

METHANISATION ET PARATUBERCULOSE (ET FQ)

QUEL RISQUE POUR LA SANTE ANIMALE ?

Auteure : Carine HAAS GDS 88

- Etude gérée et financée par le GDS 88
- En collaboration avec l'ensemble de 12 élevages comprenant les 3 méthanisations en cours de fonctionnement dans les Vosges.
- Etude et prélèvements réalisés entre octobre 2014 et septembre 2015 par Carine HAAS conseillère en Santé animale au GDS 88
- Etude complémentaire en juin 2017 sans congélation des prélèvements / p41

L'avant - projet de l'étude a été envoyé en avril 2015 à la FNGDS pour information

I. Introduction :

Les méthanisations collectives et individuelles se développent à grandes vitesses dans l'ensemble des départements.

Seules les **méthanisations collectives** pourraient présenter un risque, pour le moment, non connu et différent de ce qui existait avant ces systèmes. Les risques potentiels sont liés à l'épandage de ces digestats à l'origine de mélange d'effluents issus de plusieurs exploitations.

Les projets de méthanisation collectives en cours, sont nombreux. Pour les Vosges, trois sont en fonction.

En fonction du type de digestion anaérobie (DA) choisie pour la méthanisation à des pH voisins de la neutralité (6.8-8.5) :

- 1. Digestion anaérobie mésophiles : 20 à 45 °C avec un optimum de 35°C**
- 2. Digestion anaérobie thermophiles : de 45 à 65 °C avec un optimum de 55 °C,**

les conséquences sur la réduction de 90 % d'agents pathogènes peuvent être très variables.

En effet, la DA thermophiles peut détruire 90 % des bactéries en quelques heures, alors qu'avec une DA mésophiles cela peut être de plusieurs jours à plusieurs mois en fonction des microorganismes étudiés !

- ✓ *La DA thermophiles n'a pas d'impact sur les bactéries sporulées (Clostridium)*
- ✓ *La DA mésophile n'a pas d'impact sur les nématodes et réduit de 10^2 (un peu) la concentration bactérienne en E Coli, entérobactéries, streptocoques et coliformes.*
- ✓ *Seule la pasteurisation avant ou après la DA peut réduire les Mycobactéries (bactéries non sporulées) : 11.7 secondes à 71 °C (ces données peuvent varier).*
- ✓ *Le stockage aérobie du digestat après DA pendant 2.5 mois peut limiter la présence de certaines bactéries par l'augmentation de la température et l'augmentation du PH (ammoniac) sauf pour les bactéries sporulées. Le Compostage du digestat serait encore la meilleure solution !!!*

Source : ADEME (agence de l'environnement et de maîtrise de l'énergie)

La réglementation prévoit déjà des normes sur l'épandage de digestat pour des bactéries, virus ou parasites suivants :

- ✓ Salmonella
- ✓ Entérovirus

- ✓ Œuf d'Helminthe
- ✓ Entérocoquaceae ou E coli

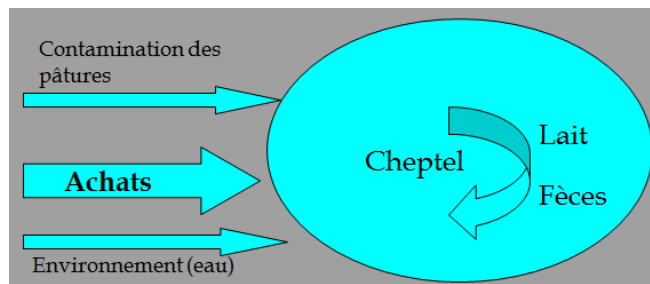
Rien pour l'instant n'a été étudié sur la bactérie paratuberculosis ni sur la Fièvre FQ. Des suppositions circulent seulement.

Les méthanisations collectives mises en place dans les Vosges sont de type « **Digestion anaérobie mésophile : 20 à 45 °C** » (source *Chambre d'agriculture des Vosges Damien Lhuillier*)

Pour l'instant, nous visons de travailler sur l'existant et donc dans les 3 méthanisations qui fonctionnent actuellement.

