycobactéries de l'environnement
 - Difficulté de mise en œuvre des tests de l'immunité cellulaire type IFN gamma
 - Limites de la culture
 - Durée en mois
 - Prélèvements contaminés par flore annexe compétitrice
 - Limites de la PCR
 - Matrices analytiques compliquées en termes de pré-traitement: Fèces
 - Matrices analytiques riches en Inhibiteurs de la PCR / perte de sensibilité diagnostique
 - Bactéries difficiles à lyser = perte rendement extraction
 - Pas de distinction bactéries vivantes/ mortes
- Intérêts des techniques bactériophages-PCR
 - Améliorer la sensibilité grâce au phage = repère et lyse toutes les Mycobactéries présentes et PCR vérifie spécificité
 - Utilisation d'autres matrices analytiques = sang total, lait cru
 - Détection uniquement des bactéries viables

Deux méthodes patentées par PBD Biotech

Basées sur l'utilisation d'un phage spécifique, propriétés lytiques = **phage D29** – sélectionné parmi les plus de 4200 Mycobactériophages connus

- Utilisation d'un Milieu spécifique pour culture de Mycobactéries et adhésion du phage – **Medium plus** -
- Validées pour Tuberculose et Paratuberculose sur deux types de matrices analytiques
 - Sang total
 - Lait cru
 - Pré-traitement indispensable
- Méthode initiale = Méthode plaques - 48 heures
- Méthode pour laboratoire de diagnostic = **Méthode « one day » moins de 6 heures**

Nature des Echantillons

Objectifs

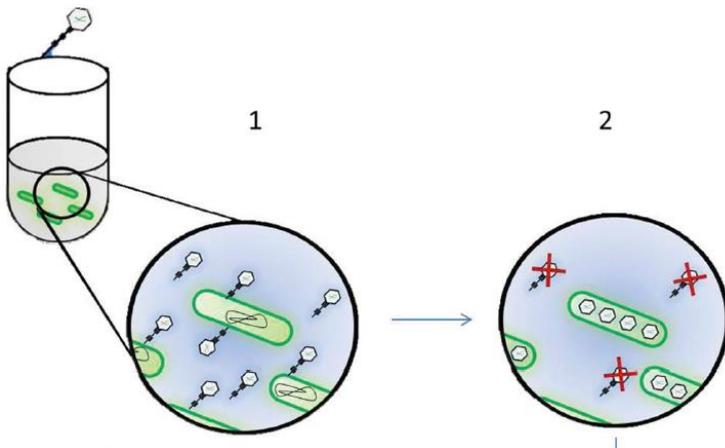
- Contenant non inhibiteur du processus d'adhésion du phage aux mycobactéries
- Conditions d'envoi maintenant la viabilité des Mycobactéries
- Conditionnement et envoi d'échantillons
 - Lait cru, **sur la nuit et sous couvert du froid** – refus si lait caillé
 - Sang total sur tube **Hépariné** de sodium (EDTA chélateur cations divalents inhibe adhésion phage) – température ambiante pour prévenir hémolyse (Hémoglobine inhibe phage) -**24-48h maximum**

Prétraitement des Echantillons

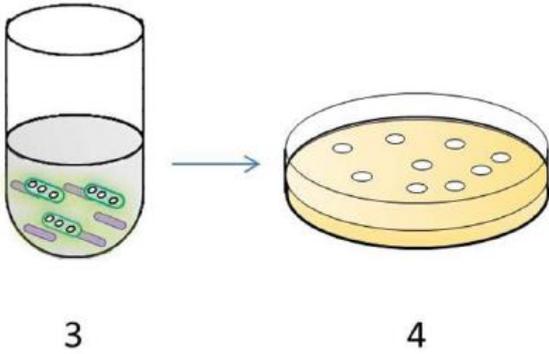
- Objectifs
 - Récupérer phase contenant les Mycobactéries
 - Maintenir intégrité et viabilité des Mycobactéries
 - Éliminer les inhibiteurs de l'adhésion et de l'infection du phage
- Préparation de l'Echantillon
 - Lait – centrifugation pour récupération culot cellulaire et éliminer la crème, lavage des cellules dans milieu « Medium plus » pour diluer les inhibiteurs du lait, reprise cellules dans « Médium Plus » (volume différent selon Méthode)
 - Sang total sur tube Hépariné - Séparation gradient Ficoll (Leucosep) ou Hetasep pour récupérer phase cellulaire « blanche » et enlever GR avec Hémoglobine inhibitrice de l'adhésion du phage, récupération cellules dans « Médium plus » (volume différent selon Méthode)

Processus analytique

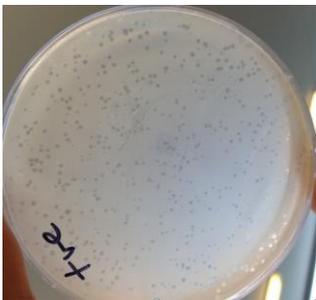
1. Mise en contact de l'échantillon et de phage
 - Phage D29
 - Ratio concentration phage / quantité Mycobactéries à respecter pour détection de minimum 1 bactérie
 - Incubation 1h à 37°C = infection des Mycobactéries viables mais pas de cycle lytique complet
2. Destruction des phages n'ayant pas infecté de Mycobactéries
 - Virucide = Virusol (sulfate d'ammonium ferreux)
 - Dilution dans le milieu pour neutraliser le virucide toxique pour Mycobactéries



- Révélation présence de phage ayant infecté des Mycobactéries présentes dans l'échantillon par plages de lyse sur culture de *Mycobacterium smegmatis* dans agar semi-solide
3. *Mycobacterium. smegmatis* non pathogène, pousse rapidement en culture
 4. Incubation pendant la **nuît à 37°C** pour terminer cycle lytique des phages ayant infecté les Mycobactéries de l'échantillon et diffusion des phages vers *M. smegmatis* dans milieu semi-solide = formation de **plages de lyse**



- Prélèvement et purification ADN plaque de lyse
 - Au centre de chaque plaque de lyse, 1 Mycobactérie présente dans l'échantillon
 - Doit être réalisé dans les 24h maximum sinon dégradation des ADN
 - Prélèvement de 5 plages de lyse dans 1 même tube
 - Purification sur colonne pour éliminer agar – élution dans 10 à 20µl
 - PCR temps réel spécifique MAP ou MTBC
 - Ex: **Bio-T kit® MAP** testé sur éluât de 5 plages de lyse dans 20µl – PCR sur 5µl = 1.25 bactéries/PCR - Ct 33-35 (pour rappel LD_{PCR} = 0.3 bactéries/PCR)



Méthode « One Day »

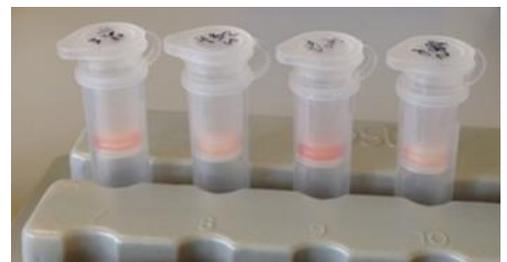
- Idem pour préparation échantillon mais les cellules sont reprises dans un volume réduit de « Médium Plus »
- Mise en contact avec phage (respect du même ratio)
 - **Dans tube « one Day »**



- Tube collecteur avec capuchon
- colonne interne avec filtre 0.2 µm
- Incubation **3h à 37°C** pour permettre infection par phage et cycle lytique sur bactéries vivantes
- Centrifugation pour récupérer ADN des lysats de Mycobactéries infectées par phage (filtre 0.2µm retient les cellules et les bactéries mortes) – clean up de l'ADN sur colonne
- PCR spécifique **Bio-T kit® MAP**

Avantages/Méthode Plaques

- Disponibilité sous forme de kit
 - Phage très stable sous forme lyophilisée (17 ans)



- Ergonomie, rapidité
- Adaptée aux gros débits
- Plus sensible que technique plages de lyse

Publication sur la technique Phage : « Development of a rapid phage-based method for the detection of viable MAP in blood within 48h »

II. Objectif de l'étude :

Etude de la transmission de Map de la Mère à son Veau et de Veaux à Veaux et développement d'un nouvel outil de diagnostic.

- Etudier la transmission mère-veau en déterminant à partir de quel âge un veau issu d'une mère excrétrice au moment du vêlage peut être détecté comme contaminé activement: sur quel type de prélèvement (sang total ou fèces) et avec quelle technique (PCR directe ou phage-PCR)
- Etudier la transmission de Map inter-veaux entre veaux issus de mères excrétrices et veaux issus de mères non-excrétrices dans les conditions réelles d'élevage.
- Créer (Laboratoire BIOSELLAL) et tester un nouvel outil de diagnostic par la méthode Actiphage-PCR sur sang total et fèces pour :
 - Pour détecter précocement une atteinte des veaux par Map
 - Déterminer les animaux porteurs de Map vivantes (bactériémie).
 - Améliorer la détectabilité de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*
 - Déterminer la viabilité des Mycobactéries

Adaptation d'un nouvel outil et développement d'un nouvel outil de recherche de **bactéries vivantes** chez les adultes et les veaux sur 2 matrices différentes pour gérer des dépistages de masse dans les élevages touchés par la Map.

NB : la matrice lait, support ou vecteur possible de Map, a été exclu volontairement de l'étude.

III. Matériels et méthodes

1. Besoin pour l'étude :

Critères souhaités par les partenaires de l'étude pour avoir des résultats exploitables :

- ⇒ Avoir au moins 25 mères positives avec leur veau
- ⇒ environ 50 mères négatives avec leur veau.
- ⇒ Avoir des naissances de veaux issus de mères négatives en même temps que des veaux issus de mères positives

Les mères positives retenues ont été détectées PCR positives (quel que soit le Ct): donc excrétrices, et quel que soit le résultat sérologique. Les mères négatives intégrées pour cette étude devaient être détectées négatives en sérologie et en PCR sur bouse, donc non excrétrices.

2. Sélection des élevages

Le choix s'est porté sur 3 exploitations avec un grand nombre de vaches laitières (plus de 100) avec un fort pourcentage de vaches positives (ELISA et/ou CF et/ou PCR) en paratuberculose. L'objectif étant d'avoir le plus rapidement possible le nombre d'animaux souhaités.

Ces élevages sont entrés en plan paratuberculose l'année précédente ou en cours avec des taux de positivité élevés (voir tableau avec les conditions d'élevages/ point 1 résultat).

Les 3 exploitations choisies pour l'étude sont nommées : G.GF, G.HD et G.GR

L'étude s'est déroulée de décembre 2017 à mars 2019 : une grosse saison de vêlage.

3. Première série d'analyse initiale à l'étude T.O :

- Prélèvements sur les femelles de plus de 18 mois : sérologie sur tube sec et PCR sur bouse
- Analyses sérologiques : comparaison des résultats sur 2 kits sérologiques ELISA IDVET et BIOSELLAL.
- Prise de sang sur toutes les femelles des 3 troupeaux quels que soient les résultats antérieurs.
- Cumul de 2 techniques d'analyses sérologiques (individuelle) ELISA Idvet (utilisée en routine au LVDA88) et sérologiques (individuelle) ELISA Biosellal (étalonnée suivant des résultats PCR sur bouses)
 - ⇒ En cas de divergence de résultats entre les 2 techniques d'analyses, des PCR sur bouse sont réalisées.
 - ⇒ Les animaux séropositifs seront tous vérifiés par PCR classique
 - ⇒ Les animaux PCR positifs l'année n-1 seront aussi vérifiés par PCR même si les résultats sérologiques aux deux tests sont négatifs.
 - ⇒ Vérification des animaux négatifs en sérologie par PCR sur bouse.

Témoin pour la sérologie : Une 4^{ème} exploitation témoin en sérologie « attestée régulièrement contrôlée négative en paratuberculose depuis 14 février 2008 fera aussi l'objet de test avec les 2 techniques de sérologie ELISA afin de s'assurer qu'il n'y ait pas de divergence entre les 2 kits. Les tests sont réalisés sur 142 animaux de 24 à 72 mois comme le prévoit la qualification ACERSA dans cet élevage.

Etude T0 : comparaison de 2 kits d'analyse sérologique paratuberculose : kit Idvet et kit Biosellal

* 363 animaux testés sur le sang, âgés plus de 18 mois

* 3 exploitations testées : 2 connues touchées par la paratuberculose et 1 élevage attesté contrôlé négatif en paratuberculose depuis le 14/02/08 (kit Idvet)

4. Animaux prélevés.

Pour les animaux susceptibles d'être retenus dans l'étude, nécessité de connaître les dates de mise bas. Les prélèvements sont réalisés dans les 3 exploitations le même jour.

Un rendez-vous mensuel fixe est prévu pour prélever l'ensemble des animaux durant la période de l'étude :

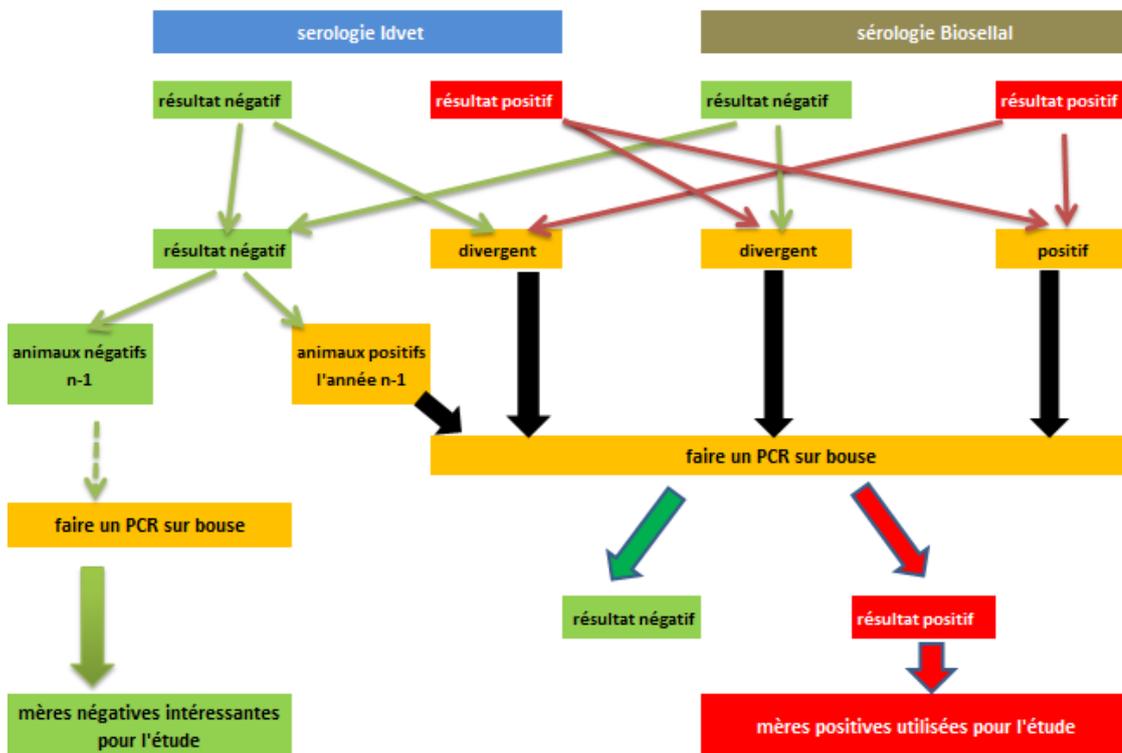
- ⇒ les mères désignées dans l'étude le mois précédent le vêlage et le mois suivant le vêlage.
- ⇒ Les veaux issus des mères concernées, sont testés mensuellement durant toute la période de l'étude.



⇒ **Arbre décisionnel des animaux à choisir pour l'étude PHAGE PCR**

- identification des VL « positives »
- Identification des VL « négatives »

Arbre décisionnel des animaux à choisir pour l'étude PHAGE PCR



5. Matériel de Prélèvements

a. sur les veaux et vaches concernés par l'étude

Prélèvements

Matrice	Support	Quantité prélevée	Méthode	Analyse
sang	Tubes héparines de <u>sodium</u>	Minimum 4ml	Aiguilles à usage unique	PHAGE PCR Map
bouse	Flacon de 40ml	Plus de 6g	Gants à usage unique sans lubrifiant	PCR CLASSIQUE PHAGE PCR Map

Les mêmes prélèvements sont réalisés sur tous les animaux : mères et veaux suivant les besoins et modalités de l'étude



b. Prélèvements d'environnement

Les prélèvements d'environnement sont basés sur la récolte des matières fécales en différents points des infrastructures d'élevage. Ces prélèvements sont par nature des mélanges de fèces et sont de bons prédateurs du statut du lot. Ils sont utilisés en fin étude, afin de vérifier la présence de Map dans l'environnement des animaux adultes ou jeunes étudiés dans l'étude.

L'objectif est de faire des prélèvements dans l'environnement de tous les animaux prélevés et dans le ou les box de vêlage.

Le choix ne s'est pas porté sur des chiffonnettes comme en région Grand Ouest mais sur des prélèvements de litière et matières fécales à différents endroits. En effet, le Laboratoire n'est pas habitué à travailler avec des chiffonnettes et préfère travailler sur des supports de prélèvements classiques.

Des schémas en annexe permettent de visualiser les mouvements des animaux dans les bâtiments (voir annexe).

Matériels

1 pot de prélèvements à bouchon translucide d'un volume de 15 cl,
1 gant de fouille par pot – 1 pot par box et 2-3 pots dans les VL suivant le nombre de VL dans le lot (1 pot par 30 VL max).

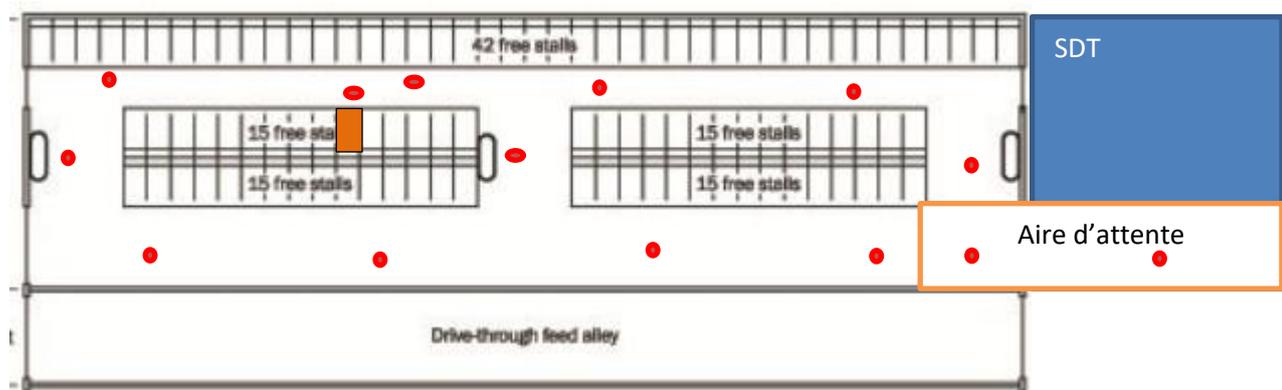


Méthodes : réalisée une fois en période hivernale

Prélèvements sur différents sites :

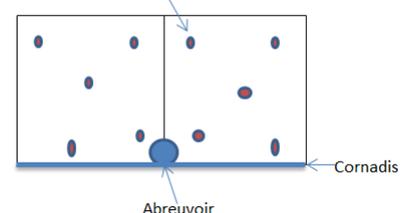
- pour les VL / 2-3 pots
 - Aire d'attente de la salle de traite
 - Aire de raclage
 - à proximité des abreuvoirs et des DAC

Exemple de points de prélèvements dans une stabulation de vaches laitières : prélèvements répartis dans le bâtiment suivant les endroits les plus fréquentés par les VL : 5 points environ/pots – 3 pots



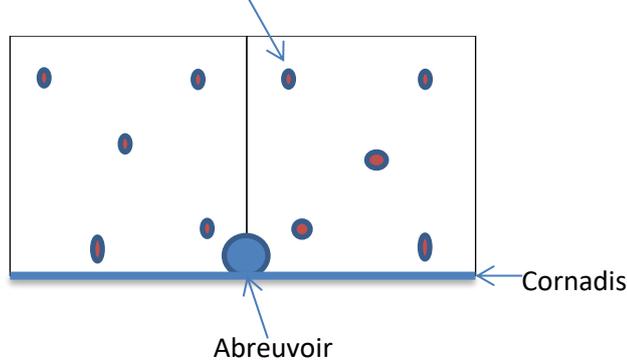
- Box de vêlage et box de jeunes ou cases collectives des veaux – 1 pot par box
 - une aire paillée en 3 endroits différents
 - 1 prélèvement proche des abreuvoirs

Exemple de box avec points de prélèvements / 1 pot par box – 5 points de prélèvements



- Prélèvement dans l'aire de d'alimentation ou aire de raclage
- cases individuelles ou veaux à l'attache prélevés
 - 3-4 points de la litière

Exemple de box avec points de prélèvements / 1 pot par box – 5 points de prélèvements



Ces prélèvements d'environnement ont été réalisés en décembre 2018.

Identification des échantillons (annexe)

Lot avec les numéros des animaux prélevés et type d'animaux

Acheminement

Les prélèvements sont faits la veille de l'arrivée au laboratoire – les prélèvements sont conservés à température ambiante.

Analyse :

c. Conditions d'acheminements des prélèvements

Les échantillons de sang nécessitent des conditions particulières pour le Phage, dans des **tubes avec de l'héparine de sodium**. Ces conditions de transport devront limiter les variations de température durant le temps nécessaire entre le prélèvement et le début de l'analyse de la Phage. En effet, il faut limiter l'hémolyse qui inhibe l'action du Phage.

Les conditions de température à respecter pour les tubes de sang (avec héparine) sont entre 20 et 25°C sans rupture ou choc thermique.

Les prélèvements de bouse ne devront en aucun cas être congelés afin d'optimiser la technique phage (technique arrêtée en janvier 2018), ils devront être maintenus à température ambiante.

Délai à respecter pour la PHAGE : De plus, le temps entre les prélèvements et la mise en analyse Phage doit être inférieur à 24h (max 48h).

En pratique : Les prélèvements sont réalisés la veille du passage de la navette du laboratoire. Ils sont acheminés dans un container qui permet de maintenir à température ambiante de 20°C environ et d'éviter les variations de température.



Les conditions de transports prévus :

- a) prélèvements de sang et de bouse, le même jour dans les 3 exploitations
- b) acheminement des prélèvements par une navette entre cabinet vétérinaire et laboratoire

6. Analyses

- 1. Sur sang : PHAGE PCR MAP – une adaptation indispensable en début d'étude.

Les analyses Phage sont réalisées l'après-midi de l'arrivée de la navette au laboratoire (arrive vers midi) : (soit 9h j-1 à 14-15h j) soit maximum environ 32h entre le prélèvement et l'analyse Phage.

La PCR pouvant être réalisée ultérieurement à partir du moment où l'ADN est isolé.

En janvier 2018, un souci technique de séparation des globules est apparu avec la séparation Ficoll utilisée au départ. En février, la technique avec Hetasep est testée (plus facile à utiliser et qui a donné immédiatement de bons résultats)

De plus, afin de s'assurer que les échantillons soient bien analysés, 2 volumes de sang ont été testés : 2 et 4 ml

- Phage-PCR sur sang total = Principe de l'utilisation du test Actiphage™ Rapid Assay (PBD Biotech) inclus dans le Pack BioExtract® Phage BD (BioSella)
 - Etape 1 = 1 heure + incubation sur la nuit
 - Isolement des PBMC par agrégation des Erythrocytes à l'aide du réactif RedDown® (protocole optimisé au cours de l'étude à partir de 4ml de sang avec gain en sensibilité)
 - Re-suspension des PBMC dans du Medium-Plus (fourni dans le kit Actiphage™ Rapid Assay) : choc osmotique avec libération des Mycobactéries contenues dans les PBMC
 - Incubation sur la nuit à 37°C = Mycobactéries en bonnes conditions pour être infectées par le Phage
 - Phage-PCR sur sang total = Principe de l'utilisation du test Actiphage™ Rapid Assay (PBD Biotech) inclus dans le Pack BioExtract® Phage BD (BioSella)
 - Etape 2 = 3h30
 - Ajout de l'Actiphage™ dans la suspension contenant éventuellement les Mycobactéries et transfert dans la partie supérieure de l'Actiphage™ Rapid Tube (fourni dans le kit Actiphage™ Rapid Assay)

- Incubation pendant au moins 3h30 à 37°C pour permettre l'accomplissement du cycle lytique du Phage au sein des Mycobactéries viables
 - Centrifugation de l'Actiphage™ Rapid Tube pour récupérer dans la partie inférieure le génome des Mycobactéries viables infectées et lysées par le Phage (filtre 0.2µm)
 - Phage-PCR sur sang total = Principe de l'utilisation du test Actiphage™ Rapid Assay (PBD Biotech) inclus dans le Pack BioExtract® Phage BD (BioSella)
- Etape 3 = 1h15
 - Concentration et purification du filtrat à l'aide du kit PurePhage® (BioSella) = 15 minutes
 - PCR réalisée directement sur ADN concentré et purifié à l'aide du Bio-T kit® *Mycobacterium avium paratuberculosis* = 1 heure

Au final, après différents tests comparés, la séparation des sangs avec la technique Hetasep 2*2 ml de sang fonctionne très bien et semble adaptée. Cette technique est retenue.

- 2. Sur bouses : PCR classique / kit Biosella

Pour la PCR pour les veaux, le laboratoire a essayé de prélever 2 à 5g.

Tests faits en cours d'étude afin d'optimiser la détection de Map (en janvier et février) :

- 2g de prise d'essai avec 10ml d'eau – décantation doublée
- 5 g de prise d'essai avec 40ml d'eau – décantation de 10 min
- 10 g de prise d'essai avec 30ml d'eau – décantation de 20min

Au final, le choix s'est porté au laboratoire avec 2g de prise de bouse mélangés à 30ml d'eau mis à décanter pendant 20min environ

la PHAGE PCR sur bouse à poser des soucis d'inhibition au laboratoire dès le début de l'essai, il a donc été choisi de l'arrêter en février 2018.

- PCR sur fèces veaux
 - a. Prise d'essai 2g
 - b. Protocole optimisé de prétraitement des fèces de veaux afin de gagner en sensibilité de détection = augmentation du volume de diluant des fèces (eau) de 1,8 ml à 10ml
- PCR sur fèces mères
 - a. Prise d'essai 2g
 - b. Protocole classique de prétraitement et d'extraction-purification des Acides nucléiques associé au Bio-T kit® *Mycobacterium avium paratuberculosis* et validé selon NF U-47 600-2 pour une détection, une quantification absolue et une quantification relative de MAP par rapport à un MRSI (fourni par BioSella)
- PCR sur environnement

- Prise d'essai 2g de matières fécales ou 2ml de lisier
- Protocole classique de prétraitement et d'extraction-purification des Acides nucléiques associé au Bio-T kit® *Mycobacterium avium paratuberculosis*

Evolution des Techniques de laboratoire utilisées par matrice et en fonction de l'âge des animaux pour l'étude

Mois	Fèces mères	Sang mères	Fèces Veaux	Sang Veaux
Décembre 2017	2g -1.8ml de surnageant Phage-PCR et PCR extraction	2ml- séparation Hetasep Phage-PCR et PCR extraction	2g -1.8ml de surnageant Phage-PCR et PCR extraction	2ml- séparation Hetasep Phage-PCR et PCR extraction
Janvier 2018	2g -1.8ml de surnageant Phage-PCR et PCR extraction	2ml- séparation Ficoll car culot jugé trop petit en Hetasep et avis mitigé de PBDBiotech sur Hetasep Phage-PCR et PCR extraction seulement sur positives attendues (problème de manip avec séparation Ficoll)	2g -10ml de surnageant Phage-PCR et PCR extraction Pour améliorer détectabilité sur fèces veaux : 1 positif	2ml- séparation Ficoll car culot jugé trop petit en Hetasep et avis mitigé de PBDBiotech sur Hetasep Phage-PCR et PCR extraction
Février	2g -1.8ml de surnageant PCR extraction Arrêt Phage-PCR sur fèces car problème d'inhibition adhésion du phage non résolu	2 fois 2ml- séparation Hetasep (arrêt Ficoll suite erreur de manip et difficultés mise en place pressenties pour laboratoire terrain) Phage-PCR Arrêt PCR extraction sur sang car pas assez sensible	10g -10ml de surnageant PCR extraction Pour améliorer détectabilité sur fèces veaux Arrêt Phage-PCR sur fèces car problème d'inhibition adhésion du phage non résolu	Comparaison 2ml et 4ml pour améliorer détectabilité sur sang veaux - séparation Hetasep Amélioration de presque un facteur 100 sur 4ml (arrêt Ficoll suite erreur de manip et difficultés mise en place pressenties pour laboratoire terrain) Phage-PCR Arrêt PCR extraction sur sang car pas assez sensible
Mars	Protocole Fèces femelles figé pour les prochains tests 2g -1.8ml de surnageant PCR extraction	Protocole sang figé pour les prochains tests 2 fois 2ml en parallèle - séparation Hetasep Phage-PCR	Test 2g et 5g - 10ml de surnageant (prise d'essai 10g difficile à traiter, risque d'inhibition PCR accru) PCR extraction Pour améliorer détectabilité sur fèces de veaux	Protocole sang figé pour les prochains tests 2 fois 2ml en parallèle - séparation Hetasep Phage-PCR

IV. : RESULTATS DE L'ETUDE

1. Résumé d'un questionnaire de situation des 3 élevages prélevés pour l'étude.

Tabl 1 : Conditions d'élevage des veaux pendant l'étude –typologie des élevages, race Holstein et montbéliarde

	Exploitation G. HD 4 associés polyvalents	Exploitation G. GF 2 associé -1 salarié / polyvalence	Exploitation G.GR 4 associés : 2 spécialistes de l'élevage
Nombre de femelles laitières de plus de 18 mois	182	134	103
Code race	66	66	66, 21, 46, 19
reproduction	Monte naturelle commencement de l'IA	IA = insémination artificielle	IA = insémination artificielle
Séroprévalences n-1 troupeau laitier	11.8% - 19/161	12% - 15/125	Non fait
Nombre de vaches PCR (temps réel) positives n-1	47% en PCR sur les séronégatives 67/142	11.11% de Culture fécale sur les séronégatives	18/106 – 16.9% 20/11/17
Nombre de vaches séropositives technique ELISA Idvet en sept 2017	12 positifs, 1 douteux, 140 négatifs 9.3%	4 positifs, 1 douteux, 99 négatifs 5%	Non fait
Nombre de vaches séropositives technique ELISA BIOSELLAL en sept 2017	13 positifs, 140 négatifs 9.3%	2 positifs, 102 négatifs 2%	6 positifs /100 négatives (20/11/17) 6%
Type de logement des VL	logettes	logettes	logettes
Nombre de naissance (veaux laitiers)	120	77	85
Période de naissance	Toute l'année avec un pic en juin juillet août	Toute l'année avec un pic en août	Toute l'année avec un pic en avril et en août
Nombre maximum de veaux laitiers nés sur 1 mois	22	13	14
Lieu de naissance <u>théorique</u>	Box de vêlage individuel paillé des négatives et des positives (absence de séparation stricte entre les box)	Box de vêlage individuel paillé des négatives et des positives en été et avec les vaches tarées en hiver	3 Box de vaches tarées (5)
	« Pas de Contamination » croisée possible en contact avec d'autre box d'adultes	Contamination croisée possible en contact avec d'autre box d'adultes	Pas de Contamination croisée possible en contact avec d'autre box d'adultes
Hygiène du box de vêlage	paillage abondant Pas de lavage ni de désinfection	paillage abondant Pas de lavage ni de désinfection	paillage abondant Pas de lavage ni de désinfection
Fréquence de nettoyage du box de vêlage	Vidé tous les 2 vêlages	Vidé tous les 15 jours où après mise bas	Vidé toutes les 6 semaines

		d'une positive connue	
Prise de colostrum combien et lequel (frais de la mère ou congelé..)?	Tété à la mère – le veau mâle reste avec sa mère 12h (le veau femelle est enlevée très vite après vêlage	Celui de la mère et pour les veaux issus de positives : colostrum congelé d'une négative	Celui de sa mère : 2.5l / pas de banque de colostrum
Condition de prélèvement du colostrum	Tété par le veau	traite à la machine	Trait au pot trayeur
Contact minimum entre mère et son veau à la naissance	1 journée	Si femelle aussitôt qu'il est vu 15 minutes (les mâles restent avec leur mère)	Enlevé le plus tôt possible moins de 6 h
Contact maximum entre mère et son veau à la naissance	2 journées	la nuit les veaux restent avec leur mère max 12h	12h maximum
Condition de propreté pour transférer un veau dans son logement	Pas de contact possible avec les bouses ou fumier ou litière d'adultes	contact possible avec les bouses ou fumier ou litière d'adultes	Pas de contact possible avec les bouses ou fumier ou litière d'adultes
Logement des veaux de 0-1semaine	Mâles à l'attache dans les logettes des VL	Mâles ou femelles : cases individuelles en nurserie	Cases individuelles
	Femelles à l'attache sans contact avec des adultes		Et/ou cases collectives
Type de lait la 1 ^{ère} semaine	3 jours au lait de la mère	2 repas au lait de sa mère	Colostrum de la mère pendant 3-4 jours
	Puis poudre de lait	Puis poudre de lait	Puis poudre de lait
Logement des veaux de 1-2 semaines	Mâles à l'attache dans les logettes des VL	Mâles ou femelles : cases individuelles en nurserie	Cases individuelles
	Femelles à l'attache sans contact avec des adultes		Cases individuelles ou collectives
Type de lait la 2 ^{ème} semaine	Poudre de lait	Poudre de lait	Poudre de lait
Logement des veaux de 3 semaines au sevrage	Mâles à l'attache dans les logettes des VL	Mâles ou femelles : cases collectives en nurserie	Cases individuelles / cases collectives
	Femelles à l'attache sans contact avec des adultes		Cases individuelles / cases collectives
Type de lait de la 3 ^{ème} semaine au sevrage et quantité	Poudre de lait	Poudre de lait	Poudre de lait à 2j
type de poudre de lait : avec lait écrémé, sans lait écrémé avec lactosérum ou lait végétal	Avec 50% de lait écrémé	Avec 50% de lait écrémé	Avec 50% de lait écrémé
les quantités de lait donné par repas			
la première semaine	2l-2.5l/ repas 2 repas par jour	1.5l / repas à 2 repas /j	2.5l de colostrum et 2 l max – 2 repas/j
la deuxième semaine	3l / repas 2 repas par jour	1.5l / repas à 2 repas /j	3 l max – 2 repas/j
la 3 ^{ème} semaine	3l / repas 2 repas par jour	2.5l/repas à 2 repas /j	3.5 l max – 2 repas/j
jusqu'au sevrage	3l / repas 2 repas par jour	2.5l/repas à 2 repas /j	3.5l/ repas – 1 repas /j de 1 mois au sevrage (2.5mois)

type de concentré donné	A partir de 3 sem	maïs grains entiers + granulés	Dès la mise la 2 ^{ème} semaine
fouillage donné	A partir de 15j - 3 s	A partir de 15 jours	Dès la mise en cases individuelles
eau donnée aux veaux à partir de quel âge	A partir de 1 mois eau concession	Eau de forage dès 15j	Dès la mise en cases individuelles
type d'eau : eau de concession, eau de forage ou puits ou source si autre que concession analyse d'eau oui non si oui qualité ?	eau concession	Eau de forage : analysée conforme / analyse demandée (oct17)	Eau de forage – traitée au peroxyde et filtre autonettoyant

2. Résultats sérologiques en dépistage initial T0 :

Tabl 2 : comparaison de 2 kits serologiques

tableau comparatif des résultats sérologiques pour 2 kits Idvet et Biosellal

	résultats	idvet			TT
		neg	dtx	pos	
biosellal	neg	339	2	5	346
	faible positif	2		0	2
	fortement positif	2		13	15
	TT	343	2	18	363

Dans l'élevage témoin attesté séronégatif depuis 2008.

- 2 animaux sortent positifs chez Idvet, 2 animaux testés 3 fois négatifs (même kit) et négatifs pour le kit Biosellal
- 2 animaux sortent faiblement positifs chez Biosellal animaux

Ces 4 animaux ont tous été testés en PCR sur bouse : PCR négatif (le 3/10/17).

⇒ Les 50 animaux positifs en PCR sur bouse (kit IDVET) détectés l'année précédente ainsi que 12 positifs en sérologie (kit IDVET), ont été analysés en sérologie sur les 2 Kits

Tableau 3 : test PCR sur bouse fait sur les animaux positifs n-1 en PCR sur bouse

KIT ELISA Biosellal			
	neg	dtx	pos
PCR positif ou CF n-1	47	0	3
sero positif n-1	1	0	11
KIT ELISA idvet			
	neg	dtx	pos
PCR positif ou CF n-1	47	1	2
sero positif n-1	1	0	11

- Résultats ininterprétables : 5
- Animaux dangereux : les mâles après 6 mois

a. Résultats globaux

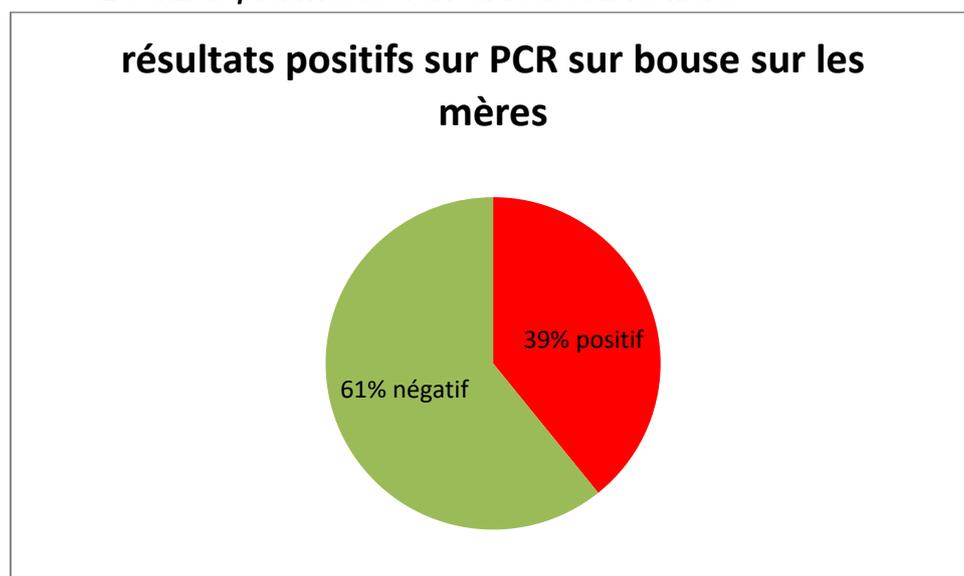
Prélèvements réalisés

Tabl 4: prélèvements réalisés par date

date	Ferme G.GR			GGF			GHD			totaux			cumul des analyses mères	cumul des analyses veaux
	mère positive avt mb	mère négative avt MB	veaux 1er pre	mère positive avt mb	mère négative avt MB	veaux 1er pre	mère positive avt mb	mère négative avt MB	veaux 1er pre	mère positive avt mb	mère négative avt MB	veaux 1er pre		
05/12/2017	3	5	0	1	2	0	2	6	1	6	13	1	bilan	1
16/01/2018	3	4	7	1	1	3	1	1	2	5	6	12	30	13
06/02/2018	0	0	4	0	0	1	1	1	4	1	1	9	13	22
06/03/2018	1	2	2	0	0	1	1	0	4	2	2	7	6	29
03/04/2018	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	30
03/05/2018	0	0	2	0	0	0	2	3	1	2	3	3	5	33
05/06/2018	3	5	0	0	0	0	2	3	6	5	8	6	18	39
03/07/2018	1	2	6	0	0	0	1	1	3	2	3	9	18	48
31/07/2018	0	2	4	0	0	0	1	2	1	1	4	5	10	53
04/09/2018	0	0	1	0	0	0	2	2	2	2	2	3	9	56
02/10/2018	0	0	1	0	0	0	2	1	2	2	1	3	7	59
06/11/2018	2	4	0	0	0	0	2	1	4	4	5	4	12	63
04/12/2018	1	6	6	0	0	0	3	3	6	4	9	12	22	75
08/01/2019	0	0	5	0	0	0	1	1	3	1	1	8	15	83
05/02/2019	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	83
05/03/2019	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	84
nbre d'animaux	14	30	39	2	3	5	21	25	40					
nbre de prélèvements	28	60		4	6		42	50						

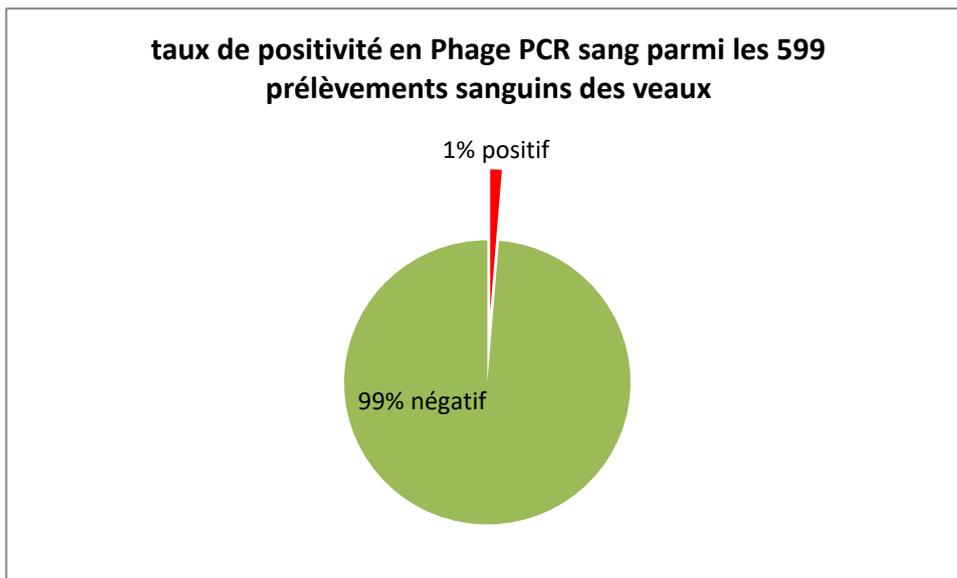
- 65 vaches négatives prévues, 49 vaches avec des veaux analysés /
- 4 analyses par vache soit 352 analyses (176 sur le sang et 176 sur les bouses -69 résultats positifs sur bouse).

C1 : taux de positivité des PCR sur bouse sur les mères

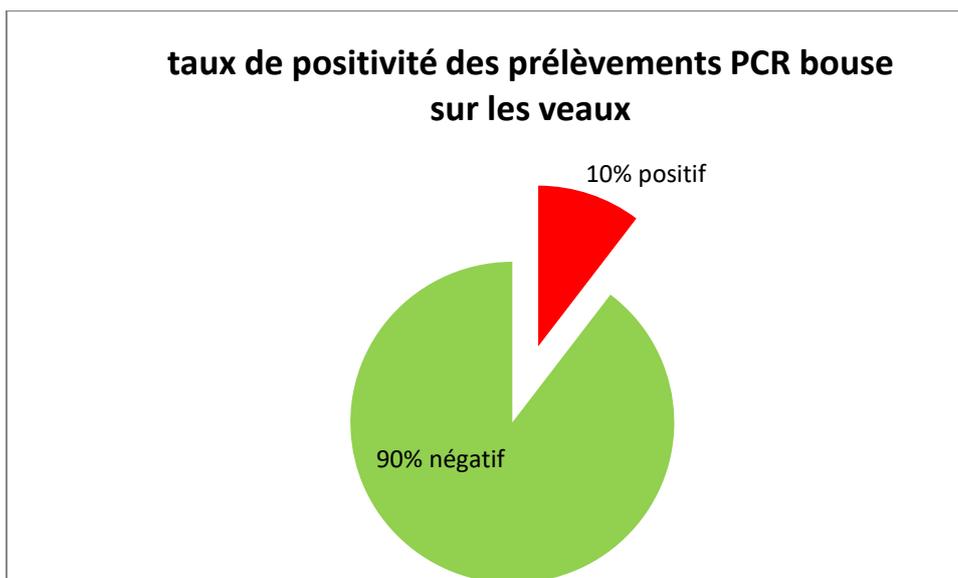


- 39 vaches positives initiales, 31 vaches positives avec résultats sur les veaux
- 85 veaux analysés
- 71 résultats positifs sur les veaux sur 1198 (599 sur le sang et 599 sur les bouses) analyses réalisées sur les veaux (5.9% de résultats positifs) – 14 prélèvements (sang et bouse) en moyenne par veau (2 prélèvements /veau/mois) de 1 à 16 mois.

C2 : taux de positivité des Phages PCR sur les veaux

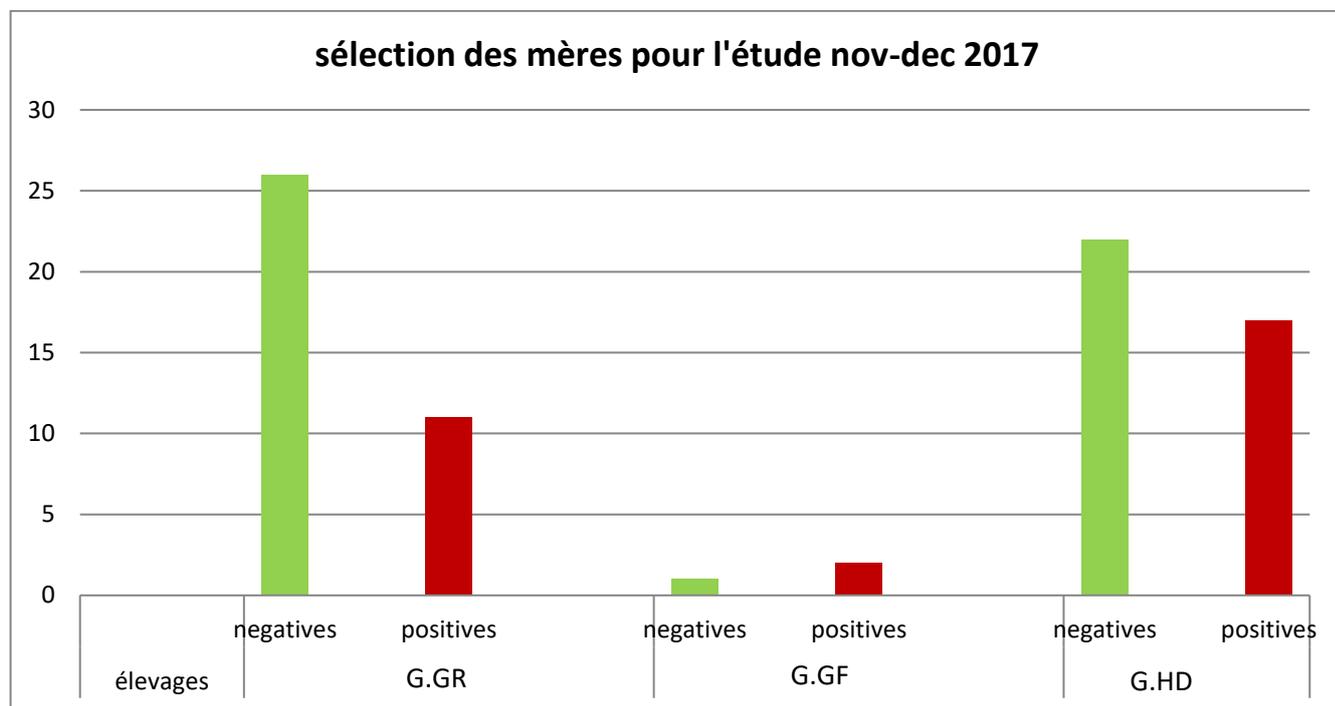


C3 : taux de positivité des PCR sur fèces des veaux 63/599



b. Sur les mères

Graph 1 statut des mères choisies pour l'étude par élevage



1. Sur le sang en Phage PCR

Parmi les 53 vaches négatives testées avant et après mise bas, aucun résultat n'est revenu positif

Parmi les 31 vaches positives testées avant et après mise bas, aucun résultat n'est ressorti positif.

2. Sur les bouses en PCR classique

Parmi les 53 vaches négatives connues, 51% ont maintenu leur statut et 16.3% ont changé de statut avant vêlage pour revenir négatives après vêlage.

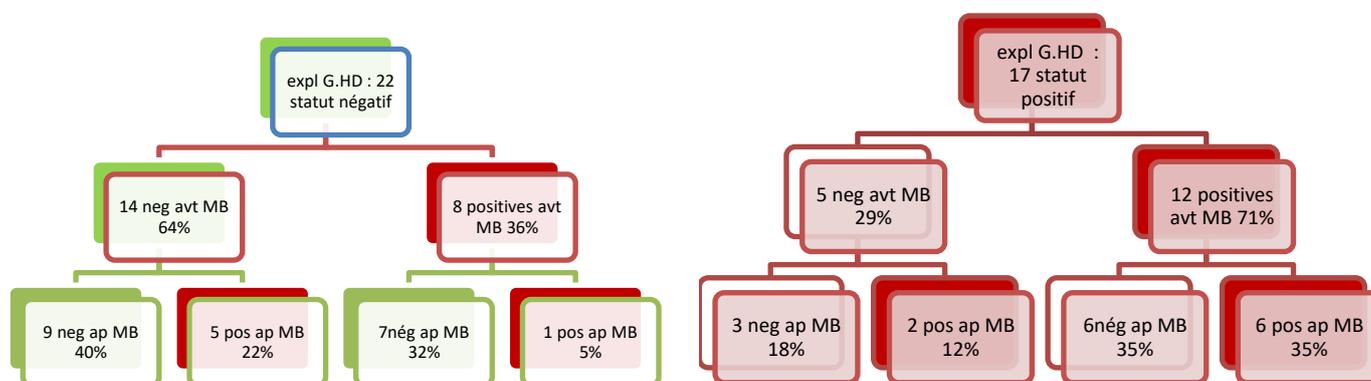
Parmi les 31 vaches positives connues, 82.7% ont maintenu leur statut

Organigramme 2 : évolution des « statuts » des 39 mères G.GR



Maintien du statut initial : Dans l'élevage G. GR 81% mères choisies sur leurs résultats négatifs avant l'étude, restent négatives durant l'étude contre 50 % de mères positives.

Organigramme 3 évolution des « statuts » des 39 mères G.HD



Maintien du statut initial : Dans l'élevage G.HD 40% mères choisies sur leurs résultats négatifs avant l'étude, restent négatives durant l'étude contre 35 % de mères positives.

Aucune mère testée sur le sang en PHAGE PCR n'est positive avant ou après vêlage y compris pour les 4 animaux qui ont déclenchés la paratuberculose clinique.

Les CT des mères « positives » varient de 28 à 39.79.

Les extrêmes :

- ⇒ La mère « positive » avec ct 28 avait des CT 29 avant MB et 27 après MB
- ⇒ La mère « positive » avec un ct de 39.79 avait des CT 32 avant MB et 33 après MB

Effectifs observés sous l'hypothèse nulle (entre parenthèses)

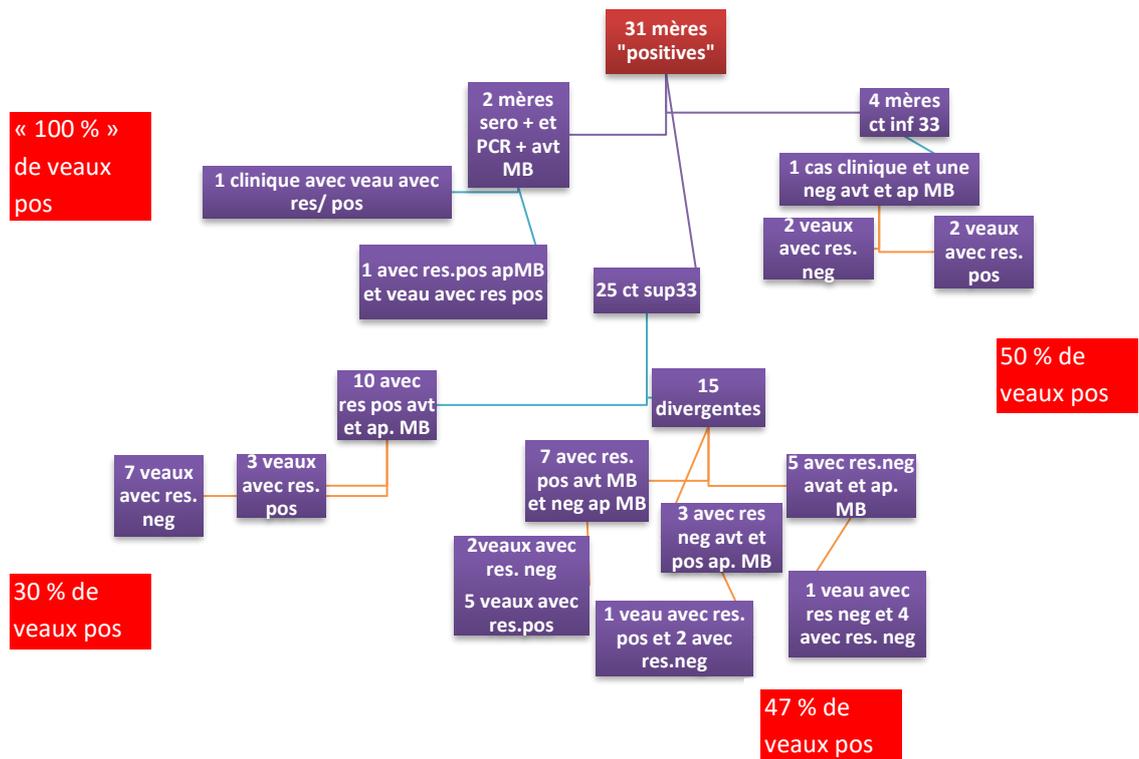
Vaches négatives	Restants négatives avant et après MB	Changeant de statut avant ou après MB	
Expl GGR	22 (17)	5 (10)	27
Expl GHD	9 (14)	13 (8)	22
total	31(63%)	18 (36%)	49

Calcul du X²

Vaches négatives	Restants négatives avt et après MB	Changeant de statut avt ou après MB	total
Expl GGR	1.47	2.5	3.97
Expl GHD	1.78	3.125	4.9
total	3.25	5.625	8.87

La ddl est de 1, la valeur total du Khi² est de 8.87 ce qui signifie que l'influence des changements de statuts des vaches négatives n'est pas due au hasard mais correspond bien à une nette différence significative des signes entre les élevages alors que les techniques analytiques sont les mêmes (le risque est de 0.5%).