II. Pourquoi soulever l'hypothèse d'un risque ?

L'association de plusieurs exploitations dans la mise en place d'un projet de méthanisation et ensuite l'épandage du digestat dans ces différentes exploitations pourraient être à l'origine de contamination animale pour certaines exploitations non touchées au départ, à condition que la bactérie mycobactérium paratuberculosis résiste à la digestion. Cependant, rien n'est sûr !



La bactérie qui nous interpelle en particulier est très résistante au traitement chimique, au froid, mais peut être détruite par pasteurisation ou compostage.

Cette mycobactérie paratuberculosis, peut vivre au sein de biofilms (dans les systèmes d'abreuvement principalement) ce qui la rend encore plus résistante dans l'environnement. Elle fait partie de la même famille que la bactérie responsable de la tuberculose.

D'autres bactéries seraient potentiellement résistantes à la fermentation et à la « digestion » dans les certains types de digestats: salmonelle, listéria, et aussi **coxiella burnettii (FQ)**...

Questions qui restent à éclaircir :

- Quels sont les risques liés à l'épandage de digestat issu d'effluent de plusieurs exploitations, sur la santé animale (paratuberculose et FQ)? Reformulation : Est-ce qu'un animal pâturant sur

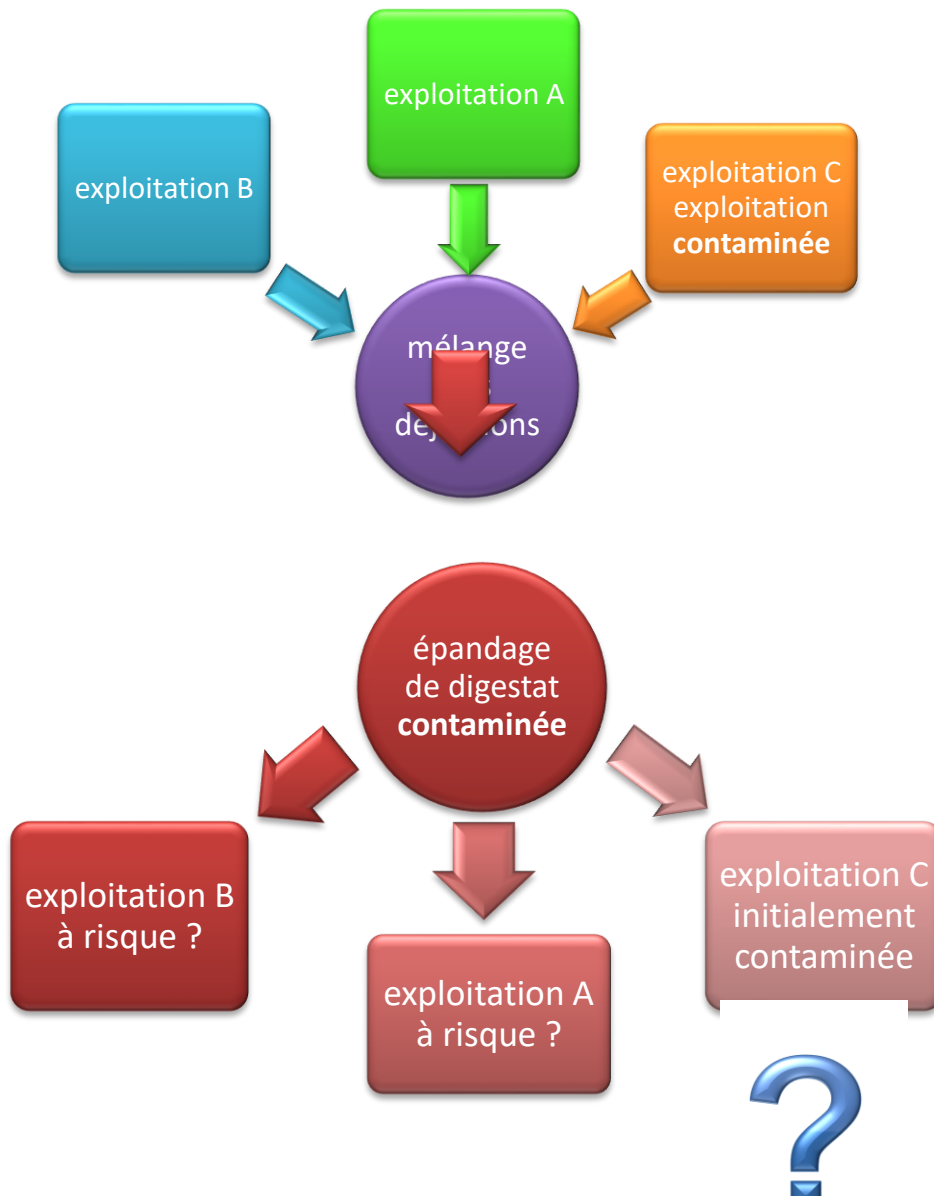
une parcelle où un digestat a été épandu, risque de se contaminer en paratuberculose (ou en fièvre Q) ?