Organigramme 4, décline les résultats des CT des mères « positives » avec leurs résultats avant et après vêlage et les résultats sur leurs veaux.



Recalcul des statuts des mères : Quelle influence de la positivité des mères avant MB quel que soit son statut initial ?

Parmi les 57 mères de statut négatif

- 28 mères négatives avant et après vêlage avec statut initial négatif = négatives
- 3 mères positives avant et après vêlage quel que soit le statut initial = positives
- 26 vaches ayant des résultats changeant avant et après vêlage (MB)
 - 10 mères avec résultats positifs avant mise bas = variante avant MB
 - 16 mères avec résultats positifs après mise bas variante après MB

Parmi les 35 mères de statut positif

- 5 mères négatives avant et après vêlage avec statut initial négatif = négatives

14 mères positives avant et après vêlage quel que soit le statut initial = positives

14 vaches ayant des résultats changeant avant et après vêlage (MB)

- 10 mères avec résultats positifs avant mise bas = variante avant MB
- 4 mères avec résultats positifs après mise bas variante après MB

• **Tabl 8: résultats des veaux en fonction des « statuts recalculés » des mères**

statut « réévalué » sur les mères

28mères statut négatives recalculées et neg avt et ap MB		TT	neg	pos	sexe des positifs	
					M	F
G.GF		2	2	0		
G.GR (3 morts)	21% de veaux pos	25	17	5	1	4
G.HD		1	0	1	1	0
2 statut pos mais neg avant et après MB = variante neg		TT	neg	pos	sexe des positifs	
					M	F
G.GF	« 100 % » de veaux pos	0	0	0	0	0
G.GR		0	0	0	0	0
G.HD		2	0	2	0	2
20 variantes pos avant vêlage		TT	neg	pos	sexe des positifs	
					M	F
G.GF	50 % de veaux pos	1	1	0	0	
G.GR (1 mort)		5	2	2	2	0
G.HD (2 morts)		14	4	8	6	2
19 variantes pos après vêlage		TT	neg	pos	sexe des positifs	
					M	F
G.GF	52 % de veaux pos	0	0			
G.GR		2	2			
G.HD		17	7	10	5	5
19 positives avant et après MB		TT	neg	pos	sexe des positifs	
					M	F
G.GF	42% de veaux pos	2	1	1	0	1
G.GR (2 morts)		10	7	1	1	0
G.HD		7	1	6	0	6

Exploitation G.HD : les vaches positives et négatives sont séparées par une barrière non pleine. Le box est vidé fréquemment mais les veaux restent avec leur mère (6-24h)

Exploitation G.GR les veaux sont enlevés à leur mère dès la naissance mais aucune précaution n'est prise pour l'instant pour séparer les mères positives et les négatives !

Comparaison des résultats des veaux des 2 exploitations quels soient les résultats des mères / Effectifs observés en gras et effectif théorique (hypothèse nulle)

veaux	atteints	négatifs	total
Expl. GGR	8 (17)	28 (19)	36
Espl. GHD	27 (18)	12 (21)	39
total	35	40	75

Valeur du X^2 est de $(8-17)^2/17+(28-19)^2/19+(27-18)^2/18+(12-21)^2/21 = 17.32$

KHI2 calculé

veaux	atteints	négatifs	total
Expl. GGR	4.76	4.26	9.02
Expl. GHD	4.5	3.8	8.3
total	9.26	8.06	17.32

La lecture dans cette table suppose connu le risque d'erreur (α), et le degré de liberté (ddl ou v). Ce ddl se calcule de la manière suivante : $ddl = (\text{Nb lignes} - 1) \times (\text{Nb colonnes} - 1)$, soit 1

X^2 est de 17.32 qualifie l'importance de l'écart existant entre les résultats obtenus sur les 2 élevages. Il y a 0.1 % de probabilité pour que l'écart soit due au seul hasard (fluctuations d'échantillons). Donc il existe une différence entre les résultats des 2 exploitations.

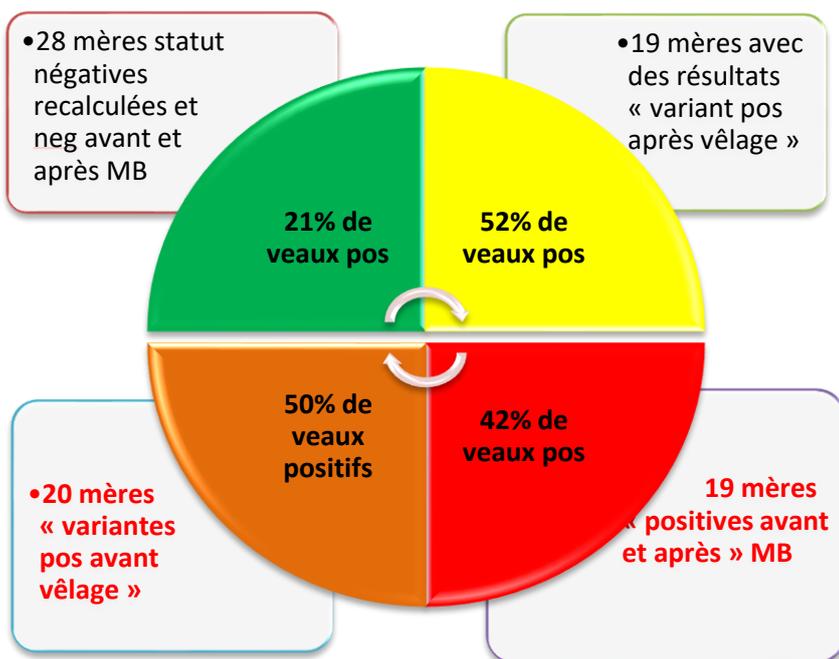
Comparaison des résultats des veaux des 2 exploitations issus de **Mères positives** / Effectifs observés en gras et effectif théorique (entre parenthèse hypothèse nulle) – calcul X^2

veaux	atteints	négatifs	total
Expl. GGR	3 (8) ----- ($X^2=3.12$)	11 (6) ----- ($X^2=4.17$)	14 ----- ($X^2=7.29$)
Expl. GHD	24 (19) ----- ($X^2=1.3$)	12 (17) ----- ($X^2=1.5$)	36 ----- ($X^2=2.8$)
total	27(54%) ----- ($X^2=4.42$)	23 ----- ($X^2=5.67$)	50 ----- ($X^2=10.09$)

X^2 est de 10.09 qualifie l'importance de l'écart existant entre les résultats obtenus sur les 2 élevages. Il y a 0.5 % de probabilité pour que l'écart des résultats positifs sur les veaux issus de mères positives entre les 2 exploitations soit due au seul hasard (fluctuations d'échantillons). Donc il existe une différence entre les résultats des 2 exploitations.

Un tableau Khi^2 a été utilisé (annexe)

Graph.x Statut recalculé des mères en fonction des résultats avant et après vêlage et le pourcentage de veaux positifs.



Tabl 9: taux de positivité des veaux par rapport au « statut recalculé des mères »

	% de positivité des veaux par statut recalculé des mères									
	TT	G. GR			G.GF			G.HD		
sexe		F	M	TT	F	M	TT	F	M	TT
mère négative (neg avt et après MB)	38%	33%	10%	19%			0%	67%	83%	64%
variante négative	33%	0%	0%	0%				67%	0%	40%
variante positive après MB	25%	0%	0%	0%				25%	0%	25%
mère positive (pos avt et après MB)	55%	33%	0%	25%	100%	0%	50%	80%	0%	57%
variante positive avant MB	71%	0%	67%	50%				50%	100%	67%
				22%			33%			53%

Comparaison des résultats des veaux suivants les statuts des mères (entre parenthèse hypothèse nulle).

	Mère négative	Mère + avt MB et/ou + après MB	Total
Veaux positifs	6 (11)... X^2 2.27	30(25) .. X^2 1	36 ... X^2 3.27
Veaux négatifs	19 (14).. X^2 1.78	24(29) ... X^2 0.86	43 ... X^2 2.64
total	25 .. X^2 4.05	21 ... X^2 1.86	79 ... X^2 5.91

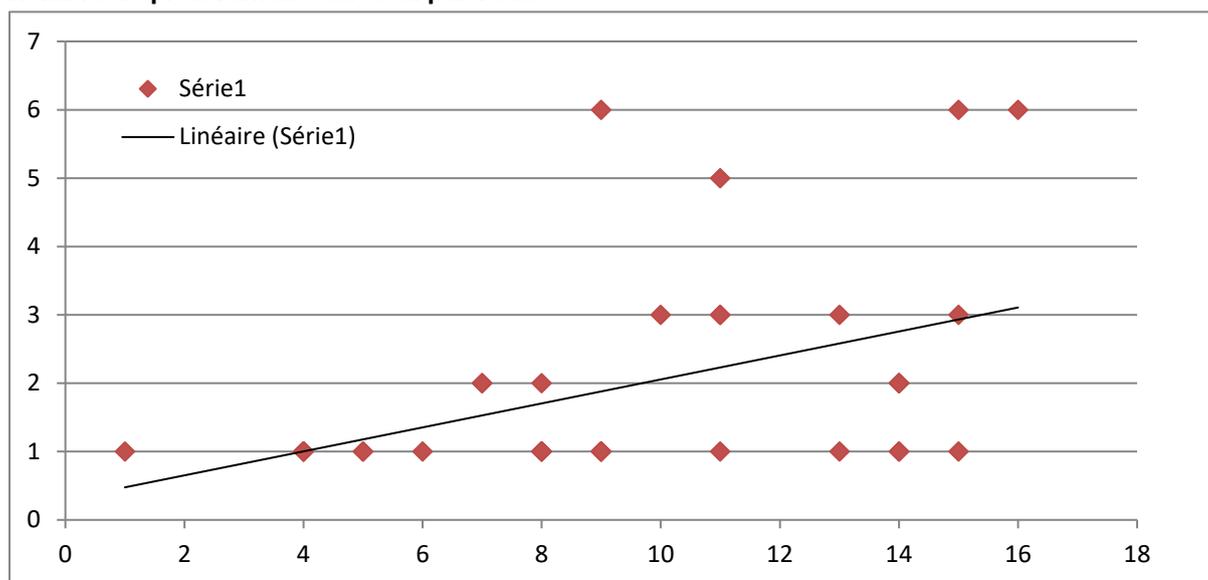
Le X^2 est de 5.91 la ddl est de 1 le risque d'écart acceptable doit être inférieur à 5% d'après la tableau. Les résultats ne sont pas du au hasard : il existe une différence significative entre les résultats des 2 populations de veaux. Différences notoires entre les différentes exploitations- des pratiques d'élevage différentes

c. Concernant les veaux

36 veaux détectés sur 84 – nombre de prélèvements **moyen par veau : 10** avec un écart allant de 1 et 16

- 12 veaux issus de mères positives – nombre de prélèvement **moyen 8**, entre 4 et 15 prélèvements
- 12 veaux issus de mères « statut » négatif avec excrétion avant ou après vêlage : ces veaux n'ont eu en **moyenne que 11 prélèvements** avec un écart de 4 et 16.
- 12 veaux issus de mères négatives- ayant eu **10 prélèvements en moyenne** entre 1 et 15 prélèvements.

Graph 2. Concernant les 36 veaux positifs, le nombre de prélèvement positif par veau en fonction de leur nombre de prélèvements au total par veau



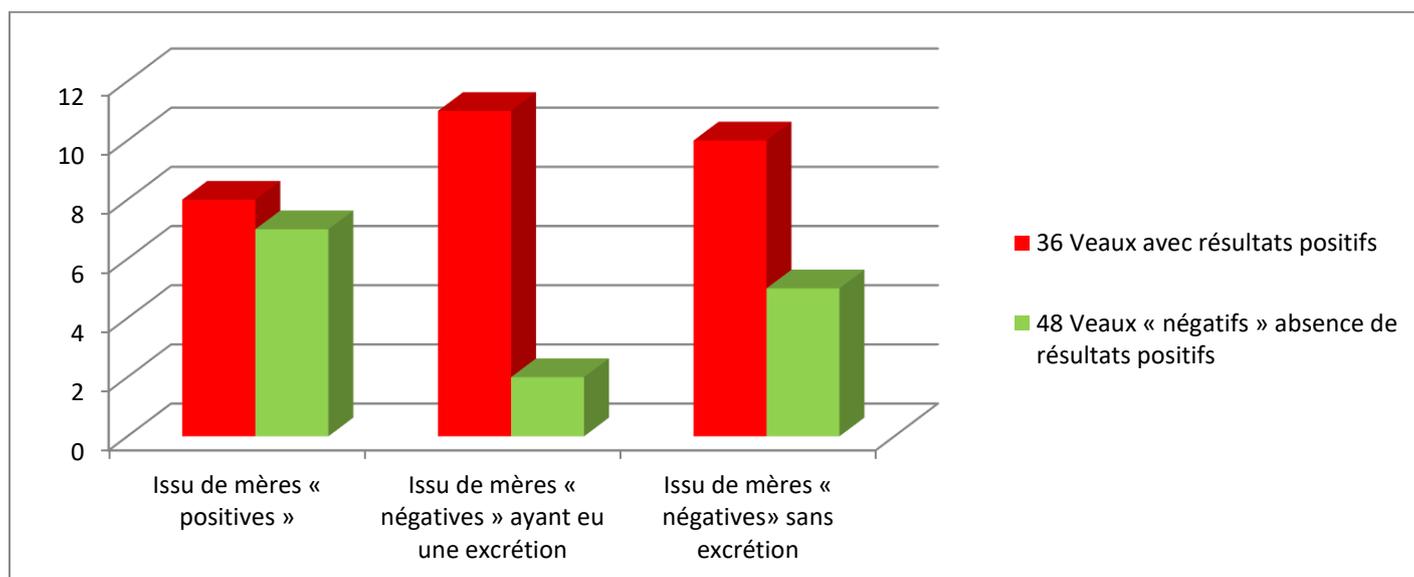
48 veaux non détectés sur 84 – les veaux ont eu en **moyenne 6 prélèvements** avec un écart allant de 1 et 15

- 16 veaux issus de mères positives – nombre de prélèvement **moyen 7**, entre 1 et 15 prélèvements
- 5 veaux issus de mères « statut » négatif avec excrétion avant ou après vêlage : ces veaux n'ont eu en **moyenne que 2 prélèvements** avec un écart de 1 et 4.
- 27 veaux issus de mères négatives- ayant eu **5 prélèvements en moyenne** entre 1 et 15 prélèvements.

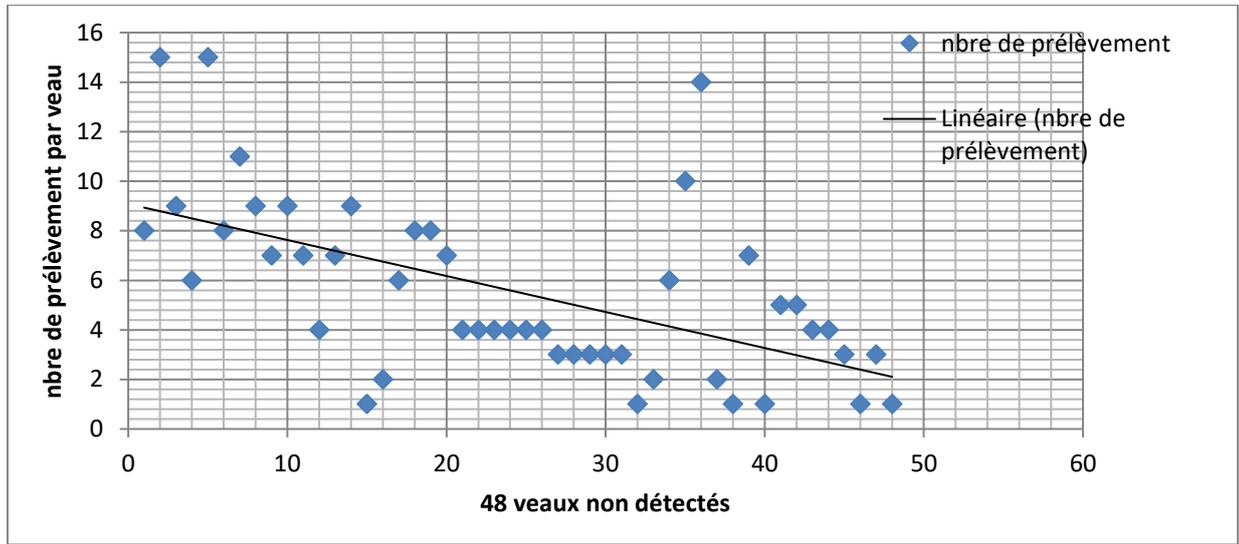
Tabl.y : nombre de prélèvements par veaux en fonction des « statuts » de leur mère.

mères	Veaux avec résultats positifs		Veaux « négatifs » absence de résultats positifs	
	nombre	Nombre moyen de prélèvement / veau	nombre	Nombre moyen de prélèvement / veau
Issu de mères « positives »	12	8	16	7
Issu de mères « négatives » ayant eu une excrétion sur bouse (avant et/ou après vêlage)	12	11	5	2
Issu de mères « négatives » sans excrétion	12	10	27	5
Totaux 84	36	10 (écart 1 et 16)	48	6 (écart 1 et 15)

Graph y : nombre de prélèvements moyen par veaux en fonction de leur résultats et du « statut de leur mère



Graph 3. Concernant les veaux non détectés



1) Sur le sang en Phage PCR : 8 résultats positifs sur 7 animaux (un veau positif à 2 reprises sur le sang)

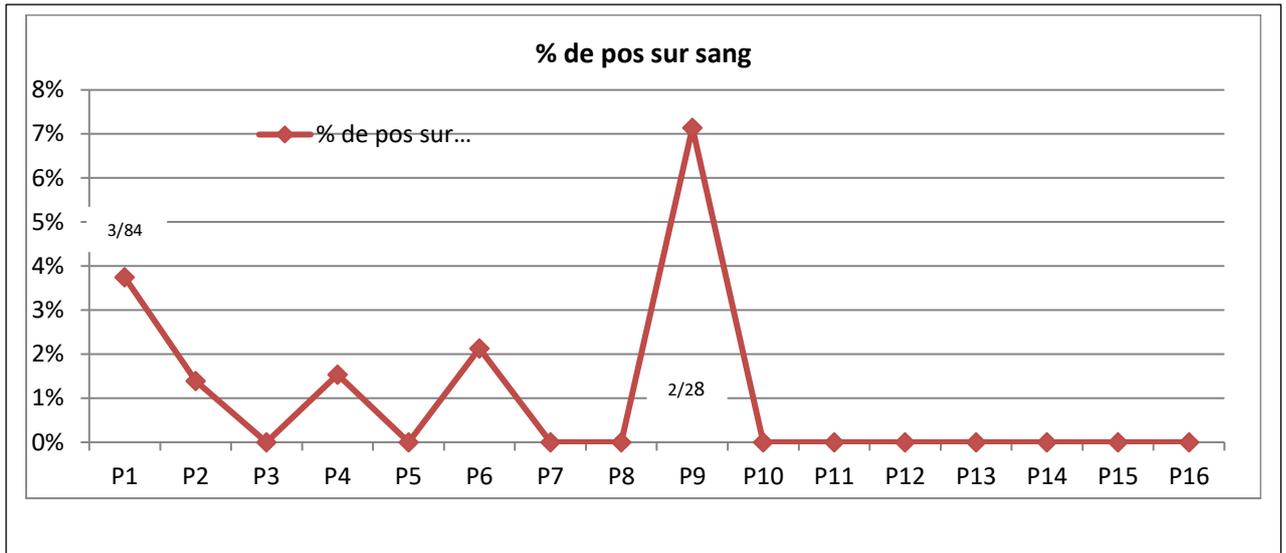
Tabl 5 : résultats PHAGE PCR sur les veaux par mois de vie des veaux

prélèvements	phage PCR			
	Nbre de prélèvement neg	Nbre de prélèvement pos	% de pos sur sang	inint
84				
P1 = 1 ^{er} mois de vie	81	3	3.6%	
P2 = 2 ^{ème} mois de vie	76	1	1.3%	
P3	74	0	0%	
P4	65	1	1.5%	1
P5	52	0	0%	1
P6	47	1	2%	1
P7	45	0	0%	0
P8	39	0	0%	0
P9	28	2	7%	0
P10	21	0	0%	0
P11	18	0	0%	0
P12	12	0	0%	0
P13	14	0	0%	0
P14	12	0	0%	0
P15	6	0	0%	0
P16	1	0	0%	0
totaux	591	8	1.34%	

Sensibilité du test Phage PCR : nombre de veaux positifs 7 / nombre de veaux positifs testés (7/7)

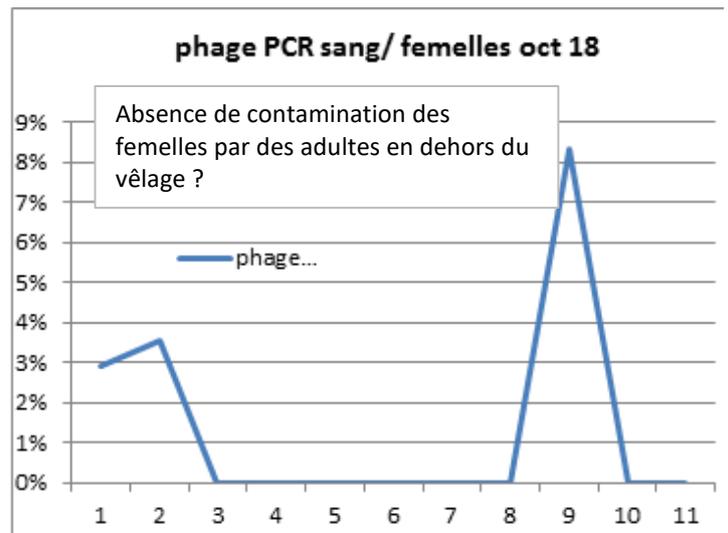
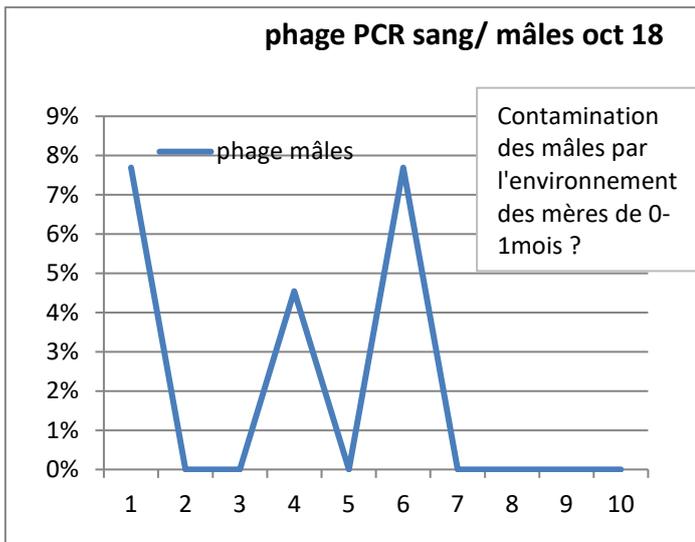
Spécificité du test Phage PCR sujet indemne avec test négatif : 48/48

Graph 4 : évolution des résultats sur le sang en Phage PCR

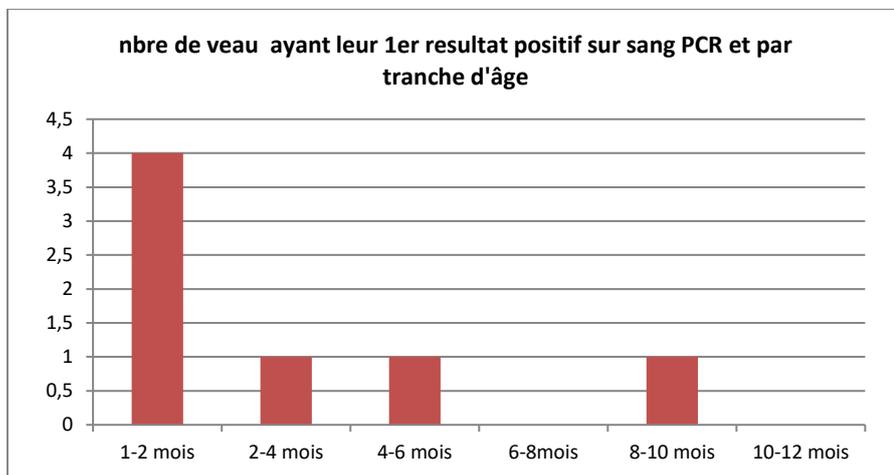


Perte de prélèvement sur sang et bouse sur les mâles de plus de 7 mois en raison de la dangerosité des prélèvements sur des animaux pas suffisamment contenus (taurillons)

Graph 5 et 6 : évolution des résultats positifs sur le sang en PCR phage par sexe



Graph 7 : bactériémie positive sur les veaux par tranche d'âge



2) Sur les bouses en PCR classique : 34 veaux positifs / 84

Tabl 6 : résultats d'excrétion détectée sur les veaux par mois de vie

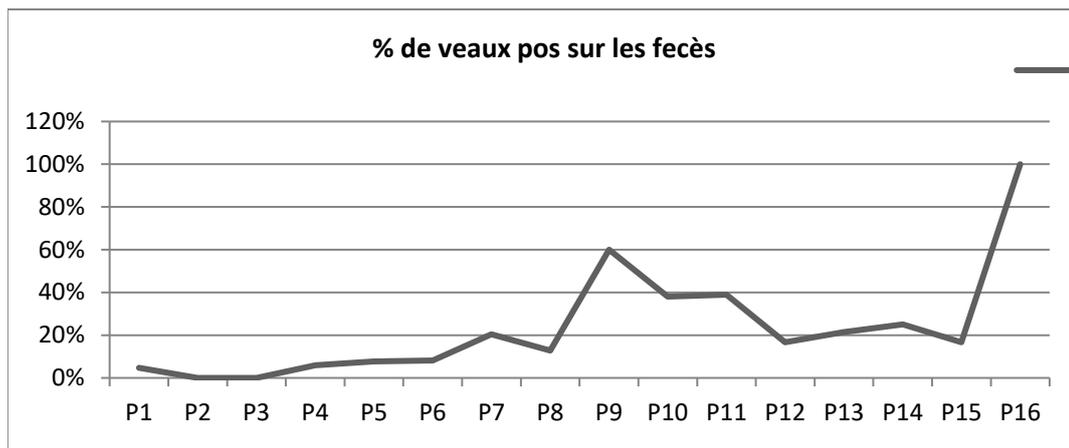
	PCR bouse			perte	13
	neg	pos	% de pos en bouse		
P1= 1 ^{er} mois de vie	80	4	5%	0	
P2= 2 ^{ème} mois de vie	74	3	3.9%	1	
P3	73	0	0%	1	absence de bouse
P4	63	4	6%	0	
P5	48	4	8%	1	absence de bouse
P6	45	4	8%	1	
P7	35	9	20%	1	absence de bouse
P8	34	5	13%	1	dangereux
P9	24	6	20%	2	dangereux
P10	13	8	38%	2	dangereux
P11	11	7	39%	2	dangereux
P12	10	2	17%	5	dangereux
P13	11	3	21%	0	
P14	9	3	25%	0	
P15	5	1	17%	0	
P16	0	1	100%	0	
	535	64	10.7%	17	

Le χ^2 70.07 avec un ddl de 15 pour un risque d'erreur inf à 5 % de cette comparaison de résultats par mois n'est pas le fruit du hasard, hypothèse nulle est rejetée. En conclusion il existe une différence significative au plan statistique entre ces différents mois de prélèvements représentatif de l'excrétion fécale des veaux.