NB : un animal surtout jeune, peut se contaminer en absorbant des mycobactéries vivantes présentes dans son environnement (Dr J. Vialard)

- Quelles sont les bactéries pouvant résister à la digestion ? et que faire ?

Au vu des informations déjà disponibles sur la présence possible de la mycobactérie paratuberculosis après digestion anaérobie, et en fonction du type de digestion mise en place pour la méthanisation, le GDS propose un protocole qui permettrait de connaître et potentiellement de prévoir les risques possibles de contamination de nouvelles exploitations par l'épandage dans les prairies ou parcelles fauchées de digestat porteur (ou pas) de mycobactéries. Le risque de contaminer des jeunes animaux à partir de cet épandage pourrait ne pas être négligeable. Cette étude permettra de nous éclairer.

Schéma de situation et problématique induite



III. Objectif de cette étude :

Cette étude va essayer d'évaluer s'il existe des risques potentiels de contamination en paratuberculose (et en FQ) d'élevage naïf, liés à l'épandage de digestat issu d'un mélange d'effluents dont certains proviennent d'élevages positifs.

Si après mise en culture de digestat positif en PCR, la mycobactérie est toujours détectée vivante, alors il y a un risque potentiel pour la santé des animaux.

IV. Matériels et méthode

Le matériel et les méthodes choisis pour cette étude sont principalement issus d'une thèse vétérinaire de M. MAURICEAU citée en ANNEXE, sur le diagnostic de la paratuberculose afin d'avoir des résultats fiables à coût maîtrisé et limité. Ils sont schématisés ci-après.

Les prélèvements d'environnement effectués ont suivi une méthodologie (expliquée en annexe) en élevage.

Les techniques d'analyses choisies permettent de répondre aux questions :

1. Quels sont les élevages contaminés produisant des effluents pour le méthaniseur ?
Par contre ces techniques ne permettent pas de connaître la prévalence animale dans ces élevages touchés.

Un élevage sera considéré comme contaminé lors qu'au moins un résultat par PCR d'environnement sera retrouvé positif.

Ces informations n'ont pas l'objectif d'évaluer la prévalence animale de ces élevages. Seule une analyse individuelle de l'ensemble des animaux de plus de 24 mois pourrait être en mesure de répondre à cette demande. Par contre, il est possible de mettre en évidence des variations de niveau d'infection grâce à cette technique de prélèvements d'environnements (voir thèse Mauriceau).

2. Est-ce que les bactéries sont toujours vivantes suite à la digestion et donc potentiellement infectieuses ?

Cela nécessite une recherche en deux étapes :