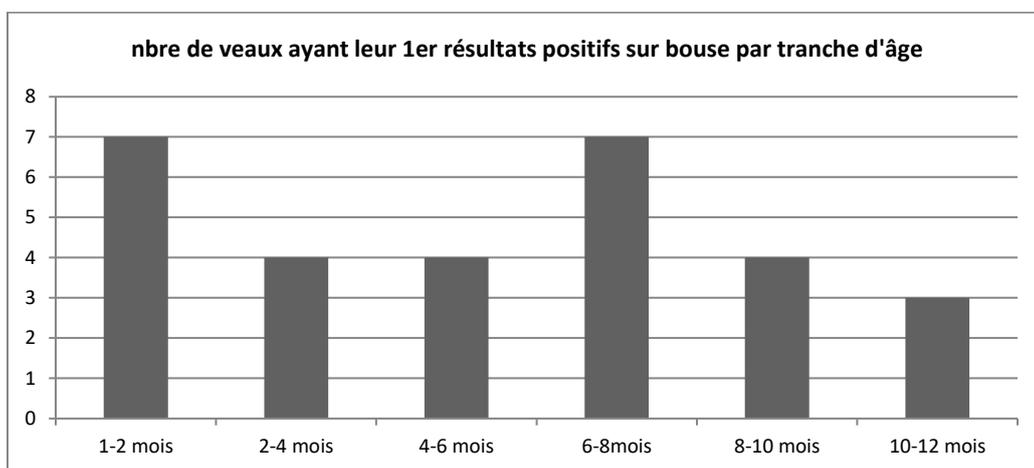
Sensibilité du test bouse PCR : nombre de veaux positifs / nombre de veaux testés soit ou nbre de test positifs sur le nombre de testés soit 64/535 11.9%

Spécificité du test bouse PCR sujet indemne avec test négatif : 48/48

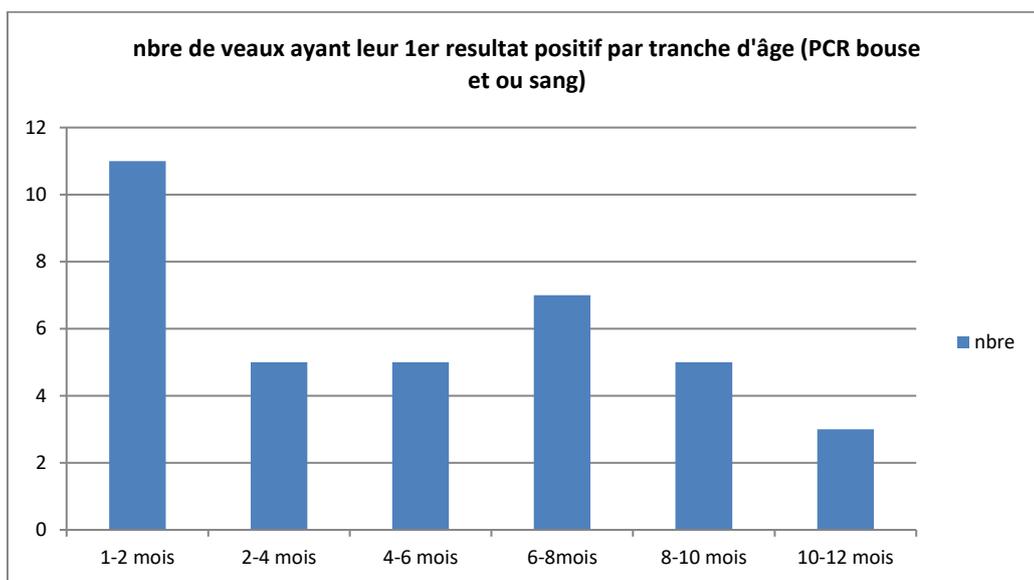
Graph 8 : évolution de l'excrétion par mois de vie des veaux



Graph 9 : nombre de veaux positifs par tranche d'âge avec la PCR sur fèces

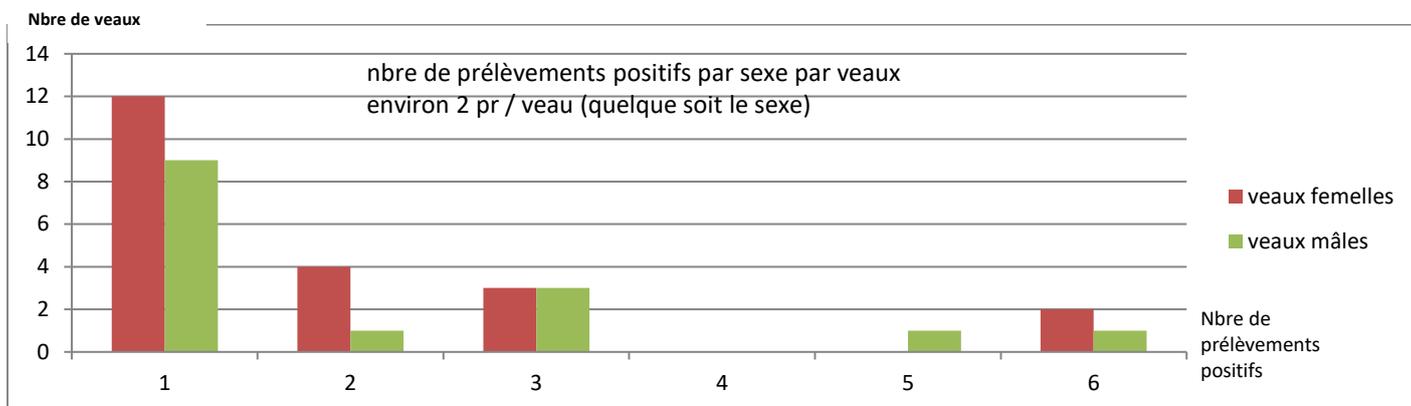


Graph 10 : nombre de veaux positifs par tranche d'âge qu'elle soit la technique

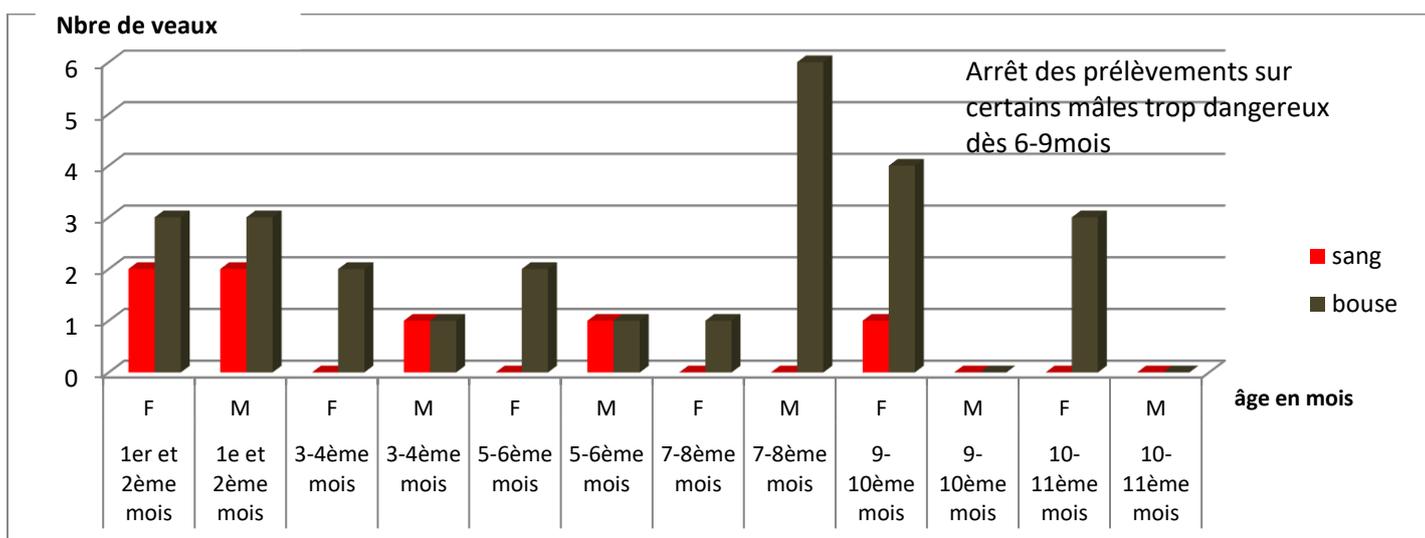


84 veaux, 48 femelles (44.6% de positives) et 36 mâles (41.6% de positifs)

Graph 11 : nombre de prélèvements positifs par sexe



Graph 12 : 36 veaux positifs par sexe et par 1^{ère} réaction positive



Absence ou peu de prélèvements sur les mâles partis en atelier d'engraissement à partir de 6-7 mois.

Tabl 7 : résultats positifs des veaux par matrice et par exploitation

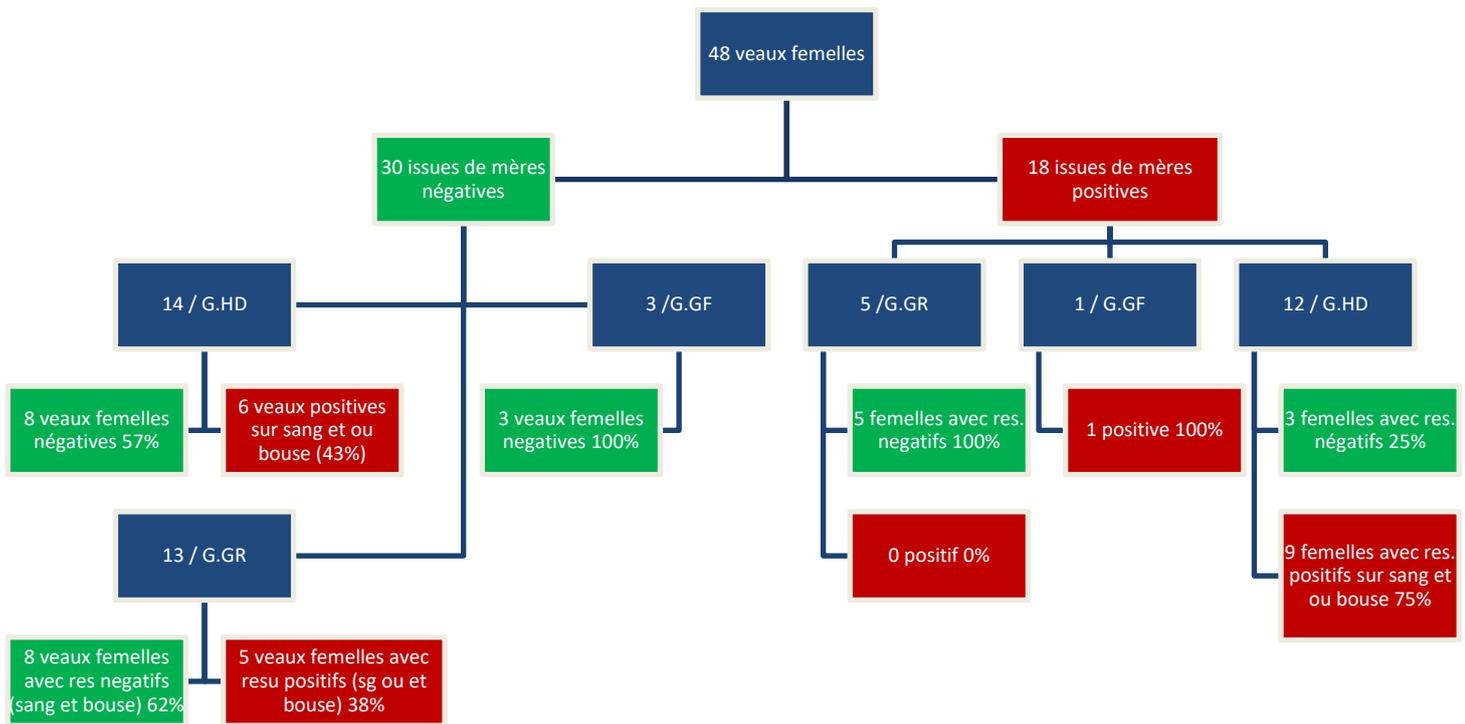
36 veaux avec résultats positifs sur 84 veaux

exploitations	phage PCR sur sang				PCR bouse			âge moyen en mois au 1er résultat
	nbre	mâle	femelle	âge moyen en mois au 1er résultat	nbre	mâle	femelle	
G. GR	1	1	0	3,2	7	5	2	7,5
G.HD	5	2	3	15,95	22	9 (4,51)	13(4,9)	4,8
G.GF	1	0	1	8,6	0	0	0	
totaux	7	3	4	13,1	29	5	2	5,8

1er résultat positif de 1^{er} j au 9ème mois

1er résultat positif de 10j au 11ème mois

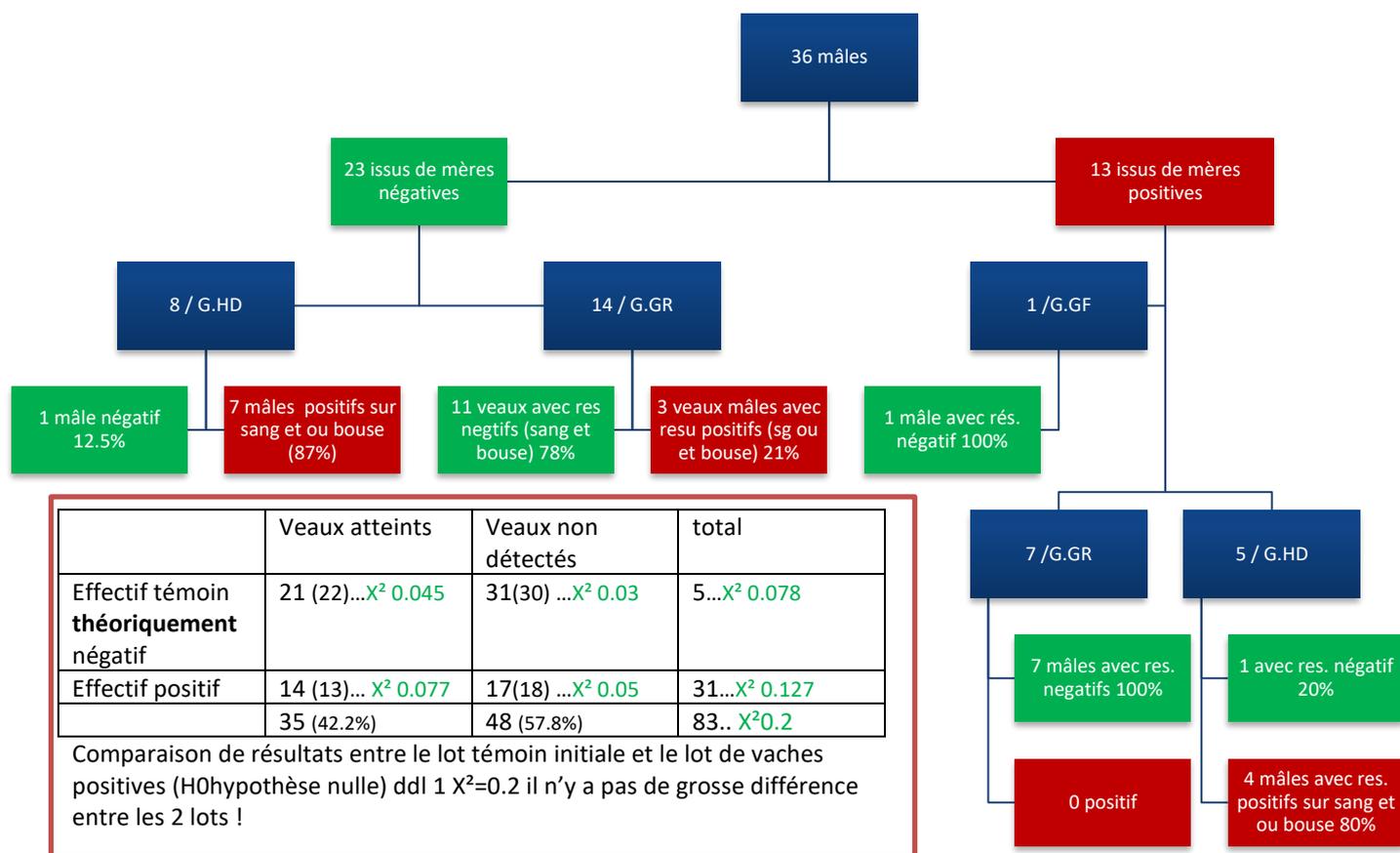
Organigramme 5 : veaux femelles par rapport au « statut » des mères et à leurs résultats connus à la fin de l'étude



Parmi les 18 veaux femelles issues de mères positives, 9 ont eu un ou plusieurs résultats positifs sur sang et ou bouse (50%)

Parmi les 30 veaux femelles issues de mères négatives, 11 ont eu un ou plusieurs résultats positifs (37 %).

Organigramme 6 veaux mâles par rapport au « statut » des mères et à leurs résultats connus à la fin de l'étude



13 veaux mâles issus de mères positives, 4 ont eu un ou plusieurs résultats positifs sur sang et ou bouse (30%)

23 veaux mâles issus de mères négatives, 13 n'ont eu aucun résultat positif (56%) et 10 mâles positifs (43%)

D'après le test X^2 concernant la comparaison du sexe des veaux et de leur résultats, le test X^2 est de 0.995 pour une ddl de 1 ce qui signifie que les sexes des veaux n'est pas un critère de différence mais le fruit du hasard.

Comparaison lot de mères négatives et le restant avec le lot de mères négatives ayant excrétée avant ou après vêlage et leurs résultats respectif sur leurs veaux.

	Mères négatives	Mères négatives ayant excrété avant ou après MB	total
Veaux positifs	6(10)... X^2 1.6	20(12) ... X^2 5.3	26... X^2 6.9
Veaux négatifs	19 (14)... X^2 1.78	16(20) ... X^2 0.8	35... X^2 2.58
	25 (41%)	36 (59%)	61.. X^2 9.48

(H0hypothèse nulle) ddl 1 $X^2=9.48$ Comparaison de résultats entre le lot de vaches toujours négatives et le lot des vaches initialement négatives mais ayant excrété avant ou après vêlage montre l'importance de l'écart entre les résultats obtenus sur les veaux issus de ces 2 catégories et donc que l'excrétion avant ou après vêlage fait la différence.

d. Résultats par exploitation

⇒ Résultats de l'Exploitation GF, avec les veaux ayant plus de 6 prélèvements

3. sur le sang

Veau	Statut excr. Mère	Mois 1	Mois 2	Mois 3	Mois 4	Mois 5	Mois 6	Mois 7	Mois 8	Mois 9	Mois 10	Mois 11	Mois 12	Mois 13	Mois 14	Mois 15
3179	> 10 ⁴ MAP/g	NEG	Ct 37.85	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG								
3172	< 10 ⁴ MAP/g	NEG	Mort													
3387	< 10 ⁴ MAP/g	NEG	Arrêt collecte													
3187	NEG	NEG	Mort													
3390	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Mort							

4. sur les fèces

Veau	Statut excr. Mère	Mois 1	Mois 2	Mois 3	Mois 4	Mois 5	Mois 6	Mois 7	Mois 8	Mois 9	Mois 10	Mois 11	Mois 12	Mois 13	Mois 14	Mois 15
3179	> 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG									
3172	< 10 ⁴ MAP/g	NEG	Mort													
3387	< 10 ⁴ MAP/g	NEG	Arrêt collecte													
3187	NEG	NEG	Mort													
3390	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Mort						

⇒ Résultats de l'Exploitation GR, avec les veaux ayant plus de 6 prélèvements

5. sur le sang

Veau	Mère	Mois 1	Mois 2	Mois 3	Mois 4	Mois 5	Mois 6	Mois 7	Mois 8	Mois 9	Mois 10	Mois 11	Mois 12	Mois 13	Mois 14	Mois 15	Mois 16
3248 F	ParaTB clinique	Ct 34.58 29 J	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG						
3212 F	> 10 ⁴ MAP/g	Ct 38.72 15 J	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
3228 F	> 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG				
3290 F	> 10 ⁴ MAP/g	NEG	Mort														
3215 M	< 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte					
3222 F	< 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG		
3224 F	< 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG		
3225 F	< 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG		
3233 M	< 10 ⁴ MAP/g	Ct 33.86 1 J	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte				
3241 M	< 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte							
3249 M	< 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte							
3246 M	< 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte							
3265 F	< 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	Mort													
3256 F	< 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG						
3253 F	< 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG							
3217 M	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte				
3223 M	NEG	Ct 31.66 14 J	Mort														
3230 F	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte	NEG		
3231 M	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ct 35.41	NEG	NEG	Ct 36.77	NEG	NEG	Arrêt collecte				
3238 M	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte						
3245 M	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte							
3244 M	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte								
3295 F	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG									
3296 F	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG									
3306 F	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG										

6. sur les fèces

Veau	Mère	Mois 1	Mois 2	Mois 3	Mois 4	Mois 5	Mois 6	Mois 7	Mois 8	Mois 9	Mois 10	Mois 11	Mois 12	Mois 13	Mois 14	Mois 15	Mois 16
3248 F	ParaTB clinique	Ct 34.58 29 J	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG						
3212 F	> 10 ⁴ MAP/g	Ct 38.72 15 J	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
3228 F	> 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG				
3290 F	> 10 ⁴ MAP/g	NEG	Mort														
3215 M	< 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte				
3222 F	< 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG		
3224 F	< 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG		
3225 F	< 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG		
3233 M	< 10 ⁴ MAP/g	Ct 33.86 1 J	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte				
3241 M	< 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte							
3249 M	< 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte							
3246 M	< 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte							
3265 F	< 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	Mort													
3256 F	< 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG						
3253 F	< 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG							
3217 M	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte				
3223 M	NEG	Ct 31.66 14 J	Mort														
3230 F	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte	NEG		
3231 M	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ct 35.41	NEG	NEG	Ct 36.77	NEG	NEG	Arrêt collecte			
3238 M	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte						
3245 M	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte							
3244 M	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte								
3295 F	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG									
3296 F	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG									
3306 F	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG										

⇒ Résultats de l'Exploitation HD, avec les veaux ayant plus de 6 prélèvements

7. sur le sang

Veau	Mère	Mois 1	Mois 2	Mois 3	Mois 4	Mois 5	Mois 6	Mois 7	Mois 8	Mois 9	Mois 10	Mois 11	Mois 12	Mois 13	Mois 14	Mois 15	
6047	> 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte						
6049	> 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Mort									
6064	> 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte				
6067	> 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte						
6147	> 10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	Non coll.		NEG	NEG	Arrêt collecte							
6231	<10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	Ct 36.82	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte						
6229	<10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte						
6232	<10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	
6048	<10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	
6050	<10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	
6136	<10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte						
6135	<10 ⁴ MAP/g	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte									
6230	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Non coll.	NEG	NEG	NEG	NEG	
6221	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte						
6046	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	
6220	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	
6052	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Non coll.	NEG	NEG	NEG	
6057	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte							
6065	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte							
6139	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte								
6125	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte								
6138	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Non coll.	NEG	NEG	Arrêt collecte						
6151	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte									
6144	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte							
6148	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte						
6150	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte							

8. sur fèces

Veau	Mère	Sang	Mois 1	Mois 2	Mois 3	Mois 4	Mois 5	Mois 6	Mois 7	Mois 8	Mois 9	Mois 10	Mois 11	Mois 12	Mois 13	Mois 14	Mois 15	
6047	> SPMAP12	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte						
6048	> SPMAP12	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Mort								
6049	> SPMAP12	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte				
6047	> SPMAP12	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte						
6347	> SPMAP12	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Non coll.	NEG	NEG	Arrêt collecte								
6211	< SPMAP12	POS 4 mois	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte							
6229	< SPMAP12	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ct 35.29	NEG	NEG	Arrêt collecte						
6232	< SPMAP12	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	
6048	< SPMAP12	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ct 37.26	Ct 39.06	NEG	NEG	NEG	NEG	
6050	< SPMAP12	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ct 36.86	NEG	Ct 33.85	NEG	NEG	NEG	
6130	< SPMAP12	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte						
6135	< SPMAP12	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte							
6230	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ct 36.66	NEG	NEG	Non coll.	Ct 31.46	Ct 31.69	NEG	NEG	
6221	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte							
6046	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	
6220	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ct 35.93	NEG	NEG	Ct 36.44	Ct 31.67	Ct 34.77	Ct 36.7	NEG	Ct 36.88	NEG
6052	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ct 35.24	Non coll.	NEG	NEG	NEG	
6057	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte						
6065	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte							
6139	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Non coll.	Arrêt collecte								
6125	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ct 33.49	NEG	NEG	Ct 36.77	Arrêt collecte								
6138	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Non coll.	NEG	NEG	Arrêt collecte					
6151	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte									
6144	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte							
6148	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte					
6150	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Arrêt collecte							

⇒ Cheptel HD – Bilan données brutes Veaux

- 39 veaux suivis au moins 2 mois (sauf décès)
 - ☒ 26 veaux issus de femelles excrétrices avant et/ou après vêlage
 - ☒ 13 veaux issus de femelles non excrétrices avant et après vêlage
- Valeur prédictive des Résultats Positifs sur le 1^{er} mois de collecte sur l'excrétion récurrente (au moins deux résultats positifs sur fèces)
 - 11 veaux trouvés Positifs le 1^{er} mois
 - 4 sur sang: 3 issus de mères excrétrices; 1 issu de mère non-excrétrice (mâle)
 - 7 sur fèces: 5 issus de mères excrétrices; 2 issus de mères non-excrétrices (1 mâle et 1 femelle)
 - 5 veaux excréteurs récurrents au bout de 5 mois minimum
 - 5 veaux suivis seulement 4 mois
 - 1 veau mort le 2^{ème} mois
 - Valeur prédictive des Résultats Négatifs sur le 1^{er} mois de collecte sur non-excrétion récurrente (au moins deux résultats positifs sur fèces)

VPP brute 50% mais 100% sur veaux suivis au moins 5 mois

- 28 veaux trouvés négatifs sur sang et fèces le 1^{er} mois
 - 4 veaux excréteurs récurrents dont 3 issus de femelles excrétrices
 - 1 veau mâle issu d'une mère non-excrétrice trouvé positif sur sang en Phage-PCR à 6 mois et à 9 mois

VPN brute 82%

⇒ Cheptel GR – Bilan données brutes Veaux

- 39 veaux suivis au moins 2 mois (sauf décès)
 - 15 veaux issus de femelles excrétrices avant et/ou après vêlage
 - 24 veaux issus de femelles non excrétrices avant et après vêlage
- Aucun veau trouvé positif sur fèces ou sang lors du premier mois de vie
- 1 seul veau trouvé Positif sur sang au 4^{ème} mois = problème d'acidose qui perturbe l'épithélium de l'IG et peut « réactiver » la voie entérocytaire

- Valeur prédictive des Résultats Négatifs sur le 1^{er} mois de collecte sur non-excrétion récurrente (au moins deux résultats positifs sur fèces)
 - 39 veaux trouvés négatifs sur sang et fèces le 1^{er} mois
 - 2 veaux excréteurs récurrents jumeaux d'une mère excrétrice
 - 3 veaux excréteurs récurrents issus de mères non-excrétrices

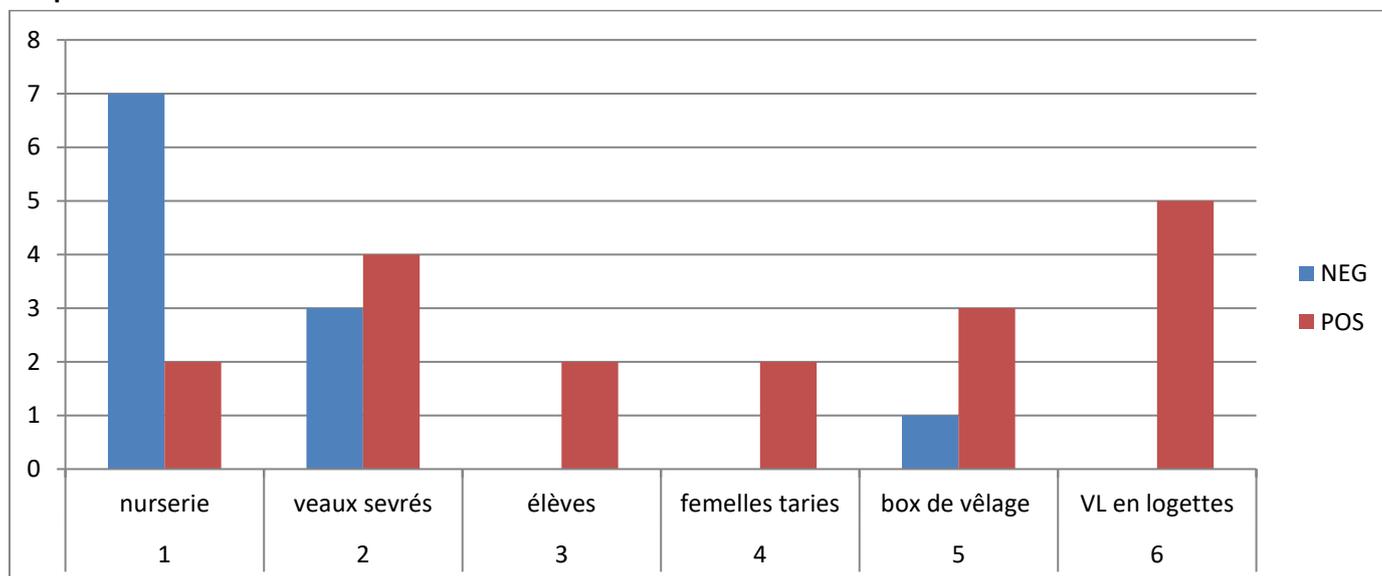
VPN brute 87,2%

Bilan des prélèvements d'environnement

Tabl 10 : résultats des prélèvements d'environnement par lieu de vie des animaux

	G.GF	G.GR	G.HD
Vaches laitières	Non fait	Positif (3+/3)	Positif (3+/3)
Vaches tarées	Positif	Positif	Positif
Box de vêlage	Positif	Négatif	Positif (2+/2)
nurserie	Négatif (0/1)	Faible positif (1+/3)	Faible positif 1+/6
Veaux sevrés élèves	Négatif (nurserie)	Négatif 0/3	Positif (4+/4)
élèves	Non fait	Positif (+6mois)	Positif (+8mois)

Graph 13. Résultats des Prélèvements d'environnement



V. Discussion

La complexité de l'étude était de connaître les différentes dates de mise bas des vaches négatives et positives remplissant les conditions d'intégration. L'objectif étant d'avoir, en principe, à chaque mois de prélèvements, le double de mères connues négatives que de positives.

Par contre, il n'y a eu aucun souci de conditionnement et acheminement des prélèvements pour la réalisation et les exigences analytiques.

1. Résultats TO

Habitué à travailler avec un seul Kit sérologique dans le cadre des plans paratuberculose, la comparaison de 2 kits nous a montré qu'il y avait quelques divergences entre les kits sérologiques.

D'ailleurs, dans l'élevage témoin « attesté négatif », 4 animaux ont été trouvés positifs dont 2 animaux différents (négatifs à un kit et positifs à l'autre) dans les 2 kits et tous négatifs en PCR sur bouse. S'agit-il d'animaux contaminés ou de faux résultats séropositifs en Map ? Ces divergences ont déjà fait l'objet d'une étude et ont été mises en évidence par le Dr ROY du GDS Corrèze.

Ce comparatif entre les 2 kits nous a permis de faire un test initial de séroprévalence avec le kit BIOSELLAL (qui n'était pas le kit initialement utilisé en pratique dans les élevages en plan) dans les 3 exploitations choisies pour l'étude. Ensuite, nous avons travaillé principalement avec la PCR classique (Kit Biosellal) sur bouse pour permettre d'identifier les animaux excréteurs, contaminant de l'environnement et ainsi choisir les mères « négatives » ou « positives » pour l'étude.

2. Situation des élevages :

Nous avons choisi des troupeaux laitiers, non pas pour le taux d'infection, mais pour une question de facilité concernant la prise d'échantillons.

Nous avons fixé notre choix initialement sur 3 exploitations fortement infectées et ayant environ de 80-100 VL. Cependant, il s'est avéré que dans l'exploitation la G.GF, il n'y avait pas beaucoup de mères positives (réformes des positives) dans le troupeau laitier qui pourraient rentrer dans les critères de l'étude (5 mères). Nous l'avons conservé au départ mais à la fin de l'étude, il ne restait plus qu'un animal (en raison de mortalité sur les veaux) à contrôler. C'est pourquoi, nous nous sommes concentrés sur la comparaison des 2 autres où il y a 39 et 40 vaches concernées.

Les naissances très étalées ont impacté la mise en action de l'étude dans l'obtention des couples mères veaux ainsi que la disparité du nombre de prélèvements par veaux.

Les éleveurs avaient connaissance du « statut des mères choisies pour l'étude » pendant l'étude. Ils devaient continuer à gérer leur élevage vis-à-vis de la paratuberculose, surtout en termes de limitation de la contamination des veaux (point essentiel pour la gestion de la paratuberculose pour le GDS88). Les éleveurs ont choisi, à leur façon, de gérer les vêlages suivant leurs idées, en prenant en compte, avec plus ou moins de rigueur, la contamination des veaux par leurs mères excrétrices.

Par exemple,

- Dans une exploitation G.GR, les veaux femelles ou mâles étaient séparés des mères dès que possible après leur naissance, et les naissances avaient lieu dans un seul box de vêlage (collectif). Pendant l'étude, les techniques d'élevage ont naturellement évolué avec l'arrivée d'un jeune associé, surtout en termes de logement des veaux. La conduite des mâles et des femelles avant 6 mois était identique.
- Dans l'autre élevage G.HD, l'éleveur avait une gestion des mères (positives ou négatives) et du sexe des veaux en fonction des résultats antérieurs connus : les femelles issues de mères négatives étaient séparées assez rapidement (moins de 10h) de leurs mères, alors que les mâles ou les femelles issues de mères positives étaient laissés beaucoup plus longtemps (plus de 12h) avec leur mère; d'ailleurs les mâles étaient placés dans les logettes des vaches (risque environnemental fort).

Les taux de séroprévalence dans les élevages étaient initialement différents : de 6% (G.GR) et 12 % (G.HD). Les taux de positivité en PCR sur bouse sur les femelles séronégatives étaient respectivement de 17%(G.GR) et 46 % (G.HD). Ces différences en termes de prévalence initiale entre les 2 exploitations ainsi que les pratiques et les choix des éleveurs ont certainement eu une très nette influence sur les résultats obtenus sur les veaux. (Voir organigramme)

Concernant les élevages, durant l'étude, avec les vétérinaires de l'exploitation, nous avons pu observer des périodes où les animaux étaient plus ou moins en bonne santé (iatrogénèse) :

- des vaches avec des bouses « normales »
- des vaches en transition alimentaire avec des rations acidogènes, laxatives où les bouses étaient variables (de normale à très liquide)
- des veaux en bonne santé
- des veaux en acidose dans la nurserie,
- des veaux prélevés en entérites, malades (certains sont morts).

Tabl 11. Taux de mortalité dans les exploitations sur la période de l'étude nov. 17 à mars 19

	G.GR	G.HD	G.GF
Taux de mortalité 0-6 mois	17.09%	17.52%	33.18%
Taux de mortalité sur les animaux de plus de 24 mois	7.80%	10.95%	6.64%

Sur les conseils du GDS et à la demande des éleveurs du G.GR, des pratiques ont été modifiées afin de limiter les pathologies néonatales (gestion du logement, de l'alimentation lactée et post sevrage et prise colostrale) au cours de l'étude.

Pourrait-il y avoir un lien entre pression de contamination environnementale et sensibilité ou perméabilité intestinale des veaux détectés positifs ? L'analyse d'évènements survenus, à postériori, à l'individu est complexe en raison du manque d'enregistrement des informations sanitaires dans les élevages.

Dans les élevages en plan paratuberculose, nous avons pu observer que la gestion alimentaire des adultes a une influence dans l'expression clinique des animaux. La gestion de l'alimentation des veaux (hygiène de l'allaitement, quantité de lait, fréquence des entérites, concentré acidogène) a-t' elle aussi une influence sur la sensibilité des veaux à être contaminés en paratuberculose : influençant leur résistance ou au contraire leur résilience à Map ? Le Pr R. GUATTEO (EVN) a fait référence à cette sensibilité lors du colloque des 3 R à Paris le 6 dec.2018.

3. Résultats des mères :

Initialement, nous avons choisi les mères « négatives » suite au cumul de 2 techniques : sérologique et PCR sur bouse. Théoriquement, les mères positives et négatives étaient choisies en fonction de leurs dates voisines de vêlage ce qui n'a pas toujours été évident dans un élevage (G.HD) en raison de pratique de monte naturelle.

Les mères positives devaient absolument être excrétrices (PCR sur bouse détectée) quel que soit le résultat sérologique et quel que soit leur CT.

Actuellement, rien ne permet de différencier un animal excréteur « passif » d'un animal contaminé et excréteur. Le niveau d'excrétion (CT) ne semble pas être un critère permettant de différencier les contaminations au regard des résultats de l'organigramme 4 (*décline les résultats des CT des mères « positives » avec leurs résultats avant et après vêlage et les résultats sur leurs veaux*).

Des recherches en cours tendraient à dire qu'un animal excréteur de plus de 10^4 bactéries, serait plus à risque de déclencher la clinique (« vrai contaminé ») et les animaux faibles excréteurs, dont l'excrétion serait inférieure à 10^4 bactéries seraient des excréteurs « passifs » à surveiller. Le seuil de 10^4 bactéries permettrait de « trier » les animaux (à risque) malades, des excréteurs passifs.

Les vaches tarées positives comme négatives étaient conduites de la même façon et aux mêmes endroits. Elles étaient mélangées le mois avant vêlage.

D'après l'étude réalisée, près de la moitié des mères de statut initialement négatives ont eu des résultats positifs en PCR sur bouse avant ou après MB.

N'y aurait-il pas une contamination des mères avant MB :

1. un risque de contamination passive, lié à la pression de l'environnement
2. des faux résultats négatifs sur les mères de « statut initial négatif».

Par contre, l'excrétion des mères avant mis bas, quelle que soit leur raison, aurait un impact sur la contamination de l'environnement des veaux nouveau-nés.

En effet, 46% des veaux issus de mères ayant eu 1 résultat positif le mois avant vêlage, ont eu des résultats positifs.

Le facteur excrétion semble le plus important dans la contamination de l'environnement et des jeunes.

Concernant les vêlages, en théorie il devait y avoir un box de vêlage négatif pour l'exploitation G.HD. Mais en pratique, les vêlages se faisaient dans l'un ou l'autre des 2 box de vêlage en fonction des situations et des intervenants (3 associés).

Concernant les mises bas pour l'élevage G GR avec 4 associés, seulement 2 personnes fortement concernées par la paratuberculose géraient les naissances. Une attention particulière a été apportée aux veaux issus de mères positives « statut initial » qui ont été séparés très rapidement de leur mère.

Mères « à risque » = excrétrices avant vêlage

Mères moins à risque = non détectées excrétrices avant vêlage – sans compter le risque de contamination intra-fœtale qui est communément considéré à 30%

Tabl.12 classification des mères liées à leur excrétion en fonction des risques de contamination des veaux.

	mères "à risque"			mères "moins à risque"		
	nbre	veaux détectés positifs		nbre	veaux détectés positifs	
Exploitation G.HD (9.3% séroprévalence et 47% d'excrétion)	33	22 (66.66%)	11	5	3 (60%)	2
Exploitation G.GR (6% séroprévalence et 16.9 % d'excrétion);	12	3 (25%)	9	26	5 (19%)	21

Comparaison des résultats obtenus du risque d'avoir des veaux positifs issus de mères à risque ou moins à risque (entre parenthèses hypothèse nulle) et en vert test χ^2

	Veaux positifs	Veaux négatifs (non détectés)	Total
Mères à risque	25 (20)----- $\chi^2=1.25$	20 (25)----- $\chi^2=1$	45 $\chi^2 2.25$
Mères à moindre risque (neg)	8 (14) ----- $\chi^2=2.57$	23 (17)----- $\chi^2=2.12$	31----- $\chi^2 4.69$
total	33 (45.2%) $\chi^2 3.82$	43----- $\chi^2 3.12$	76..... $\chi^2 6.94$

$\chi^2 = 6.94$ – l'écart est significatif au plan statistique avec un risque de 0.2% entre les mères à risque et à moindre risque

Avant ces résultats, on aurait pu envisager une différence de risque lié à l'excrétion des mères, mais les résultats non montrent plutôt une différence nette des taux de positivité des veaux, impactés par l'origine des exploitations et pas forcément en lien avec le « statut » des mères. Ce qui nous porterait à penser que la conduite de l'élevage et la pression de l'environnement semblent certainement plus impacter sur la positivité des veaux.

Pour l'instant, la vaccination contre la paratuberculose n'a pas été envisagée mais elle a été évoquée dans l'exploitation G.HD.

4. Prélèvements d'environnement :

Si on compare le graphique de l'âge des veaux positifs (Graph 9 : nombre de veaux positifs par tranche d'âge avec la PCR sur fèces) et les résultats de Map concernant logement des animaux (Graph 13. Résultats des Prélèvements d'environnement), on se rend compte d'une similitude de détection de l'expression. Mais qu'elle est l'origine de cette pression environnementale. Est-ce l'excrétion des animaux (ou les éleveurs) qui impacte sur la contamination de l'environnement ou est-ce cette pression de l'environnement qui impacte sur l'excrétion des animaux ??



La contamination dans l'environnement est présente sur tous les lots des femelles de l'élevage en particulier les adultes et les élèves et faiblement sur les veaux. On observe à priori la même présence de MAP dans l'environnement que sur les animaux : une excrétion sur les veaux le 1^{er} mois, puis moins d'excrétion jusqu'au 6 mois. A partir de 6 mois d'âge et suivant les risques de contamination ou pas par les adultes, l'excrétion est présente.

5. ACTIPHAGE PCR sur le sang :

L'essai de mettre en place d'une PHAGE PCR sur fèces n'a pas abouti pour des raisons de problème technique et d'inhibition. Elle aurait peut-être marqué une différence entre l'excrétion à risque (bactéries vivantes) et celle sans risque avec un rejet de bactéries mortes.

Sur les mères

Les prélèvements sanguins (PHAGE PCR) n'ont pas permis de mettre en évidence la bactérie vivante dans le sang des mères négatives comme positives y compris sur les 4 animaux ayant déclenché la clinique après vêlage.

Pourrait-on envisager que la bactérie ne circule pas dans le sang des adultes ? Absence de bactériémie vraie ? si tel est le cas, qu'en est-il de la contamination fœtale en l'absence de bactériémie ? Est-ce que la technique PHAGE PCR permet de détecter la bactérie circulant dans le sang sur les adultes ? Y aurait-il une raison biologique ou en lien avec le bacille concernant la bactériémie et la circulation ou pas sur les animaux ?

Sur les veaux.

1.3 % des résultats sont positifs sur le sang avec la méthode ACTIPHAGE PCR sur les veaux parmi les 599 analyses réalisées. Ce taux est faible comparé au taux de positivité sur les veaux en PCR classique sur fèces qui est de 10.7% (64/599). Ces 2 techniques ne recherchent pas les mêmes informations.

La technique PHAGE PCR, permet de détecter la Map vivante dans le sang, à la différence de la PCR classique sur fèces qui ne fait que de détecter la présence d'ADN, bacille mort ou vivant indifféremment.

Cette technique ACTIPHAGE PCR a permis de mettre en évidence une bactériémie très précoce sur les veaux puisque le plus jeune des veaux positifs avait 1 jour. 8.3% de veaux de l'étude était positif sur le sang (19% de veaux positifs).

La moitié (4/7) de ces animaux positifs sur le sang, est détectée avant 30 jours (âge du veau) : ce qui confirmerait une bactériémie précoce et certainement une contamination active précoce.

Pour tous les animaux détectés positifs sur le sang, c'est le sang (avec ACTIPHAGE PCR) qui est le 1^{er} révélateur de la contamination en Map de l'animal. Quel que soit l'âge de la détection sur le sang (de 1 à 9 mois), aucun résultat n'est positif sur fèces avant la Phage sur sang.

4 veaux positifs en sang le sont aussi en PCR sur bouse, plus tardivement (4-5-7-10 mois après) et confirmerait donc le fait qu'ils aient été contaminés et n'arrivent pas à résister au Map. Ces 4 animaux pourraient être des animaux à haut risque de cas clinique.

Dans le cas de la M. Tuberculosis, une bactériémie, identifiable lors du « passage par les voies lymphatiques vers les ganglions », est observée lors de la primo-infection. Cela pourrait être similaire dans cette étude avec la mise en évidence très précoce de la bactériémie grâce la technique Phage PCR.

La bactériémie physiologique (transitoire asymptomatique) détectée sur les 7 veaux avec la Phage PCR ne serait-il pas le résultat d'une **iatrogénèse** (l'ensemble des conséquences néfastes sur l'état de santé individuel) comme c'est le cas pour d'autres mycobactéries. Cela pourrait être le cas des animaux positifs sur le sang au-delà du premier mois de vie (4, 6 et 9 mois). Ce qui prouverait une contamination de veaux à veaux en l'absence d'adulte et de matières fécales issues d'adultes (voir tabl 13). C'est le cas pour 2 veaux (3179 et 6231).

Les résultats positifs sur le sang pour les 7 animaux ont été systématiquement plus précoces que la détection d'une excrétion fécale.

De plus, nous pouvons penser, bien que nous n'ayons pas suffisamment de recul sur ces animaux positifs, que ces animaux sont à risque vis-à-vis de la paratuberculose et peut être ceux-ci risquent-ils plus de déclencher la clinique.

Est-ce que l'analyse génomique de ces 7 animaux nous montre une sensibilité physiologique à la paratuberculose ? Ce taux de 8% est le double des cas cliniques observés en élevage !

4 veaux sur 7 ont eu des résultats positifs entre 1 à 28 jours ! Dont 3 veaux issus de mères ayant eu une PCR positive le mois avant vêlage et une mère négative. Pourrait-on dire que la technique PCR PHAGE permette de détecter la résilience des animaux face à la pression d'infection ?

Comment expliquer une bactériémie si précoce 1 j ?

4 veaux positifs sur le sang sont issus de mères de statut initialement « négatif » mais pour 3 d'entre eux leur mère a eu une PCR positive avant vêlage.

Tabl 13 des animaux positifs sur le sang en Phage PCR

élevage / HERDS	veau	sexe	date de naissance	âge au premier prelevé	résultat positif veau couleur indique le statut de la mère	résultats positifs sg= sur sang phage et bs = sur PCR bouse	nbre de prélèvem ent positif	nbre de prélève ment

GGR	8844036231	M	09/01/2018	7,00	oui	p4sg	1	9
GGF	8844053179	F	28/12/2017	19,00	oui	p9sg	1	15
GDH	8844083233	M	05/03/2018	1,00	oui	p1sg p8bs p10bs	3	11
GDH	8844043212	F	20/11/2017	15,00	oui	p1sg p11bs p13bs p14bs p15bs p16bs	6	16
GDH	8844043223	M	23/01/2018	14,00	oui	p1sg	1	1
GDH	8844083231	M	25/02/2018	9,00	oui	p6sg p9sg p10bs	3	11
GDH	8844083248	F	04/06/2018	1,00	oui	p2sg p7bs p10bs	3	10

2 veaux (voir tableau veau 3223 et 3231) sont issus de mères négatives en PCR sur bouse avant et après vêlage. Leurs résultats positifs sortent à 14 jours et 6 mois : est-ce la preuve d'une contamination par l'environnement ? Est-ce une erreur d'affiliation de la mère (4% d'erreurs connues en IPG) ? S'agit-il de résultats faussement positifs ?

Vu les résultats en PCR sur le veau (3231) qui a eu son 1^{er} résultat positif sur le sang à 6 mois avec des résultats positifs en PCR à 9 sur le sang et 10 mois positifs sur les bouses, on peut penser que cet animal a été contaminé (par 2 fois) par l'environnement avec une primo contamination visible à 6 mois et 9 mois. (Voir les résultats des prélèvements d'environnement)

Un autre veau (3248) positif à 30 jours sur le sang a été contrôlé tous les mois pendant 10 mois et il a eu 2 résultats positifs sur bouse à 7 et 10 mois. Les prélèvements se sont arrêtés à 10 mois à la fin de l'étude. Sa mère était connue positive. Née dans un environnement contaminé est ce que ce veau a été contaminé par sa mère, par son environnement ou par voie fœtale ? Théoriquement, cette femelle devrait être contrôlée tous les ans dans le cadre du suivi de la paratuberculose dans l'élevage sauf en cas de réforme prématurée (qui serait recommandée)

Les résultats de l'étude montrent que 17% de mères avec un « statut négatif » excrètent avant mise bas et redeviennent non excrétrices après vêlage. Les conditions de mise en lot étant différentes d'une période à l'autre (été parc ; hiver bâtiment) et d'un élevage à l'autre, peut-on envisager que les animaux avec un « statut négatif » qui excrètent avant vêlage se soient contaminés dans un environnement où la pression de MAP est forte et ou avec des vaches excrétrices. En effet, des prélèvements d'environnement, réalisés en janvier 2019, montrent une forte présence de MAP dans l'environnement.

Les vaches connues avec des « statuts positifs » ont dans la majorité des cas maintenu leur positivité avant et après vêlage.

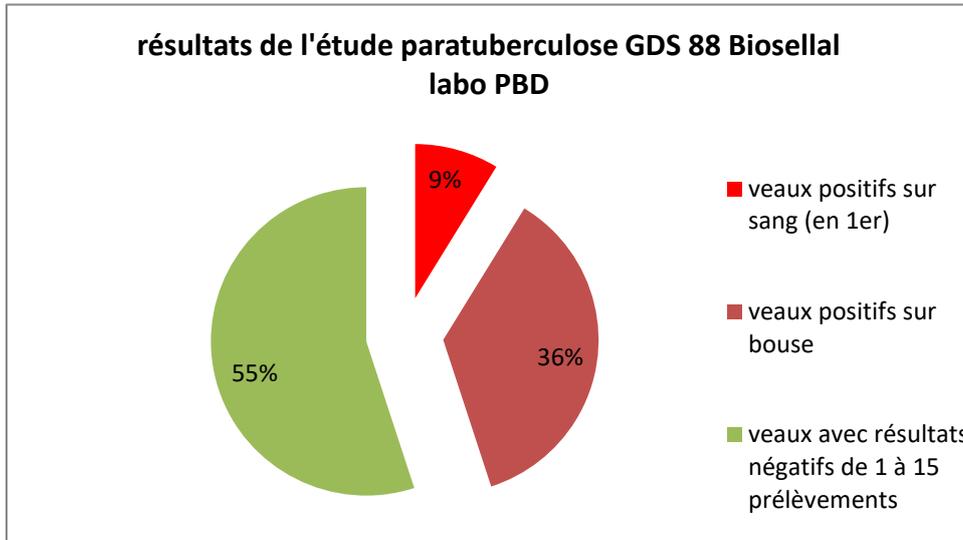
Les modifications de l'excrétion des animaux connus négatifs pourraient s'expliquer par la contamination par l'environnement des animaux positifs et ou la présence d'autres animaux forts excréteurs. Ce qui implique un plus gros risque de contamination des veaux à la naissance issus de mère négative.