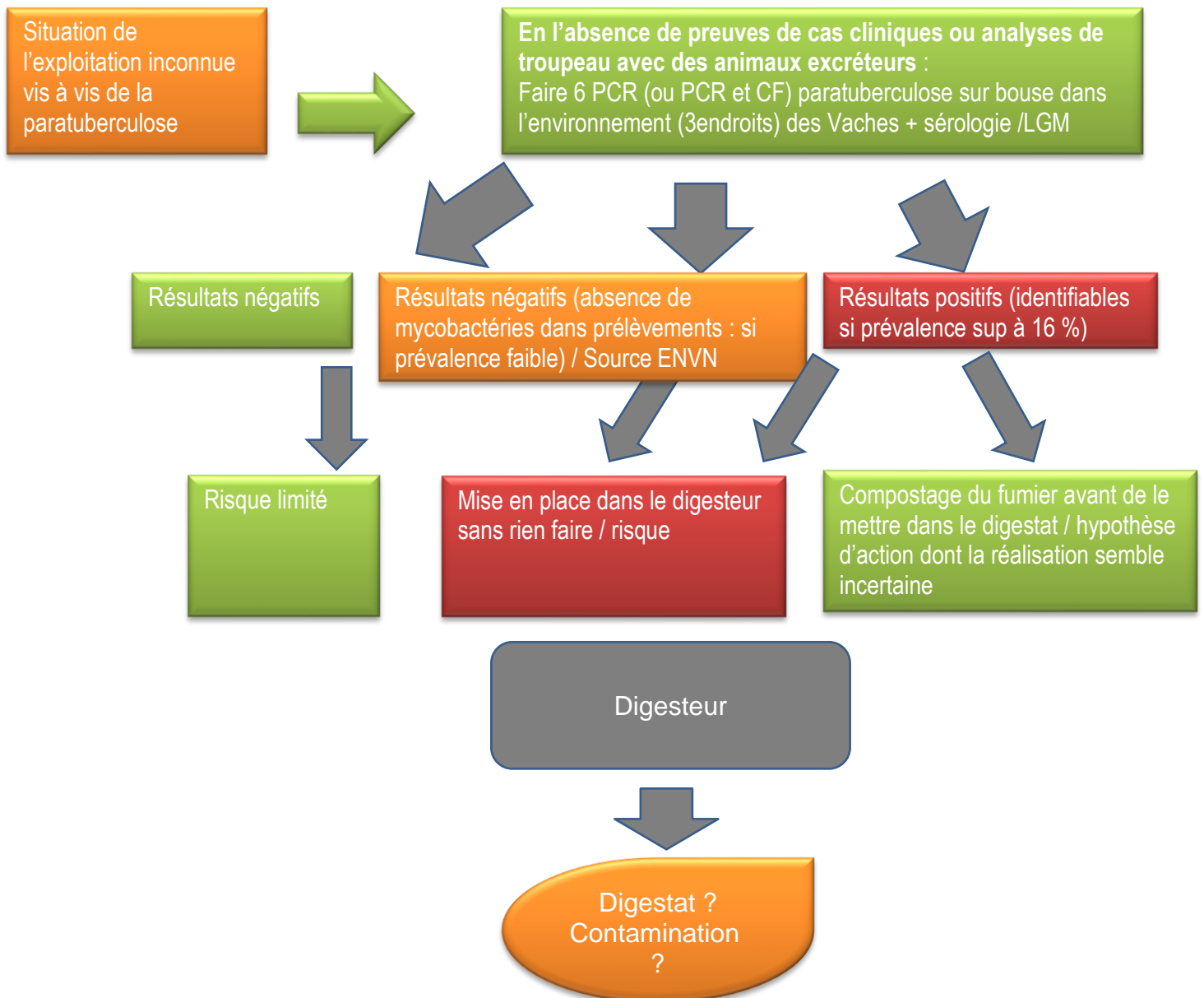
- ⇒ 1^{ère} étape : Mise en évidence du matériel génétique de la mycobactérie par PCR : bactérie vivante et morte
- ⇒ 2^{ème} étape : Mise en culture de la mycobactérie pour les résultats positifs en PCR, afin de mettre en évidence de la bactérie vivante et donc potentiellement infectieuse.

Culture de *Mycobacterium avium* subsp est le test de diagnostic définitif pour la maladie de Johne, une entéropathie chronique granulomateuse des animaux. Par rapport aux milieux solides, l'identification de toutes les souches de l'organisme dans un milieu liquide peut être plus difficile parce que l'aspect des colonies et mycobactin dépendance ne sont pas observables, et le développement d'autres organismes doit être distingué, communément par PCR.