La contamination à la naissance par l'environnement contaminé (y compris dans un box de vêlage) est un fait avéré. Par contre, la contamination de la mère négative et son excrétion « passive » (possible et ou supposée) détectée le mois avant vêlage, pourrait impacter autant sur la contamination des veaux que des « positives ».

Un facteur de risque jusque-là non connu ou en tout cas non mis en évidence.

6. Analyse des résultats des veaux. Que penser des veaux positifs sur bouse et négatifs sur le sang ?

C4 : bilan des taux de positivité par matrice



36 veaux ont eu des résultats positifs sur un total de 84 veaux dont 57% de femelles : 42% des veaux ont eu un ou plusieurs résultats positifs et 58 % sont des femelles positives.

Normalement, on aurait pu s'attendre avec 31 mères positives à 30% de contamination foetale, soit 10 veaux positifs minimum, sans compter les contaminations par l'environnement (mamelle de la mère, litière, contact avec d'autres animaux positifs, par le colostrum...).

On observe une forte excrétion (39 %) des veaux issus de 53 mères « négatives ». S'agit-il de veaux excréteurs passifs, d'une contamination par l'environnement ou d'une contamination entre veaux ?

Pour les veaux positifs uniquement sur les fèces : Sommes-nous passés à côté d'une bactériémie ? S'agit-il pour certains veaux d'une excrétion passive ? Ou s'agit-il d'une vraie contamination ?

On observe une nette différence de contamination des veaux entre les 2 exploitations G.GR et G.HD. Mais au final, nous avons peu de « vraies » vaches négatives dans l'exploitation G.HD

Dans l'exploitation du G.GR, les veaux issus de mères positives ne sont pas positifs : aucun des 12 veaux (mâles ou femelles) n'est positif. Alors que dans l'exploitation G.HD, 13 veaux issus de mères positives sur 17 sont positifs (4F et 9 M). La seule explication semble être en adéquation avec les pratiques de l'éleveur. En effet, l'éleveur du G GR a mis en place de mesures pour protéger ses veaux issus de mères positives : il les a enlevés dès la naissance en prenant des précautions pour limiter les contaminations oro-fécale.

Cela signifierait-il que des mesures techniques à la naissance limiteraient fortement la contamination des veaux ?

- Séparation de la mère du veau dès la naissance (très vite : « à peine le temps que sa mère le lèche »)
- Isolement en niche individuelle sans aucun contact avec les adultes...
- Il a donné le colostrum des mères à leur veau (pendant 2 jours maximum)- les veaux boivent ensuite du lait reconstitué.

Dans l'autre exploitation, au contraire, l'éleveur n'a pas pris de précaution parce qu'on lui a dit que les veaux issus de mères positives avait un fort risque d'être contaminé. Les veaux sont restés avec leur mère, ont tété le colostrum etc...

Concernant les veaux issus de mères négatives pour l'élevage G.GR qui a une conduite commune pour les mâles et les femelles jusqu'à 6-7 mois, le taux de positivité des femelles est de 38% et de 21% pour les mâles. Nous sommes sur des petits nombres alors qu'il est difficile de voir si c'est significativement différent.

Par contre, pour l'exploitation G.HD, l'éleveur a une conduite différente pour les mâles et les femelles où il essaie de les séparer le plus vite possible des mères, le taux de positivité est alors de 42 %. Et pour les mâles qui sont dans les logettes des VL (ancienne pratique abandonnée pour les femelles), il est de 87%, soit autant que pour des veaux issus de mères positives dans cet élevage. Le taux de positivité des femelles reste important, malgré les précautions prises à la naissance, peut être en raison des résultats de PCR positifs sur les mères avant vêlage. En effet, sur 40 mères étudiées, seules 6 sont négatives en PCR avant vêlage (15%), contre 26/39 pour l'élevage G.GR (67%).

D'après une étude réalisée par GOURREAU et al.2011, il existe une diversité des profils d'expression de la maladie. 3 catégories d'animaux peuvent ainsi être déterminées :

- Les animaux infectés résistants : l'infection est contrôlée, les animaux deviennent rapidement résistants et ne sont pas excréteurs.
- Animaux excréteurs sains : l'infection est partiellement jugulée et l'excrétion est intermittente
- Animaux devenant à terme malades, avec une persistance de la bactérie.

On retrouve certainement les 3 catégories d'animaux qui pourraient peut-être s'identifier par la technique d'analyse d'effectuée, PHAGE sur sang, mais aussi par les résultats positifs en PCR sur bouse ensuite.

Impact de la conduite des veaux autour du vêlage sur l'infection précoce des veaux lors du 1^{er} mois de vie

- Comparaison des résultats obtenus sur les veaux lors du 1^{er} mois de vie selon les deux cheptels
 - **28,2% (11/39)** de veaux positifs le 1^{er} mois dans cheptel HD qui laisse les veaux au contact des mères plus de 12h après la naissance, place les femelles ensemble en cases collectives et élève les mâles à l'attache près des adultes en production
 - dont 72% (8/11) issus de mères excrétrices au moment du vêlage
 - parmi les 3 veaux issus de mères non-excrétrices, 2 sont des mâles
 - **0% (0/39)** de veaux positifs le 1^{er} mois dans le cheptel GR qui sépare les veaux des mères dans les 12 heures et les élève le 1^{er} mois en cases individuelles
- Confirmation qu'une très faible quantité de MAP suffit
 - Soit contamination *via* la mère lors de la tétée
 - quel que soit le niveau d'excrétion fort ($>1.10^4$ MAP/g de fèces) ou faible ($<1.10^4$ MAP/g de fèces)
 - Notion de durée de contact avec la mère
 - Soit *via* l'environnement = résultats obtenus sur fumiers des boxes de vêlage et sur mâles issus de mères non excrétrices
 - Le statut du colostrum ne semble pas avoir d'impact = pratique identique dans les deux élevages
 - Impact de l'excrétion des mères autour du vêlage

Impact de la perméabilité de l'épithélium de l'IG des veaux sur bactériémie tardive

- MAP se retrouve dans la circulation sanguine uniquement si voie de pénétration entérocytaire privilégiée par rapport à la pénétration *via* les Plaques de Peyer
 - Aucune mère n'a été trouvée positive sur sang
- Equilibre de l'alimentation
 - Veau trouvé positif en Phage-PCR sang à 4 mois suite à un épisode d'acidose
- Facteurs de susceptibilité génétique?
 - Veau trouvé positif en Phage-PCR sang à 6 et 9 mois
 - Etude Paradigm en cours pour identifier des marqueurs génétiques de susceptibilité des bovins à la Paratuberculose a permis d'identifier sur race Holstein deux marqueurs sur Chromosome 13 qui auraient un rôle sur la perméabilité des entérocytes

7. Résultats de prélèvements

Les résultats en PCR des prélèvements d'environnement mis en place en fin d'étude (janvier 2019) afin d'évaluer la contamination de l'environnement, en lien ou non avec les résultats des animaux, nous montrent :

Dans les 2 exploitations, des résultats positifs sur les adultes.

Le box de vêlage de l'exploitation G.GR est négatif, alors que les 2 box de vêlage du G.HD sont positifs.

Dans les 2 élevages, les résultats sont plutôt négatifs sur les veaux de la naissance au sevrage, mais des veaux peuvent également excréter et donc contaminer l'environnement.

Les résultats des prélèvements d'environnement sont en adéquation avec les résultats observés sur l'excrétion des animaux avant 1 mois et après 6 mois. Les veaux en nurserie seraient les moins touchés (faiblement) comme le montre le faible nombre de résultats positifs entre 2 et 4 mois d'âge.

8. Conclusion :

La problématique était d'étudier une nouvelle technique d'analyse en vue d'identifier la bactérie vivante dans le sang en la comparant à la technique actuellement utilisée soit la PCR sur fèces.

La Phage PCR sur sang a permis de mettre en évidence la bactérie vivante dans le sang de veaux dès leur 1^{er} jour de vie. Elle n'a pas mis en évidence de bactériémie sur des adultes même pour ceux qui étaient en phase clinique.

La technique PCR sur fèces a été adaptée pour permettre d'identifier l'excrétion fécale sur des veaux.

Les résultats sur les deux techniques utilisées en même temps montrent un décalage de quelques mois entre la présence de la bactérie vivante dans le sang et l'excrétion fécale. La bactérie n'a pas été souvent identifiée sur le sang des veaux 8.3 % de la totalité des veaux. L'excrétion fécale a été retrouvée sur 40% des veaux analysés entre 1 mois et 16 mois.

Ces 2 détections sont nouvelles et pour l'instant non utilisées en routine dans la gestion de la paratuberculose. Habituellement ; les animaux n'étaient pas prélevés avant l'âge de 18-24 mois. Hors, on s'aperçoit que dans un milieu contaminé cette information peut être intéressante pour les éleveurs d'une part prenne conscience de l'impact de cette maladie sur l'avenir de son troupeau et d'autre part pour apprendre à gérer la maladie et à envisager une carrière courte pour des animaux excréteurs. Ces deux techniques ouvrent vers une perspective de détection plus précoce des animaux potentiellement contaminants voire cliniques : ce qui reste à identifier.

La phage PCR sur le sang comme le PCR sur fèces adaptée sur les veaux ont permis de mettre en évidence une potentielle contamination des veaux à partir de 1^{er} jour de vie. En effet, la Phage PCR a permis de mettre en évidence une bactériémie sur des veaux. Peu de veaux ont été détectés positifs à cette technique. Mais cette étude est allée plus loin en identifiant de l'excrétion récurrente sur des veaux en l'absence d'adulte.

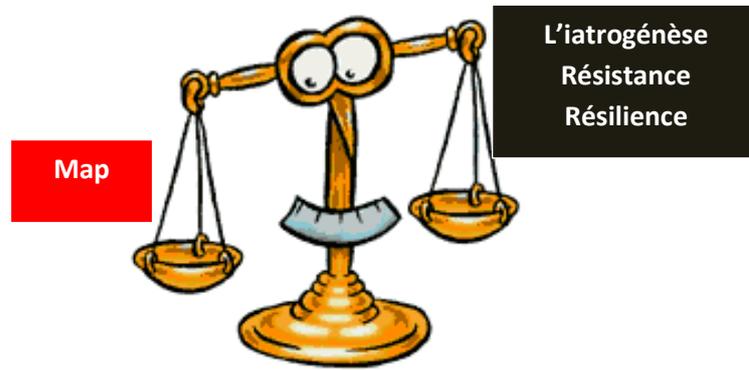
La contamination par l'environnement, mais aussi par les mères positives, jouent des rôles essentiels à la contamination des veaux.

Cette technique de prélèvements d'environnement permet de bien identifier les risques liés à la pression de l'environnement sur la contamination des veaux et peut être un bon outil de contrôle de l'hygiène au vêlage pour les éleveurs, sans compter de montrer l'impact d'un manque d'hygiène sur la contamination possible des futures générations.

Les outils analytiques utilisés dans cette étude :

La technique PHAGE PCR sur sang (tube hépariné de sodium) et la PCR classique sont 2 techniques à utiliser différemment et de façon complémentaire. Les informations recherchées sont vraiment différentes et utiles et permettent surtout une détection précoce des animaux contaminés ou à risque. Il faut juste comprendre l'importance et l'interprétation de ces résultats.

Cette étude a permis de mettre en évidence une forte contamination des veaux par plusieurs facteurs (excrétion des mères, contamination de l'environnement et contamination entre veaux) qui sont difficilement mesurables mais toutefois identifiables. De plus, nous avons pu observer dans les mêmes conditions d'élevage des différences de réaction des animaux, liées certainement aux conditions de santé des animaux.



Nous avons observé des similitudes d'action et de réaction de Map avec d'autres mycobactéries concernant entre autres la détection d'une bactériémie probable liée à une primo infection des veaux (détection très précoce avec la Phage PCR).

En effet, le 1^{er} mois de vie du veau, la Phage PCR semble l'outil le plus précoce permettant d'identifier une bactériémie sur les veaux.

En complément, à partir de 6 mois d'âge la technique PCR sur bouse pourrait être le 2^{ème} outil permettant le tri souhaité par les éleveurs pour permettre d'orienter rapidement l'animal positif vers une carrière plus courte.

Ces 2 techniques, complétées par la PCR d'environnement, ne permettent pas d'assainir un troupeau mais de mieux le gérer et d'aider à la décision.

Il est évident que la conduite des éleveurs a une plus grande influence sur la contamination des veaux que la connaissance et l'élimination des animaux positifs excréteurs. Connaissant la résistance de Map, il est loin d'être facile en élevage de mettre en place les mesures hygiéniques idéales pour limiter les contaminations.

Au début de l'étude, nous avons choisi des animaux non pas séropositifs, mais bien excréteurs. Pour nous, la gestion des excréteurs est le 2^{ème} outil derrière les mesures permettant de limiter les contaminations des veaux à savoir la gestion des conduites d'élevage.

Il est possible que la présence d'animaux excréteurs avant vêlage ait favorisé l'excrétion passive des mères ayant un « statut » négatif.

Des cas de contamination croisée ont été mis en évidence, soit par la contamination passive des mères, soit par une autre contamination non identifiée avec certitude (excrétion passive de la mère avant MB, éleveur, environnement ?).

La conduite des animaux en élevage semble avoir une nette importance dans la réceptivité des veaux à l'infection MAP :

- L'importance de la pression de MAP dans l'environnement des femelles le dernier mois avant vêlage
- L'importance de la conduite au vêlage, l'hygiène, le temps de présence de veau avec sa mère, les conditions de prise colostrale (tété, traite à la main ou machine)
- L'importance de la iatrogénèse des veaux dans l'impact sur la résistance ou la résilience du jeune veau : prise de colostrum, hygiène et logement du veau, limitation des pathologies néonatales et la gestion du post sevrage.

VI. Limite de l'étude :

Les pertes d'informations ont été assez importantes, surtout dans la perte des veaux, principalement les veaux morts nés (15%), mais aussi les veaux morts durant l'étude (7%).

La grande variation d'excrétion des mères négatives surtout, semble assez gênante pour pouvoir « qualifier un animal de négatif ». Ce point, en termes de classification du « statut » des animaux, a aussi posé quelque problème dans l'étude génomique réalisée en lien avec l'école vétérinaire de Nantes.

Pour l'instant, nous ne savons pas identifier les animaux excréteurs passifs des animaux potentiellement à risque de clinique. Mais ne sont-ils pas tous « dangereux » pour l'environnement et la contamination des veaux ? Par contre, le sont-ils assez pour justifier la réforme de ces animaux pour l'éleveur ? Sachant que rien ne nous dit que des animaux excréteurs déclencheront la maladie, une conduite d'élevage et une gestion des animaux positifs vis à vis des « négatifs » s'avèrent nécessaire !

Ayant dû suivre les périodes de naissance, nous avons dû nous aligner sur les besoins de l'étude en termes d'excrétion des mères ou de statut « négatif », ce qui nous a contraint à étaler les prélèvements. Ce qui implique que certains animaux ont pu avoir jusqu'à 16 prélèvements et d'autres 1 seul. En moyenne, les veaux ont eu 7 prélèvements, ce qui était conforme au souhait initial pour cette étude. Mais cela pose la question des veaux n'ayant eu que des résultats négatifs à moins de 5-6 mois d'âge, alors que l'excrétion semble être plus importante après 7 mois. S'agit-il d'animaux « négatifs » ou d'animaux pas encore positifs ?

Le fait d'avoir pu prolonger les prélèvements pour certains animaux était plutôt un atout pour l'étude, puisque cela a permis d'avoir une meilleure visibilité, au fil du temps, de la variabilité de l'excrétion pour des jeunes animaux.

En se limitant à ces résultats, nous ne pouvons pas nous permettre de classer clairement les animaux aujourd'hui trouvés positifs ! Et vu le nombre que cela représente, 60% dans une exploitation et 30% dans l'autre, comment assurer les conseils les plus adaptés pour limiter l'impact financier de la maladie en élevage ?

VII. Perspectives.

ETUDE

42 % de veaux (sur 85) ont un ou plusieurs résultats positifs. Quels sont leur devenir en termes de cliniques, de production ? Comment travailler, afin d'identifier la différence entre les excréteurs passifs et les excréteurs qui risquent d'être malades. On a vu que le travail sur les CT est une information à prendre en compte dans la gestion des excréteurs, mais cela ne permet pas de déterminer la catégorie des animaux (excréteurs passifs ou pas).

La poursuite des prélèvements sur les animaux négatifs et positifs, permettrait de mettre en exergue la persistance des « statuts » des veaux négatifs, ainsi que le devenir des animaux positifs.

Les animaux positifs sur le sang pourraient être suivis, mais les mâles (engraissement taurillons) seront abattus avant 24 mois. Concernant les femelles positives, les éleveurs n'ont aucun intérêt à les garder. Il semblerait préférable de les prélever sur toutes les matrices possibles le plus tôt possible.

Avec l'avancée de la recherche sur la génomique, il serait intéressant de prélever ces animaux positifs sur le sang PHAGE PCR particulièrement, afin de vérifier si ces animaux font partie des animaux « sensibles » à la paratuberculose par génotypage.

Il serait aussi intéressant de suivre ces animaux cliniquement ou de faire un prélèvement au niveau jéjunales et iléocæcales de ces animaux au moment de l'abattage pour observer la présence ou non de lésions granulomateuses typiques de la clinique Map.

Par contre, en dehors de la connaissance des « statuts des animaux », cette étude a mis en évidence l'impact indéniable de la pression de Map dans l'environnement, mais aussi de l'excrétion de Map par les mères sur la contamination des jeunes.

Les conditions d'élevage semblent avoir un impact non négligeable sur la pression de MAP dans l'environnement ainsi que sur le risque de contamination des animaux, sans compter la possibilité d'améliorer le côté résilience de l'animal ou au contraire de sensibilité à Map.

LABORATOIRE

- Communication sur Résultats de l'Etude
 - Communication orale au Congrès EAVLD, Bruxelles, octobre 2018
 - Publication dans Presse française spécialisée (ex Bulletin des GTV), à rédiger
 - Publication internationale avec l'aide du Pr Petr. Kralik (OIE) et de son équipe, en cours de rédaction
 - Communication orale Congrès ICP, Dublin, juin 2020
 - Communications orales locales ou nationales

- Pack analytique disponible en exclusivité auprès de BioSella pour les laboratoires d'analyses
 - PACKMAPPHAGE (BD) de 100 réactions contenant
 - Réactif RedDown® pour préparation du sang
 - Kit BioExtract® Phage
 - Kit Actiphage™ Rapid Test
 - Kit PurePhage® pour purification et concentration de l'ADN avant PCR
 - Kit PCR temps-réel Bio-T kit® *Mycobacterium avium paratuberculosis*
 - Validation du test Actiphage-PCR sur d'autres matrices
 - Certification élevage indemne sur lait de tank
 - Allégation sanitaire pour Lait cru et pasteurisé et dérivés

« En Angleterre, le laboratoire PBD BIOTECH a mis en place une nouvelle technique de PHAGE PCR sur le sang. Cette technique devrait être testée en Angleterre et aux USA sur la matrice lait. »

La détection précoce d'une maladie est un point fort dans sa gestion, puisque des mesures peuvent être prises pour la combattre ou pour éviter sa propagation. Par cela, cette étude signifie une avancée. Comme l'a expliqué Ben Swift, coauteur et un directeur de recherche et développement dans PBD Biotech, "Les jeunes animaux sont hautement sensibles à l'infection et pouvoir identifier la maladie de Johnne dans cette étape précoce est la clef pour contrôler la propagation de la maladie."

REMERCIEMENTS.

Remerciement aux partenaires financiers : GDS 88 – Laboratoire BIOSELLAL

Remerciement pour la fourniture des kits Phage : laboratoire PBD biotech

Remerciement aux partenaires : éleveurs et vétérinaires

Abréviations

- Map ou MAP = *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
- MB : Mise bas
- PCR Polymerase chain reaction analysis is a laboratory technique. The purpose of PCR testing is to find small amounts of DNA in a sample, using a process known as amplification.
- Ct : coefficient de translation
- VL : vaches laitières
- VT : vaches taries
- Nbre : nombre
- LVD : Laboratoire Vétérinaire départemental
- GDS : groupement de défense sanitaire / association d'éleveurs

Références.

- AFSSA « Paratuberculose des ruminants » mars 2009
- Pr Yves Millemann lors d'une intervention en janv 2014
- Thèse vétérinaire de M. M Mauriceau oct. 2013 – R. Guattéo - les outils de diagnostic - prélèvements d'environnement
- Dr Christelle ROY présentation à l'ICP à Nantes en 2016
- étude corbett et al. Vet Res 2017 : *Fecal shedding and tissue infections demonstrate transmission of MAP in group-housed dairy calves*. Il existe une contamination des veaux nouveaux nés avec une excrétion au niveau des fèces
- Dr J. VIALARD Les techniques de diagnostic directes mettent en évidence la MAP dans différentes matrices : dans les bouses,
- Etude méthanisation et paratuberculose GDS 88
- Microbiol Methods : 2013 Sep : 94(3) : 175-179 *Development of a rapid phage-based method for the detection of viable MAP in blood within 48h* / Benjamin MC Swift, E J Denton, S A Mahendran, J N Huxley, C ED Rees.
- Infection du veau :
 - KHARE et al, 2009
 - WOO et CZUPRYNSKI,2008
 - WATERS et al. ;2003
 - LEPPER et al,1989
 - KOO et al, 2004
 - GOURREAU et al.2011

- Les phages, des virus guérisseurs / LE MONDE SCIENCE ET TECHNO | 14.06.2012 à 15h21 • Mis à jour le 25.07.2012 à 10h20 | Par Raphaëlle Maruchitch et Anuliina Savolainen (à Tbilissi)

Graphiques, tableaux et organigrammes

Tabl 1 : Conditions d'élevage des veaux pendant l'étude –typologie des élevages races Holstein et montbéliarde

Tabl 2 : comparaison de 2 kits serologiques

Tabl 3 : test PCR sur bouse fait sur les animaux positifs n-1 en PCR sur bouse

Tabl 3 : prélèvements réalisés par date

Tabl 4 : résultats PHAGE PCR sur les veaux par mois de vie des veaux

Tabl 5 : résultats d'excrétion détectée sur les veaux par mois de vie

Tabl 6 : résultats positifs des veaux par matrice et par exploitation

Tabl 7: résultats des veaux en fonction des « statuts recalculés » des mères

Tabl 8: taux de positivité des veaux par rapport au « statut recalculé des mères »

Tabl 9 : résultats des prélèvements d'environnement par lieu de vie des animaux

Tabl 10 :

Tabl 11 :

Tabl 12 :

Tabl 13 :

Organigramme 1 décisionnel pour le choix des mères

Organigramme 2 : évolution des « statuts » des mères G.GR

Organigramme 3 évolution des « statuts » des mères G.GR

Organigramme 4 : décline les résultats des CT des mères « positives » avec leurs résultats avant et après vêlage et les résultats sur leurs veaux

veaux femelles, du «statut » des mères à leurs résultats connus à la fin de l'étude

Organigramme 5 : veaux mâles, du «statut » des mères à leurs résultats connus à la fin de l'étude

Organigramme 6 :

C1 : taux de positivité des PCR sur bouse sur les mères

C2 : taux de positivité des Phages PCR sur les veaux

C3 : taux de positivité des PCR sur fèces des veaux

C4 :

Graph 1 statut des mères choisies pour l'étude par élevage

Graph 2 : évolution des résultats sur le sang en Phage PCR

Graph 3 et 4 : évolution des résultats positifs sur le sang en PCR par sexe

Graph 5 : bactériémie positive sur les veaux par tranche d'âge

Graph 6 : évolution de l'excrétion par mois de vie des veaux

Graph 7 : nombre de veaux positifs par tranche d'âge quelle soit la technique

Graph 8 : nombre de veaux positifs par tranche d'âge avec la PCR sur fèces

Graph 9 : nombre de prélèvements positifs par sexe

Graph 10 : 36 veaux positifs par sexe et par 1^{ère} réaction positive

Graph 11 :

Graph 12 :

Microbiol Methods. 2013 Sep ; 94(3):175-179.

Development of a rapid phage-based method for the detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in blood within 48 h ☆

[Benjamin M.C. Swift](#)^{a,*}, [Emily J. Denton](#)^b, [Sophie A. Mahendran](#)^b, [Jonathan N. Huxley](#)^b and [Catherine E.D. Rees](#)^a

[Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#) ►

Résumé:

L'objectif de cette étude était de développer une méthodologie pour détecter rapidement *Mycobacterium avium* subsp. **viable**, *paratuberculosis* (MAP) dans des échantillons cliniques de sang. Les cellules de MAP extraites dans le sang disponible dans le commerce ont été récupérées en utilisant une séparation magnétique médiée par un peptide optimisé (PMMS) et détectées en utilisant une méthode à base de phage, et l'identité des cellules détectées a été confirmée en utilisant une amplification par PCR imbriquée des séquences de signature MAP (IS900). La limite de détection a été déterminée comme étant 10 cellules MAP par ml de sang et a été utilisée pour détecter la MAP présente dans les échantillons cliniques de sang bovin. En utilisant la méthode PMMS-phage, il n'y avait pas de différence lors de la détection de la MAP à partir du sang total ou du manteau buffy.

La MAP a été détectée chez des animaux qui étaient ELISA au lait positifs (15 animaux) par PMMS-phage et aucune MAP n'a été détectée dans des échantillons de sang d'un troupeau agréé de maladie de Johne (5 animaux). Dans un ensemble d'échantillons d'un troupeau (10 animaux) issus d'animaux présentant un statut ELISA de lait variable, les résultats du phage PMMS étaient d'accord avec les résultats positifs du ELISA du lait dans tous les cas sauf un. Ces résultats montrent que la méthode PMMS-phage peut détecter MAP présente dans le sang naturellement infecté. Le temps de dosage total est de 48 h et, contrairement aux tests de détection basés sur la PCR, seules des cellules **viables** sont détectées. Une méthode rapide pour détecter la MAP dans le sang pourrait favoriser la compréhension de l'infection disséminée chez les animaux atteints de la maladie de Johne.

Les phages, des virus guérisseurs

Avant l'avènement des antibiotiques, les médecins faisaient appel à ces microbes pour enrayer les infections bactériennes. La phagothérapie, encore utilisée en Géorgie, est introduite en France, mais en catimini.

LE MONDE SCIENCE ET TECHNO | 14.06.2012 à 15h21 • Mis à jour le 25.07.2012 à 10h20 | Par Raphaëlle Maruchitch et Anuliina Savolainen (à Tbilissi)

SPONSORED DOCUMENT FROM

JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL
METHODS

ELSEVIER
FREE Full-Text Article

J Microbiol Methods, 2013 Sep; 94(3): 175–179.
doi: [10.1016/j.mimet.2013.06.015](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.06.015)

PMCID: PMC3783900

Development of a rapid phage-based method for the detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in blood within 48 h

[Benjamin M.C. Swift](#),^{a,□} [Emily J. Denton](#),^b [Sophie A. Mahendran](#),^b [Jonathan N. Huxley](#),^b and [Catherine E.D. Rees](#)^a

^aSchool of Biosciences, University of Nottingham, Sutton Bonington Campus, Loughborough, Leics, LE12 5RD, UK

^bSchool of Veterinary and Medicine Science, University of Nottingham, Sutton Bonington Campus, Loughborough, Leics, LE12 5RD, UK

Benjamin M.C. Swift: sixbs@nottingham.ac.uk

□ Corresponding author. Tel.: + 44 1159516161. sixbs@nottingham.ac.uk

Received 2013 Mar 14; Revised 2013 Jun 4; Accepted 2013 Jun 12.

Copyright © 2013 The Authors

Open Access under [CC BY 3.0](#) license

Microbiol Methods, 2013 Sep ; 94(3):175-179.

Development of a rapid phage-based method for the detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in blood within 48 h*

[Benjamin M.C. Swift](#),^{a,*} [Emily J. Denton](#),^b [Sophie A. Mahendran](#),^b [Jonathan N. Huxley](#),^b and [Catherine E.D. Rees](#)^a

[Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#) ►

Résumé:

L'objectif de cette étude était de développer une méthodologie pour détecter rapidement *Mycobacterium avium* subsp **viable**. *paratuberculosis* (MAP) dans des échantillons cliniques de sang. Les cellules de MAP extraites dans le sang disponible dans le commerce ont été récupérées en utilisant une séparation magnétique médiée par un peptide optimisé (PMMS) et détectées en utilisant une méthode à base de phage, et l'identité des cellules détectées a été confirmée en utilisant une amplification par PCR imbriquée des séquences de signature MAP (IS900). La limite de détection a été déterminée comme étant 10 cellules MAP par ml de sang et a été utilisée pour détecter la MAP présente dans les échantillons cliniques de sang bovin. En utilisant la méthode PMMS-phage, il n'y avait pas de différence lors de la détection de la MAP à partir du sang total ou du manteau buffy.

La MAP a été détectée chez des animaux qui étaient ELISA au lait positifs (15 animaux) par PMMS-phage et aucune MAP n'a été détectée dans des échantillons de sang d'un troupeau agréé de maladie de Johne (5 animaux). Dans un ensemble d'échantillons d'un troupeau (10 animaux) issus d'animaux présentant un statut ELISA de lait variable, les résultats du phage PMMS étaient concordant avec les résultats positifs du ELISA du lait dans tous les cas sauf un. Ces résultats montrent que la méthode PMMS-phage peut détecter MAP présente dans le sang naturellement infecté. Le temps de dosage total est de 48 h et, contrairement aux tests de détection basés sur la PCR, seules des cellules **viables** sont détectées. Une méthode rapide pour détecter la MAP dans le sang pourrait favoriser la compréhension de l'infection disséminée chez les animaux atteints de la maladie de Johne.

ANNEXES

Résultats connus pour les 3 exploitations historique

Exploitation G.GF :

- 125 sérologies individuelles : **15 positives** (28/3/16)
- 81 CF sur les séronégatives : **9 positives** (12/5/16)
- 85 sérologies individuelles : **2 positives** (6/4/17)

Exploitation G.HD :

VL

- 117 sérologies individuelles : **14 positives** (31/5/17)
- 110 PCR sur les séronégatives : **38 positives** (6/6/17)

Génisses

- 44 sérologies individuelles : **5 positives** (13/3/17)
- 34 PCR sur les séronégatives : **29 positives** (3/4/17)

Exploitation G.GR : *Pas de résultats globaux antérieurs connus*

VL

- 103 sérologies individuelles (20/11/17) : **6 positives**
- 103 PCR sur les séronégatives (20/11/17) : **18 positives** (dont les 6 en sérologie)

15 veaux perdus avant les 1er prélèvements - 82 veaux avec au moins 1 résultat sur sang et bouse

statut initial des mères	veaux négatifs				veaux positifs sur bouse				veaux positifs sur sang				taux de positivité par statut des mères			
	G.GR	G.GF	G.HD	TT	G.GR	G.GF	G.HD	TT	G.GR	G.GF	G.HD	TT	G.GR	G.GF	G.HD	TT
mères négatives ayant eu des résultats positifs avant ou après vêlage	2	0	7	9	3	0	5	8	1	0	1	2	67%		46%	53%
mères négatives (sero + PCR bouse)	17	1	2	20	4	0	6	10	0	0	2	2	19%		80%	38%
mères positives avant et après vêlage	12	1	4	17	0	0	11	11	0	1	2	3	0%		76%	45%

Tabl Veaux positifs en Phage PCR

veau	sexe	date de naissance	âge au premier prelevt en jour	résultat positif veau couleur indique le statut de la mère		nbre de prélèvement positif	nbre de prélèvement	dernier prélèvement
8844036231	M	09/01/2018	7,00	Mère initialement négative avec excrétion	p4sg	1	9	p9
8844053179	F	28/12/2017	19,00	Mère connue positive	p9sg	1	15	p15
8844083233	M	05/03/2018	1,00	Mère initialement négative avec excrétion	p1sg p8bs p10bs	3	11	p11
8844043212	F	20/11/2017	15,00	Mère initialement négative avec excrétion	p1sg p11bs p13bs p14bs p15bs p16bs	6	16	p16
8844043223	M	23/01/2018	14,00	Mère négative	p1sg	1	1	p1
8844083231	M	25/02/2018	9,00	Mère négative	p6sg p9sg p10bs	3	11	p11
8844083248	F	04/06/2018	1,00	Mère connue positive	p2sg p7bs p10bs	3	10	p10

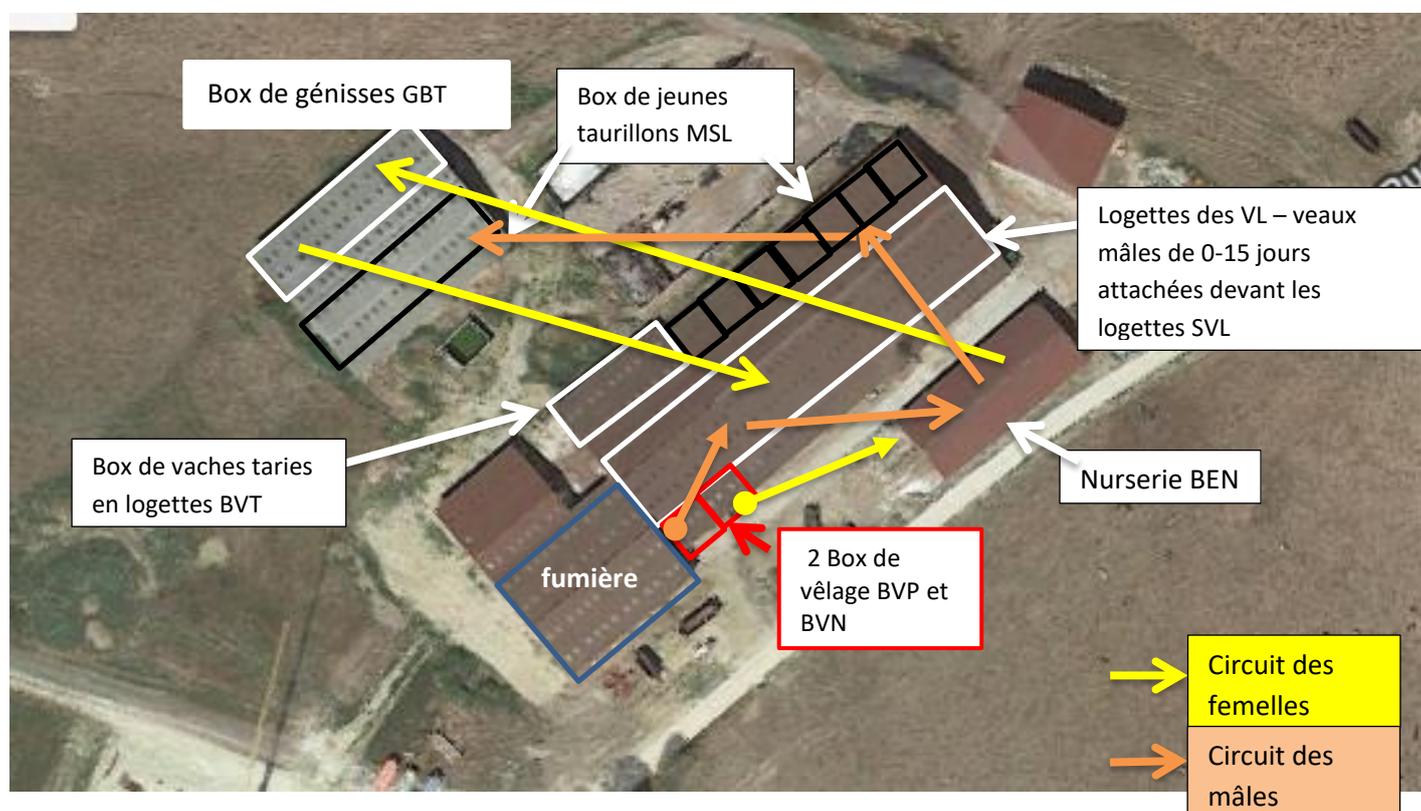
Tabl : Veaux négatifs quelle que soit la technique

Veaux négatifs								
veau	sexe	date de naissance	âge au premier prelevé	résultat positif veau couleur indique le statut de la mère	nombre de prélèvement positif	nombre de prélèvement	dernier prélèvement	
8844036221	M	12/12/2017	35,00	non	0	8	p8	
8844036232	F	23/12/2017	24,00	non	0	15	p15	
8844076047	M	06/02/2018	0,00	non	0	9	p9	
8844076049	M	11/02/2018	23,00	non	0	6	p6	
8844076046	F	14/01/2018	2,00	non	0	15	p15	
8844076057	M	24/02/2018	10,00	non	0	8	p8	
8844076064	F	12/04/2018	21,00	non	0	11	p11	
8844076067	M	12/04/2018	21,00	non	0	9	p9	
8844076065	M	01/04/2018	2,00	non	0	7	p7	
8844076136	F	27/06/2018	6,00	non	0	9	p9	
8844076135	M	29/06/2018	4,00	non	0	7	p7	
8844076147	M	04/07/2018	27,00	non	0	4	p4	
8844076139	M	01/07/2018	2,00	non	0	7	p7	
8844076138	F	29/06/2018	4,00	non	0	9	p9	
8844076156	F	09/09/2018	23,00	non	0	1	p1	
8844076141	M	03/07/2018	0,00	non	0	2	p2	
8844076151	M	05/07/2018	26,00	non	0	6	p6	
8844076144	F	10/07/2018	21,00	non	0	8	p8	
8844076148	F	28/07/2018	3,00	non	0	8	p8	
8844076150	F	03/08/2018	32,00	non	0	7	p7	
8844076175	M	11/11/2018	23,00	non	0	4	p4	
8844076179	M	20/11/2018	14,00	non	0	4	p4	
8844076181	M	22/11/2018	12,00	non	0	4	p4	
8844076183	M	28/11/2018	6,00	non	0	4	p4	
8844076177	M	17/11/2018	17,00	non	0	4	p4	
8844076185	M	30/11/2018	4,00	non	0	4	p4	
8844076174	F	23/12/2018	16,00	non	0	3	p3	
8844076189	M	20/12/2018	19,00	non	0	3	p3	
8844076180	F	04/01/2019	4,00	non	0	3	p3	
8844076176	F	29/12/2018	10,00	non	0	3	p3	
8844076178	F	02/01/2019	6,00	non	0	3	p3	
8844053172	F	06/12/2017	41,00	non	0	1	p1	
8844053187	F	14/01/2018	2,00	non	0	2	p2	
8844113390	F	06/02/2018	28,00	non	0	6	p6	
8844113387	M	27/01/2018	10,00	non	0	10	p10	
8844043225	F	27/01/2018	10,00	non	0	14	p14	

8844083265	F	02/07/2018	1,00	non	0	2	p2
8844083290	F	12/07/2018	19,00	non	0	1	p1
8844083296	F	31/08/2018	4,00	non	0	7	p7
8844083300	F	07/09/2018	25,00	non	0	1	p1
8844083308	F	04/10/2018	33,00	non	0	5	p5
8844083312	M	08/10/2018	29,00	non	0	5	p5
8844083320	F	10/11/2018	24,00	non	0	4	p4
8844083318	F	09/11/2018	25,00	non	0	4	p4
8844083330	F	13/12/2018	26,00	non	0	3	p3
8844083331	F	15/12/2018	24,00	non	0	1	p1
8844083332	F	23/12/2018	16,00	non	0	3	p3
8844083337	M	31/01/2019	33,00	non	0	1	p1

PLANS DES BATIMENTS D'ELEVAGE ET MOUVEMENTS DES ANIMAUX

1. ELEVAGE / G.HD



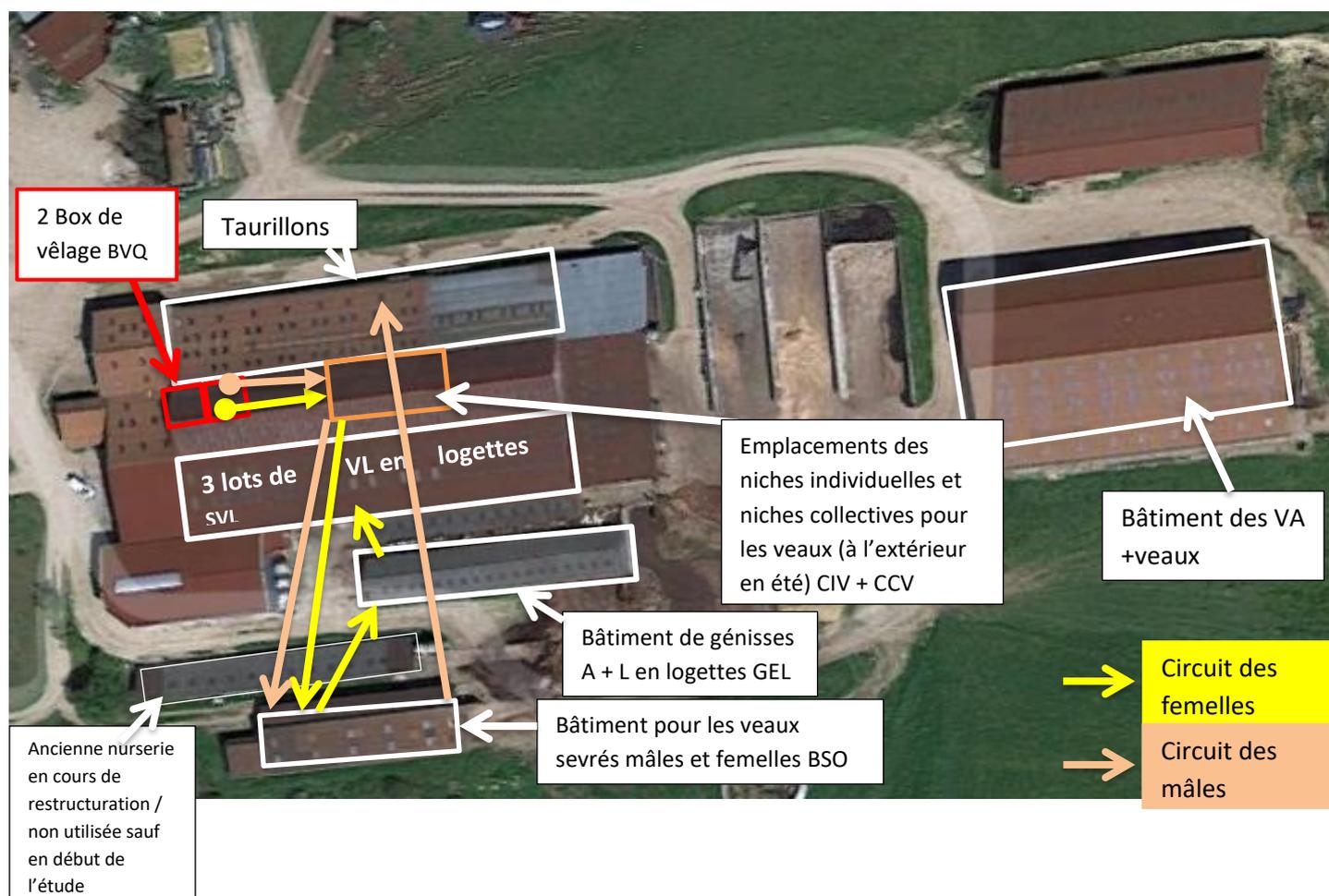
Codification des échantillons de prélèvements d'environnement :

- Box de vêlage des positives : BVP 1 + n° de la vache qui à vêlé si elle est dans l'étude
- Box de vêlage des négatives : BVN 1 + n° de la vache qui à vêlé si elle est dans l'étude
- Box de vaches tarées en logettes : BVT 1 + n° des animaux analysés dans l'étude
 - BVT1 / 2576-2601-2527-2495-
- Stabulation des VL : SVL 1, 2, 3 + n° des animaux analysés dans l'étude
 - 3 prélèvements SVL 1.2.3 dans le même gros lot / 2076-2432-2556

- Veaux à l'attache en logette : VAL + n° des animaux analysés dans l'étude / pas de possibilité de prélever : ce n'est quasiment que de la paille
- Veaux à l'attache en nurserie : VAN + n° des animaux analysés dans l'étude / pas de possibilité de prélever : ce n'est quasiment que de la paille (un veau prélevé VAN 1 (3332-3324-3330-3331))
- box en Nurserie : BEN 1, 2, 3.... n° des animaux analysés dans l'étude
 - BEN 1 / 3325-3313-3318
 - BEN2 / 3306 – 3295 – 3296
 - BEN 3 / 3319-3322 -3320
 - BEN 4 /3312-3307-3308

- génisses sevrés bâtiment en face des VL : GSL + n° des animaux analysés dans l'étude
 - MSL F1 /3253-
 - MSF F2 /3248-3253-3256
- mâles sevrés dans le bâtiment en face des VL : MSL n° des animaux analysés dans l'étude
 - MSL M1/3233-3231-3233
 - MSL M 2/3241-3238-3244-3245—3246-3249
- Génisses en bâtiment des taurillons (élèves) : GBT + n° des animaux analysés dans l'étude
 - GBT1 /3212-3225-3218-3222-3224

2. ELEVAGE / G.GR

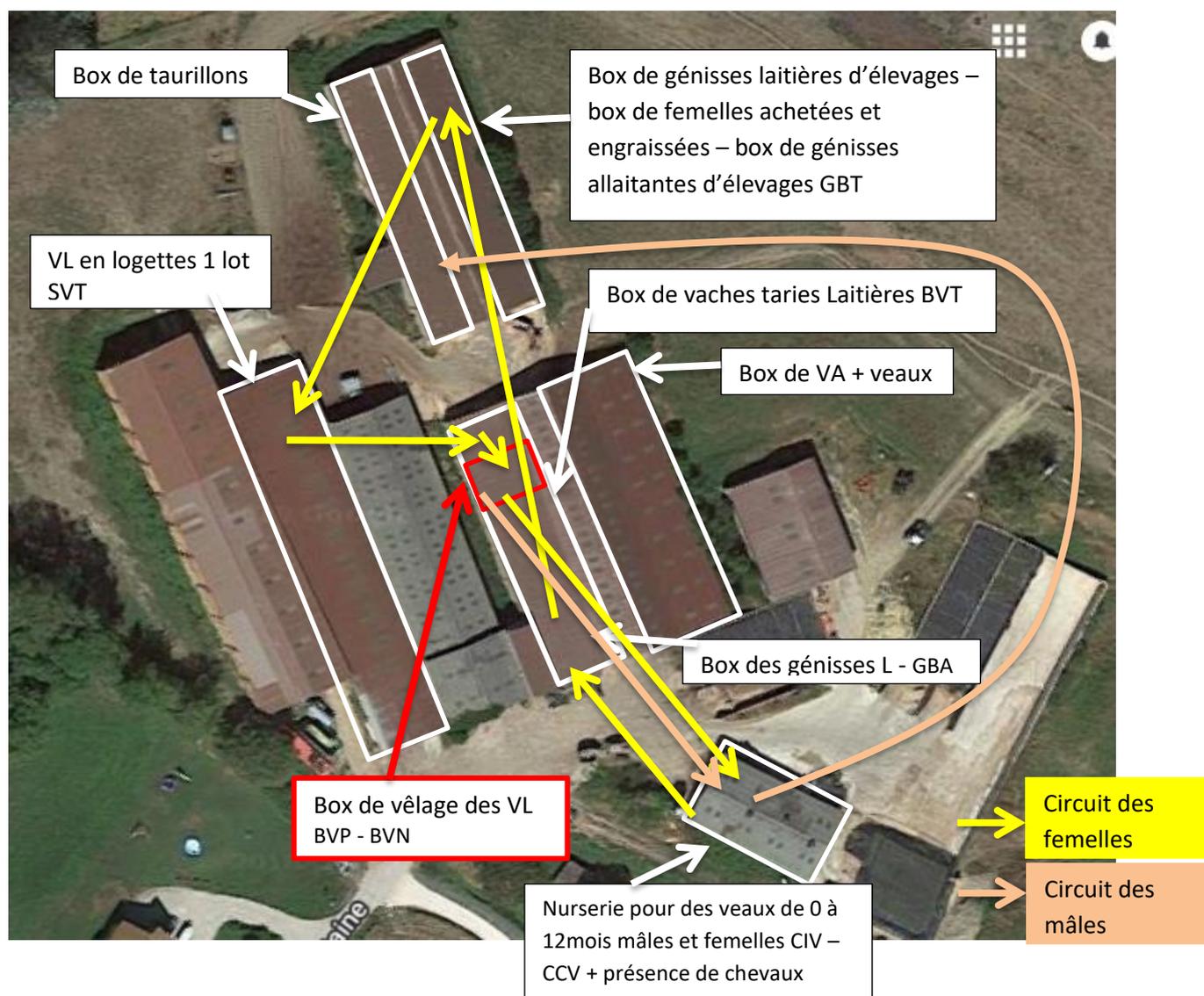


Codification des échantillons de prélèvements d'environnement :

- Box de vêlage des positives : BVP 1 + n° de la vache qui à vêlé si elle est dans l'étude
- Box de vêlage des négatives : BVN 1 + n° de la vache qui à vêlé si elle est dans l'étude
- Box de vêlage des toutes les vaches : BVQ + n° de la vache qui à vêlé si elle est dans l'étude
- Box de vaches tarées sur aire paillée : BVT 1 + n° des animaux analysés dans l'étude
- Stabulation des VL : SVL 1, 2, 3 + n° des animaux analysés dans l'étude
 - SVL 1 / LOT 1 -5400-5576-5688-5718-9621
 - SVL2 /LOT 2
 - SVL 3 / LOT DES VT AU BOUT DES VL
- Cases individuelles : CIV + n° des animaux analysés dans l'étude / non prélevé trop pailleux
- Cases collectives veaux non sevrés : CCV + n° des animaux analysés dans l'étude
 - CCV1 / 6174- 6189-6185
 - CCV2 / 6183 – 6179- 6181
 - CCV3 / 6175-6177-
- box des animaux sevrés bâtiment semi ouvert : BSO

- BSO 1-6050-6047-6048-6050
 - BSO 2-6064-6065-6067-6125-6135-6136-6138
 - BSO 3-6139-6144-6147-6148-6150-6151
-
- génisses en logettes (élèves) : GEL 1 et 2 + n° des animaux analysés dans l'étude (1 à x des plus jeunes aux plus âgées)
 - GEL1 / 6220-6230-6232

3. ELEVAGE / G.GF



Codification des échantillons de prélèvements d'environnement :

- Box de vêlage des positives : BVP 1 + n° de la vache qui à vêlé si elle est dans l'étude
- Box de vêlage des négatives : BVN 1 + n° de la vache qui à vêlé si elle est dans l'étude
- Box de vêlage des toutes les vaches : BVQ + n° de la vache qui à vêlé si elle est dans l'étude
- Box de vaches tarées sur aire paillée : BVT 1 + n° des animaux analysés dans l'étude / sert aussi de box de vêlage
 - BVT et BVP ou BVN :
- Stabulation des VL : SVL 1, 2, 3 + n° des animaux analysés dans l'étude
- Cases individuelles : CIV + n° des animaux analysés dans l'étude
- Cases collectives veaux non sevrés en nurserie : CCV + n° des animaux analysés dans l'étude
 - Box de la 3179
- génisses en box (élèves) en face des vaches allaitantes : GBA 1 et 2 + n° des animaux analysés dans l'étude
- génisses en box (élèves) en face des taurillons : GBT 1 et 2 + n° des animaux analysés dans l'étude

RESULTATS DES PRELEVEMENTS D'ENVIRONNEMENT

PRELEVEMENTS D'ENVIRONNEMENT JANVIER 2019					
Cheptel 88309007		ct		Remarques/Echantillon	Remarque analyse
			PCR MAP		
1	Box de la 3179		NEG		
2	Box de vèlage	26,37	POS	Liquide	
Cheptel 88460312					
			PCR MAP		
3	BVP		NEG		
4	SVL 1	35,13	POS	Liquide	
5	SVL 2	34,15	POS	Liquide	
6	SVL 3	36,07	POS	Liquide	
7	CCV1 6174 - 6189	34,96	POS	veaux Nég	
8	CCV2 6183-6179-6181		NEG	Maximum de paille/veaux Nég	
9	CCV3 6175-6177		NEG	Maximum de paille/veaux Nég	
10	GEL1 6048-6050-6230	37,89	POS	Liquide/ veaux POS	
11	BS01 6064		NEG	veau Nég	
12	BS02 6067-6147-6135		NEG	veaux Nég	
13	BS03		NEG	n° Veaux non indiqués	
Cheptel 88490008					
			PCR MAP		
14	BVP1	30,92	POS		
15	BVN1	34,71	POS		
16	BVT	30,83	POS		
17	SVL1	35,37	POS		IPC plus tardif mais valide
18	SVL2	31,08	POS		
19	SVL3	34,54	POS	Liquide	
20	BEN1 3325-3313		NEG	veaux POS	
21	BEN2 3306-3295-3296		NEG	2 veaux POS sur 3	
22	BEN3 3319-3322-3320	36,1	POS	1 veau POS sur 3	
23	BEN4 3312-3307-3308		NEG	veaux Nég	
24	VAN1 3332		NEG	Paille non souillée	
25	VAN2 3324		NEG	Maximum de paille	IPC plus tardif mais valide
26	MSL 3253 FEM	33,69	POS	veau POS	IPC plus tardif mais valide
27	MSL 3233 MALES	32,69	POS	Phage POS et excréteur récurrent	
28	MSL MALES	34,46	POS	Liquide	
29	MSL FEM	33,71	POS		
30	GBT1 FEM 3212-3225-3228	38,49	POS	Liquide/ 2 Phages POS et excréteurs/ 1 veau NEG	

Résultats des prélèvements d'environnement.