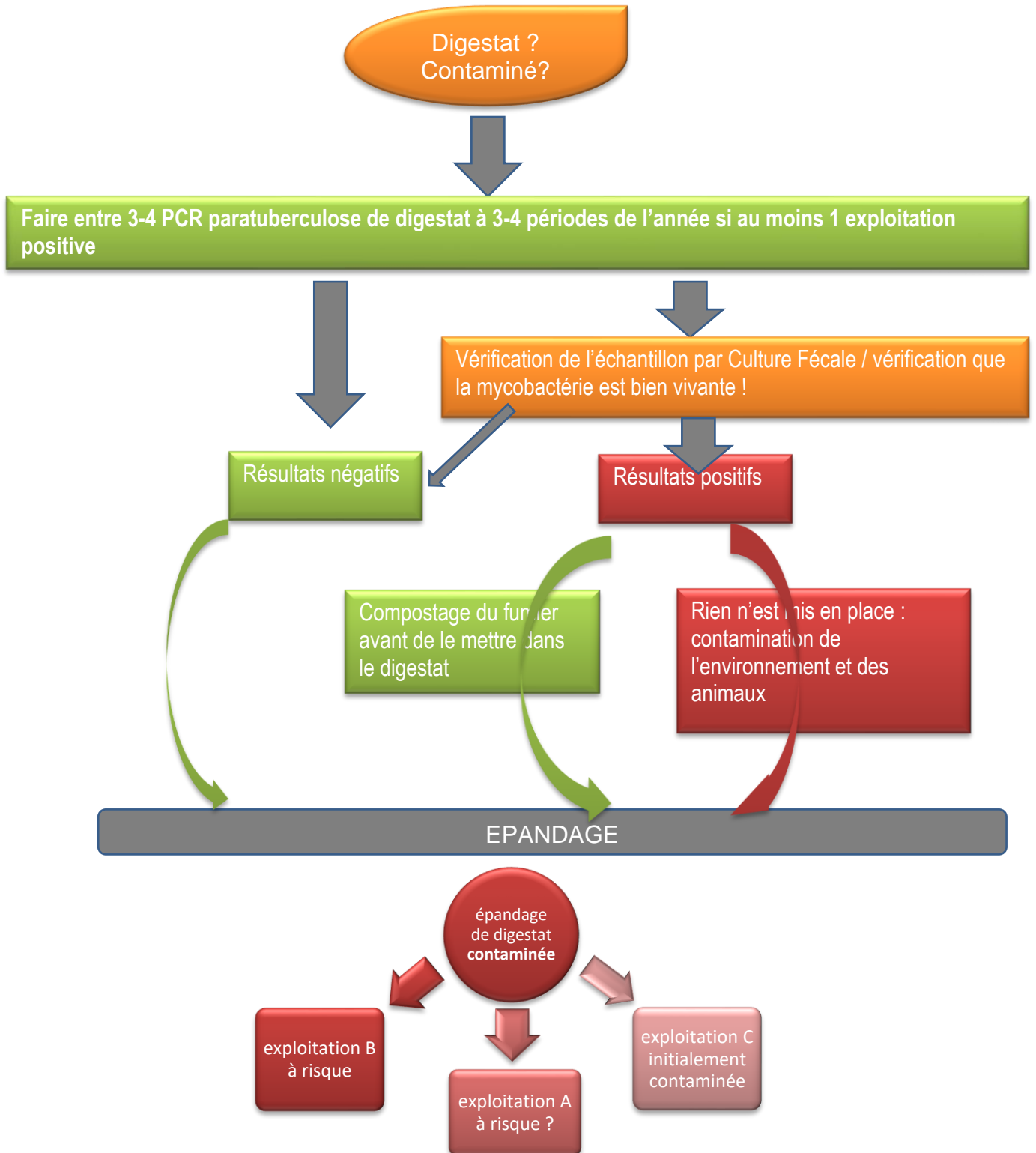
La croissance des micro-organismes non pertinents a confondu l'identification de *M. avium* sous-espèce paratuberculosis dans des cultures liquides en inhibant l'IS900 PCR et en culture en milieu solide par inhibition de la croissance de *M. avium* subsp ou masquer des colonies. La contamination des échantillons a été concentrée dans certaines observations de laboratoire et a été réduite en incluant ampicilline dans milieu Bactec sans affecter les chances d'isolement de *M. avium* subsp. Le taux de contamination à long terme pour les cultures de selles était d'environ 7 %, et que pour les cultures de tissus était < 0.2 %. Milieu liquide est plus sensible que la culture en milieu solide pour *M. avium* subsp. (thèse B. Harris)

Que faire pour savoir si le risque de contamination en paratuberculose existe ?

EN AMONT DANS LES EXPLOITATIONS : identifier des exploitations à risque (en faisant des recherches par exploitation à l'aide d'analyse d'environnement afin de savoir si l'élevage présente un risque d'excrétion de cette mycobactérie).