PRELEVEMENTS D'ENVIRONNEMENT JANVIER 2019 / PCR PARATUBERCULOSE								
Cheptel G.GF	Code ech	CT		Remarques/Echantillon	Remarque analyse	Remarques GDS	résultats sur les animaux prélevés le même jour que les prélèvements d'environnement	
			PCR MAP					
1	Box de la 3179		NEG			animal dans un box de la nurserie 3179 animal de 13 mois	3179 non excréteur mais pos en phage 4 mois avant	nurserie
2	Box de vêlage	26,37	POS	Liquide		box de vaches tarées et vêlages sur litière accumulée		Box de vêlage
Cheptel G.GR								
			PCR MAP					
3	BVP		NEG			box de vêlage en commun mères positives et négatives	nettoyé vidé fréquemment	Box de vêlage
4	SVL 1	35,13	POS	Liquide		lot 1 pour les vaches en logette (5400-5576-5688-5718-9621)	5400 pos, 5688 neg, 5576 neg, 5718 pos, 9621 neg	VL en logettes
5	SVL 2	34,15	POS	Liquide		lot 2 pour les vaches laitières en logettes		VL en logettes
6	SVL 3	36,07	POS	Liquide		lot des vaches tarées en logettes à côté des logettes des VL	pas de vêlage dans les logettes	VT logettes
7	CCV1 6174 - 6189	34,96	POS	veaux Nég		niches collectives pour les veaux 6174-6189-6185 - veaux de 15j à mois 1,5mois	6174 neg, 6189neg, 6185 neg.	nurserie
8	CCV2 6183-6179-6181		NEG	Maximum de paille/veaux Nég		niches collectives pour les veaux 6183-6179-6181 veaux de 1,5mois	6183 neg, 6179 neg, 6181 neg	nurserie

9	CCV3 6175- 6177		NEG	Maximum de paille/veaux Nég		niches collectives pour les veaux 6175-6177 veaux de 1,5 mois 2 mois	6175 neg, 6177 neg	nurserie
10	GEL1 6048- 6050- 6230	37,89	POS	Liquide/ veaux POS		génisses laitières en logettes : 6220-6230- 6232 génisses de 1 an	6230 pos en PCR, 6220 neg (mais pos avant), 6232 neg (aucun resultat pos),	élèves
11	BS01 6064		NEG	veau Nég		box des veaux sevrés bâtiment semi ouvert : 6050-6047(non prélevé)-6048-génisses de 1 an	6050 neg (res ante pos),6048 neg (res ante pos)	sevrés
12	BS02 6067- 6147- 6135		NEG	veaux Nég		box des veaux sevrés bâtiment semi ouvert : 6064-6065-6067-6125-6135-6136-6138 veaux de7 à 9 mois	6136 neg, 6167 neg, 6125 pos,	sevrés
13	BS03		NEG	n° Veaux non indiqués		box des veaux sevrés bâtiment semi ouvert : 6139-6144-6147-6148-6150-6151 veaux de 6 mois	6144 neg, 6148 neg, 6151 neg,	sevrés
Cheptel G. HD								
			PCR MAP					
14	BVP1	30,92	POS			box de vêlage destiné théoriquement aux positives à côté du box de vêlage des négatives		Box de vêlage
15	BVN1	34,71	POS			box de vêlage destiné théoriquement aux négatives à côté du box de vêlage des positives		Box de vêlage
16	BVT	30,83	POS			logettes des vaches tarées (2576-2601-2527- 2495) en face des VL	2576 pos, 2601neg, 2527 pos, 2495 pos	VT logettes

17	SVL1	35,37	POS		IPC plus tardif mais valide	stabulation des VL en logettes (2076-2432-2556)	2076 neg apres MB, 2432 neg apres MB, 2556 pos	VL en logettes
18	SVL2	31,08	POS			stabulation des VL en logettes (2076-2432-2556)		
19	SVL3	34,54	POS	Liquide		stabulation des VL en logettes (2076-2432-2556)		
20	BEN1 3325- 3313- 3318		NEG			box en nurserie : 3325-3313-3318	3325 neg, 3313 neg, 3318 neg	box de la nurserie
21	BEN2 3306- 3295- 3296		NEG			box en nurserie : 3306-3295-3296	3306 neg, 3295 neg, 3296 neg	
22	BEN3 3319- 3322- 3320	36,1	POS			box en nurserie : 3319-3322-3320,	3319 neg, 3322 pos, 3320 neg	
23	BEN4 3312- 3307- 3308		NEG			box en nurserie : 3312-3307-3308	33212 neg, 3307 neg, 3308 neg	
24	VAN1 3332		NEG	Paille souillée	non	veaux à l'attache en nurserie 3332	3332 neg	veaux aux mêmes endroits dans la nurserie
25	VAN2 3324		NEG	Maximum de paille	IPC plus tardif mais valide	veaux à l'attache en nurserie 3324	3324 neg	
26	MSL 3253 FEM	33,69	POS		IPC plus tardif mais valide	génisses sevrées en box collectif en face des logettes des VL (3253)	3253 neg	Elèves ces 4 box sont côte à côte- l'éleveur racle le devant des box

27	MSL 3233 MALES	32,69	POS		mâles sevrés en face des VL à côté des génisses (3233-3231-3233) animaux de 10 mois-11 mois	3233 neg, 3231 neg, 3233 neg (les 3 animaux étaient dans le même box depuis 3 mois au moins (le mois précédent les animaux excrétaient)	régulièrement
28	MSL MALES	34,46	POS	Liquide	mâles sevrés en face des VL à côté des génisses (3241-3238-3244-3245-3246-3249) animaux de 7-8 mois	3244 pos, 3241 pos, 3249neg, 3245 neg, 3246 neg, 3238 pos	
29	MSL FEM	33,71	POS		génisses sevrées en box collectif en face des logettes des VL (3248-3253-3256) 6-7 mois	3248 neg, 3253 neg 3256 neg	
30	GBT1 FEM 3212- 3225- 3228	38,49	POS	Liquide/	génisses dans le bâtiment des taurillons (élèves) : 3212-3225-3228-3222-3224 femelles de 12-14 mois	3212 pos, 3225 neg, 3228neg, 3222 neg, 3224 neg	Elèves

statut initiale des mères : les négatives étaient choisies parmi les négatives en sérologie et négatives en PCR sur bouse les positives devaient être excrétrices détectées par PCR sur bouse												
élevages	mères choisies initialement pour l'étude	résultats avant vêlage		résultats après vêlage (ou MB)				maintien du statut initial	changement de "statut" avt vêlage	changement de "statut" après vêlage		
		négatives	positives	parmi les négatives initiales et négatives avant vêlage	parmi les négatives initiales et positives avant vêlage	parmi les positives initiales et négatives avant	parmi les positives initiales et positives avant					
88460312	négatives	26	19	4	3 sans analyse	17	2	3	2	74%	17%	8%
	positives	11	4	7		1	2	1	5	45%	36%	9%
						1 VL morte						
88309007	négatives	1	1	0		1	0	0	0	100%	0%	0%
	positives	2	0	2		0	0	0	2	100%	0%	0%
88490008	négatives	22	14	8		8	7	2	5	36%	36%	5%
	positives	17	4	11	2 non analysés	5	1	2	5	29%	27%	12%
		79				1 NT				1 non analysées et 2 cas clinique dans les pos		
aucun résultat positif en sang Phage PCR sur les mères												

Liste des veaux analysés durant l'étude

N° barré = morts durant l'étude

Liste des 84 veaux analysés de novembre 2017 à mars 2019

La couleur de la colonne indique le « statut de la mère » : **rouge** pour mère positive, **orange** pour mère négative avec résultats positifs avant ou après vêlage, et **vert** pour mère statut négatif et résultats négatifs avant et après vêlage.

élevage HERDS	veau			âge premier prelevt en j	résultat positif veau couleur indique de la mère	Prélèvement positif x ème mois sur le sang (sg) sur les bouses (bs)	nbre de prélèvement positif	nbre de prélèvement	dernier prélèvement
	veau	sexe	date de naissance						
88460312	8844036231	M	09/01/2018	7,00	oui	p4sg	1	9	p9
88460312	8844036230	F	23/12/2017	24,00	oui	p8bs p12bs p13bs	3	15	p15
88460312	8844036221	M	12/12/2017	35,00	non		0	8	p8
88460312	8844036225	M	26/12/2017	mort	mort		0,00		
88460312	8844036229	M	03/01/2018	13,00	oui	p7bs	1	9	p9
88460312	8844036227	M	28/12/2017	mort	mort		0,00		
88460312	8844036232	F	23/12/2017	24,00	non		0	15	p15
88460312	8844076048	F	23/01/2018	14,00	oui	p10bs p11bs	2	14	p14
88460312	8844076050	F	23/01/2018	14,00	oui	p9bs p11bs	2	14	p14
88460312	8844076047	M	06/02/2018	0,00	non		0	9	p9
88460312	8844076052	F	25/01/2018	12,00	oui	p11bs	1	14	p14
88460312	8844076049	M	11/02/2018	23,00	non		0	6	p6
88460312	8844076046	F	14/01/2018	2,00	non		0	15	p15
88460312	veau mort né			mort	mort		0,00		

88460312	8844036220	F	11/12/2017	36,00	oui	p6bs p9bs p10bs p11bs p12bs p14bs	6	15	p15
88460312	8844076057	M	24/02/2018	10,00	non		0	8	p8
88460312	8844076064	F	12/04/2018	21,00	non		0	11	p11
88460312	8844076067	M	12/04/2018	21,00	non		0	9	p9
88460312	8844076143	M	05/07/2018	mort	mort		0,00		
88460312	8844076065	M	01/04/2018	2,00	non		0	7	p7
88460312	8844076136	F	27/06/2018	6,00	non		0	9	p9
88460312	8844076135	M	29/06/2018	4,00	non		0	7	p7
88460312	8844076147	M	04/07/2018	27,00	non		0	4	p4
88460312	veau mort né	-	-	-	mort	-	0,00	-	-
88460312	8844076139	M	01/07/2018	2,00	non		0	7	p7
88460312	8844076125	M	10/06/2018	23,00	oui	p4bs p7bs	2	7	p7
88460312	8844076138	F	29/06/2018	4,00	non		0	9	p9
88460312	8844076156	F	09/09/2018	23,00	non		0	1	p1
88460312	8844076141	M	03/07/2018	0,00	non		0	2	p2
88460312	8844076151	M	05/07/2018	26,00	non		0	6	p6
88460312	8844076144	F	10/07/2018	21,00	non		0	8	p8
88460312	8844076149	M	04/07/2018	mort	mort		0,00		
88460312	8844076148	F	28/07/2018	3,00	non		0	8	p8
88460312	8844076150	F	03/08/2018	32,00	non		0	7	p7
88460312	8844076175	M	11/11/2018	23,00	non		0	4	p4
88460312	8844076179	M	20/11/2018	14,00	non		0	4	p4
88460312	8844076181	M	22/11/2018	12,00	non		0	4	p4
88460312	8844076183	M	28/11/2018	6,00	non		0	4	p4
88460312	8844076177	M	17/11/2018	17,00	non		0	4	p4
88460312	8844076185	M	30/11/2018	4,00	non		0	4	p4
88460312	8844076174	F	23/12/2018	16,00	non		0	3	p3

88460312	8844076189	M	20/12/2018	19,00	non		0	3	p3
88460312	8844076180	F	04/01/2019	4,00	non		0	3	p3
88460312	8844076176	F	29/12/2018	10,00	non		0	3	p3
88460312	8844076178	F	02/01/2019	6,00	non		0	3	p3
88309007	8844053179	F	28/12/2017	19,00	oui	p9sg	1	15	p15
88309007	8844053172	F	06/12/2017	41,00	non		0	1	p1
88309007	8844053187	F	14/01/2018	2,00	non		0	2	p2
88309007	8844113390	F	06/02/2018	28,00	non		0	6	p6
88309007	8844113387	M	27/01/2018	10,00	non		0	10	p10
88490008	8844083233	M	05/03/2018	1,00	oui	p1sg p8bs p10bs	3	11	p11
88490008	8844043212	F	20/11/2017	15,00	oui	p1sg p11bs p13bs p14bs p15bs p16bs	6	16	p16
88490008	8844043224	F	25/01/2018	12,00	oui	p11bs p14bs	2	14	p14
88490008	8844043223	M	23/01/2018	14,00	oui	p1sg	1	1	p1
88490008	8844043225	F	27/01/2018	10,00	non		0	14	p14
88490008	8844043215	M	18/12/2017	29,00	oui	p1bs p6bs p8bs p9bs p10bs	5	11	p11
88490008	8844043222	F	18/01/2018	19,00	oui	p11bs	1	14	p14
88490008	8844043217	M	30/12/2017	17,00	oui	p5bs	1	11	p11
88490008	8844043230	F	23/02/2018	11,00	oui	p9bs p10bs p13bs	3	13	p13
88490008	8844083231	M	25/02/2018	9,00	oui	p6sg p9sg p10bs	3	11	p11
88490008	8844043228	F	13/02/2018	21,00	oui	p10bs	1	13	p13
88490008	8844083237	M	07/04/2018	veau mort-né	mort				
88490008	8844083241	M	10/05/2018	26,00	oui	p7bs p8bs	2	8	p8
88490008	8844083249	M	04/06/2018	1,00	oui	p7bs	1	8	p8
88490008	8844083245	M	13/05/2018	23,00	oui	p7bs	1	8	p8
88490008	8844083244	M	13/05/2018	23,00	oui	p7bs	1	8	p8
88490008	8844083238	M	28/04/2018	5,00	oui	p1bs+p5bs+p6bs+p7bs+p8bs p9bs	6	9	p9

88490008	8844083246	M	20/05/2018	16,00	oui	p7bs	1	8	p8
88490008	8844083248	F	04/06/2018	1,00	oui	p2sg p7bs p10bs	3	10	p10
88490008	8844083265	F	02/07/2018	1,00	non		0	2	p2
88490008	8844083256	F	20/06/2018	13,00	oui	p6bs	1	9	p9
88490008	8844083259	M	24/06/2018	mort	mort				
88490008	8844083253	F	12/06/2018	21,00	oui	p4bs	1	9	p9
88490008	8844083290	F	12/07/2018	19,00	non		0	1	p1
88490008	8844083296	F	31/08/2018	4,00	non		0	7	p7
88490008	8844083295	F	29/08/2018	6,00	oui	p4bs p9bs	2	7	p7
88490008	8844083300	F	07/09/2018	25,00	non		0	1	p1
88490008	8844083306	F	23/09/2018	9,00	oui	p2bs	1	6	p6
88490008	8844083308	F	04/10/2018	33,00	non		0	5	p5
88490008	8844083307	F	03/10/2018	34,00	oui	p5bs	1	5	p5
88490008	8844083312	M	08/10/2018	29,00	non		0	5	p5
88490008	8844083313	M	09/10/2018	28,00	oui	p2bs	1	5	p5
88490008	8844083320	F	10/11/2018	24,00	non		0	4	p4
88490008	8844083319	F	09/11/2018	25,00	oui	p4bs	1	4	p4
88490008	8844083318	F	09/11/2018	25,00	non		0	4	p4
88490008	8844083325	F	24/11/2018	10,00	oui	p1bs	1	4	p4
88490008	8844083324	F	21/11/2018	13,00	oui	p1bs	1	4	p4
88490008	8844083322	F	12/11/2018	22,00	oui	p2bs	1	4	p4
88490008	8844083330	F	13/12/2018	26,00	non		0	3	p3
88490008	8844083331	F	15/12/2018	24,00	non		0	1	p1
88490008	8844083328		veau mort		mort				
88490008	8844083332	F	23/12/2018	16,00	non		0	3	p3
88490008	8844083337	M	31/01/2019	33,00	non		0	1	p1

Cout de l'étude : 73 900€

	Nbre sérologie	Nbre de PCR ind bouse	Nbre de PCR	Nbre de PCR sang Phage	PCR environnement	Temps passé – nbre de visite	montant
laboratoire	363 – 6€	50+600 – 25€	238/5 – 40€	600 – 50€	30 – 25€		51 082
Vétérinaire	363 * 2,17			600 *2,17		Nbre 20 * 2 cabinets * 43€	3 810
Journées GDS						50jours - km	19 000
Journées éleveurs						16 ½ journées	

--

Schéma des prélèvements réalisés

Prélèvements des mères le mois précédent la mise bas : sang et bouse

Prélèvements des mères le mois après la mise bas : sang et bouse

Sur sang usage de tube hépariné de sodium pour PHAGE PCR + sur bouse : PCR classique



Mère positive et excrétrice / sang ELISA et positive en PCR sur bouse
Mère négative non excrétrice / négative en sang ELISA et PCR sur bouse

Veaux de vaches positives et négatives

Vêlage

Prélèvement des veaux le mois après leur naissance : sang et fèces

Prélèvement des veaux le 2^{ème} mois après leur naissance : sang et fèces

Prélèvement des veaux le 3^{ème} mois après leur naissance : sang et fèces

Prélèvement des veaux le 4^{ème} mois après leur naissance : sang et fèces

Prélèvement des veaux le 5^{ème} et suivant mois après leur naissance : sang et fèces

Recherche /PHAGE PCR sur sang (tube hépariné de sodium) et sur fèces : PCR classique et Phage PCR (arrêtée le 16/1/18)

Loi de Khi-deux

Le tableau donne x tel que $P(K > x) = p$

p	0,999	0,995	0,99	0,98	0,95	0,9	0,8	0,2	0,1	0,05	0,02	0,01	0,005	0,001
ddl														
1	0,0000	0,0000	0,0002	0,0006	0,0039	0,0158	0,0642	1,6424	2,7055	3,8415	5,4119	6,6349	7,8794	10,8276
2	0,0020	0,0100	0,0201	0,0404	0,1026	0,2107	0,4463	3,2189	4,6052	5,9915	7,8240	9,2103	10,5966	13,8155
3	0,0243	0,0717	0,1148	0,1848	0,3518	0,5844	1,0052	4,6416	6,2514	7,8147	9,8374	11,3449	12,8382	16,2662
4	0,0908	0,2070	0,2971	0,4294	0,7107	1,0636	1,6488	5,9886	7,7794	9,4877	11,6678	13,2767	14,8603	18,4668
5	0,2102	0,4117	0,5543	0,7519	1,1455	1,6103	2,3425	7,2893	9,2364	11,0705	13,3882	15,0863	16,7496	20,5150
6	0,3811	0,6757	0,8721	1,1344	1,6354	2,2041	3,0701	8,5581	10,6446	12,5916	15,0332	16,8119	18,5476	22,4577
7	0,5985	0,9893	1,2390	1,5643	2,1673	2,8331	3,8223	9,8032	12,0170	14,0671	16,6224	18,4753	20,2777	24,3219
8	0,8571	1,3444	1,6465	2,0325	2,7326	3,4895	4,5936	11,0301	13,3616	15,5073	18,1682	20,0902	21,9550	26,1245
9	1,1519	1,7349	2,0879	2,5324	3,3251	4,1682	5,3801	12,2421	14,6837	16,9190	19,6790	21,6660	23,5894	27,8772
10	1,4787	2,1559	2,5582	3,0591	3,9403	4,8652	6,1791	13,4420	15,9872	18,3070	21,1608	23,2093	25,1882	29,5883
11	1,8339	2,6032	3,0535	3,6087	4,5748	5,5778	6,9887	14,6314	17,2750	19,6751	22,6179	24,7250	26,7568	31,2641
12	2,2142	3,0738	3,5706	4,1783	5,2260	6,3038	7,8073	15,8120	18,5493	21,0261	24,0540	26,2170	28,2995	32,9095
13	2,6172	3,5650	4,1069	4,7654	5,8919	7,0415	8,6339	16,9848	19,8119	22,3620	25,4715	27,6882	29,8195	34,5282
14	3,0407	4,0747	4,6604	5,3682	6,5706	7,7895	9,4673	18,1508	21,0641	23,6848	26,8728	29,1412	31,3193	36,1233
15	3,4827	4,6009	5,2293	5,9849	7,2609	8,5468	10,3070	19,3107	22,3071	24,9958	28,2595	30,5779	32,8013	37,6973
16	3,9416	5,1422	5,8122	6,6142	7,9616	9,3122	11,1521	20,4651	23,5418	26,2962	29,6332	31,9999	34,2672	39,2524
17	4,4161	5,6972	6,4078	7,2550	8,6718	10,0852	12,0023	21,6146	24,7690	27,5871	30,9950	33,4087	35,7185	40,7902
18	4,9048	6,2648	7,0149	7,9062	9,3905	10,8649	12,8570	22,7595	25,9894	28,8693	32,3462	34,8053	37,1565	42,3124
19	5,4068	6,8440	7,6327	8,5670	10,1170	11,6509	13,7158	23,9004	27,2036	30,1435	33,6874	36,1909	38,5823	43,8202
20	5,9210	7,4338	8,2604	9,2367	10,8508	12,4426	14,5784	25,0375	28,4120	31,4104	35,0196	37,5662	39,9968	45,3147
21	6,4467	8,0337	8,8972	9,9146	11,5913	13,2396	15,4446	26,1711	29,6151	32,6706	36,3434	38,9322	41,4011	46,7970
22	6,9830	8,6427	9,5425	10,6000	12,3380	14,0415	16,3140	27,3015	30,8133	33,9244	37,6595	40,2894	42,7957	48,2679
23	7,5292	9,2604	10,1957	11,2926	13,0905	14,8480	17,1865	28,4288	32,0069	35,1725	38,9683	41,6384	44,1813	49,7282
24	8,0849	9,8862	10,8564	11,9918	13,8484	15,6587	18,0618	29,5533	33,1962	36,4150	40,2704	42,9798	45,5585	51,1786
25	8,6493	10,5197	11,5240	12,6973	14,6114	16,4734	18,9398	30,6752	34,3816	37,6525	41,5661	44,3141	46,9279	52,6197
26	9,2221	11,1602	12,1981	13,4086	15,3792	17,2919	19,8202	31,7946	35,5632	38,8851	42,8558	45,6417	48,2899	54,0520
27	9,8028	11,8076	12,8785	14,1254	16,1514	18,1139	20,7030	32,9117	36,7412	40,1133	44,1400	46,9629	49,6449	55,4760
28	10,3909	12,4613	13,5647	14,8475	16,9279	18,9392	21,5880	34,0266	37,9159	41,3371	45,4188	48,2782	50,9934	56,8923
29	10,9861	13,1211	14,2565	15,5745	17,7084	19,7677	22,4751	35,1394	39,0875	42,5570	46,6927	49,5879	52,3356	58,3012
30	11,5880	13,7867	14,9535	16,3062	18,4927	20,5992	23,3641	36,2502	40,2560	43,7730	47,9618	50,8922	53,6720	59,7031
40	17,9164	20,7065	22,1643	23,8376	26,5093	29,0505	32,3450	47,2685	51,8051	55,7585	60,4361	63,6907	66,7660	73,4020
50	24,6739	27,9907	29,7067	31,6639	34,7643	37,6886	41,4492	58,1638	63,1671	67,5048	72,6133	76,1539	79,4900	86,6608
60	31,7383	35,5345	37,4849	39,6994	43,1880	46,4589	50,6406	68,9721	74,3970	79,0819	84,5799	88,3794	91,9517	99,6072
70	39,0364	43,2752	45,4417	47,8934	51,7393	55,3289	59,8978	79,7146	85,5270	90,5312	96,3875	100,4252	104,2149	112,3169
80	46,5199	51,1719	53,5401	56,2128	60,3915	64,2778	69,2069	90,4053	96,5782	101,8795	108,0693	112,3288	116,3211	124,8392
90	54,1552	59,1963	61,7541	64,6347	69,1260	73,2911	78,5584	101,0537	107,5650	113,1453	119,6485	124,1163	128,2989	137,2084
100	61,9179	67,3276	70,0649	73,1422	77,9295	82,3581	87,9453	111,6667	118,4980	124,3421	131,1417	135,8067	140,1695	149,4493
120	77,7551	83,8516	86,9233	90,3667	95,7046	100,6236	106,8056	132,8063	140,2326	146,5674	153,9182	158,9502	163,6482	173,6174
140	93,9256	100,6548	104,0344	107,8149	113,6593	119,0293	125,7581	153,8537	161,8270	168,6130	176,4709	181,8403	186,8468	197,4508
160	110,3603	117,6793	121,3456	125,4400	131,7561	137,5457	144,7834	174,8283	183,3106	190,5165	198,8464	204,5301	209,8239	221,0190
180	127,0111	134,8844	138,8204	143,2096	149,9688	156,1526	163,8682	195,7434	204,7037	212,3039	221,0772	227,0561	232,6198	244,3705
200	143,8428	152,2410	156,4320	161,1003	168,2786	174,8353	183,0028	216,6088	226,0210	233,9943	243,1869	249,4451	255,2642	267,5405
250	186,5541	196,1606	200,9386	206,2490	214,3916	221,8059	231,0128	268,5986	279,0504	287,8815	298,0388	304,9396	311,3462	324,8324
300	229,9634	240,6634	245,9725	251,8637	260,8781	269,0679	279,2143	320,3971	331,7885	341,3951	352,4246	359,9064	366,8444	381,4252
400	318,2596	330,9028	337,1553	344,0781	354,6410	364,2074	376,0218	423,5895	436,6490	447,6325	460,2108	468,7245	476,6064	493,1318
500	407,9470	422,3034	429,3875	437,2194	449,1468	459,9261	473,2099	526,4014	540,9303	553,1268	567,0698	576,4928	585,2066	603,4460
600	498,6229	514,5289	522,3651	531,0191	544,1801	556,0560	570,6680	628,9433	644,8004	658,0936	673,2703	683,5156	692,9816	712,7712
700	590,0480	607,3795	615,9075	625,3175	639,6130	652,4973	668,3308	731,2805	748,3591	762,6607	778,9721	789,9735	800,1314	821,3468
800	682,0665	700,7250	709,8969	720,0107	735,3623	749,1852	766,1555	833,4557	851,6712	866,9114	884,2789	895,9843	906,7862	929,3289
900	774,5698	794,4750	804,2517	815,0267	831,3702	846,0746	864,1125	935,4987	954,7819	970,9036	989,2631	1001,6296	1013,0364	1036,8260