EN AVAL / IDENTIFICATION DES DIGESTATS issus de mélange de troupeaux avec présence de mycobactéries identifiées



Collecte des informations :

⇒ **Types d'exploitations prélevées :**

2 élevages
allaitants

3 élevages
laitiers

7 élevages
mixtes

⇒ **Matériel collecté :**

Dates de prélèvements de l'ensemble des échantillons : les 19 et 21 mai 2015

Date de réception des derniers résultats : 25 septembre 2015

Parmi les 12 exploitations concernées par l'étude, toutes ont eu des prélèvements :

- Lait LGM / élevage laitier
- fumier
- litière
- raclage

Pour connaître les détails de la méthode utilisée pour réaliser les prélèvements : voir page 25 en annexe

Ces échantillons d'un volume de 20ml ont été prélevés dans l'environnement des animaux reproducteurs des troupeaux laitiers et des troupeaux allaitants dans la mesure du possible (quand le fumier était encore présent). Le protocole de prélèvements d'environnement mis en place a été établi suivant la *thèse de Clément Michel Mauriceau* (protocole en ANNEXE). Pour les laitiers, en plus des prélèvements d'environnement, un prélèvement de lait de tank a été réalisé en vue de réaliser une sérologie paratuberculose.

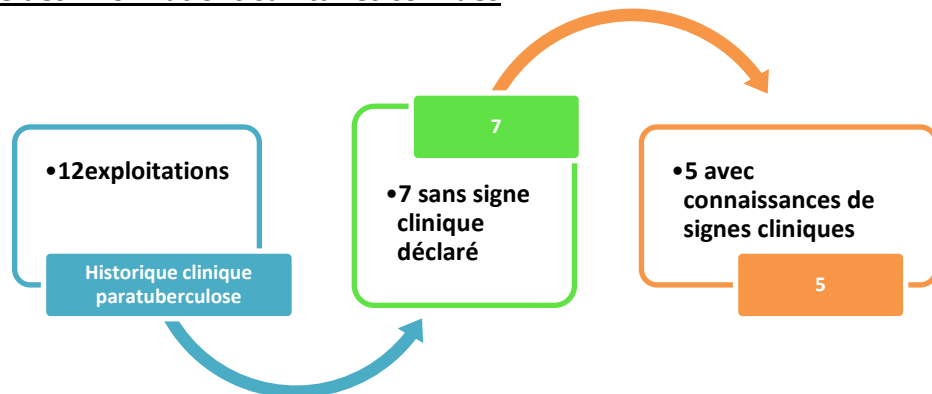
En ce qui concerne les digestats, ils ont été prélevés en l'état directement dans la fosse ou dans un tas : soit sous forme liquide ou sous forme solide. Le volume prélevé est de 20 ml de digestat. Ces digestats étant régulièrement brassés et homogénéisés, multiplier le nombre de prélèvements n'a pas été nécessaire : soit 2 échantillons par types (et non pas 3-4 comme prévu).

Les prélèvements de lait, de bouse d'environnement et de digestats ont tous été effectués dans l'ensemble des élevages la même semaine. Ils ont été acheminés au LVD dans la journée de la prise d'échantillons, codifiés et anonymés. Les échantillons de lait en vue d'analyses sérologiques paratuberculose n'ont pas été congelés mais ont été analysés

dans la semaine. Par contre, l'ensemble des prélèvements d'environnement (fumier, bouse, lisier et digestats) ont été conditionnés en vue des analyses à effectuer et congelés directement au laboratoire vétérinaire 88.

V. Résultats des prélèvements :

Historique des informations sanitaires connues



Résultats :

10 prélèvements de lait de tank ont été analysés en sérologie paratuberculose :

- 1 positif sur 10 exploitations produisant du lait.

73 prélèvements d'environnement ont été analysés en PCR paratuberculose / matières fécales au LVD :

- 47 PCR négatives
- 1 ininterprétable
- 25 PCR positives

Parmi les 9 digestats analysés, 7 positifs ont été envoyés au LABOCEA à Quimper pour une mise en culture liquide pendant 42 jours et confirmées par 2 PCR différentes. Ce procédé a été établi pour voir si la mycobactérie détectée était toujours vivante après passage dans un méthaniseur. Si la bactérie est retrouvée morte, elle n'est alors pas infectieuse.

NB : La mise en culture permet la croissance mycobactérienne : si l'inoculum de départ (digestat) est positif (contient de l'ADN mycobactérien) alors le résultat de la culture après 42 jours permet de vérifier sa présence vivante (mais elle ne sera pas en plus grand nombre).

Nous ne connaissons pas la dose nécessaire à la contamination d'un animal si ce n'est qu'un gramme de bouse infectée contamine 1 veau (Dr Jacquemine VIALARD).

D'après J. VIALARD: 10 000 germes semblent suffisant pour contaminer un veau.
 Les équivalences /

- 1g de fèces d'un bovin clinique = 106 germes par gramme et
- d'un bovin excréteur positif en culture = 102 germes par gramme de fèces.

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

Parmi les prélèvements d'environnement :



En élevages mixtes, 3 seulement ont fait l'objet de prélèvements dans les deux troupeaux :

Résultats des prélèvements d'environnements pos/total

Cheptels mixtes	TROUPEAU LAITIER	TROUPEAU ALLAITANT
F	4/4	0/3
I	4/4	0/3
K	0/4	0/2

Dans les élevages mixtes de cette étude qui ont été prélevés sur les deux troupeaux, aucun des troupeaux allaitants n'a eu de résultat positif.

Les prélèvements ont été réalisés de façon comparable en ce qui concerne l'aire d'alimentation (côté bovin et non pas côté alimentation) ainsi qu'autour des abreuvoirs. Seule l'aire de raclage et couchage ne sont pas comparables puisque les bovins allaitants sont en box collectif relativement restreint (20aine de bovins max).

1^{ère} étape : Identification des élevages contaminés

Résultats du 1^{er} site de Méthanisation

Nombre d'exploitation avec au moins un résultat positive en PCR d'environnement :

1. **Exploitation 1** : aucun résultat positif sur prélèvements de bouse d'environnement : 0/5
2. **Exploitation 2** : un résultat positif sur prélèvements de bouse d'environnement : 1/4 et en plus, le prélèvement de lisier (PCR paratuberculose) est aussi positif.
3. **Exploitation 3** : aucun résultat positif sur prélèvements de bouse d'environnement : 0/6
4. **Exploitation 4** : aucun résultat positif sur prélèvements de bouse d'environnement : 0/5

Résultats du 2^{ème} site de Méthanisation

Nombre d'exploitation avec au moins un résultat positive en PCR d'environnement :

1. Exploitation 1 : un résultat positif sur prélèvements de bouse d'environnement : 1/6
2. Exploitation 2 : 4 résultats positifs sur prélèvements de bouse d'environnement : 4/7 et en plus, le prélèvement de lisier (PCR paratuberculose) est positif.

Résultats du 3^{ème} site de Méthanisation

Nombre d'exploitation avec au moins un résultat positive en PCR d'environnement :

1. Exploitation 1 : aucun résultat positif sur prélèvements de bouse d'environnement : 0/4
2. Exploitation 2 : 2 résultats positifs sur prélèvements de bouse d'environnement : 2/4
3. Exploitation 3 : 4 résultats positifs sur prélèvements de bouse d'environnement : 4/7
4. Exploitation 4 : 4 résultats positifs sur prélèvements de bouse d'environnement : 4/4
5. Exploitation 5 : aucun positif sur prélèvements de bouse d'environnement : 0/6
6. Exploitation 6 : aucun positif sur prélèvements de bouse d'environnement : 0/4

2^{ème} Etape : résultats des digestats

Résultats du 1^{er} site de Méthanisation

Le digestat issu de ces 4 exploitations :

- Sur 2 prélèvements de digestat liquide : 1 positif et un ininterprétable
- Sur 2 prélèvements de digestat solide : 1 positif et un négatif

Les prélèvements avec résultats positifs sur digestats ont été mis en culture.

Après mise en culture liquide pendant 42 jours et après confirmation par PCR multiplex : quantitative (F57qPCRT) et qualitative (IS900PCRT) : **Parmi les deux échantillons mis en culture : 4 résultats sont revenus négatifs pour cette méthanisation.**

Résultats du 2^{ème} site de Méthanisation

Le digestat issu de ces exploitations :

- Sur 1 prélèvement de digestat liquide : 1 positif
- Sur 2 prélèvements de digestats solides : 2 positifs

Les trois prélèvements avec résultats positifs sur digestats ont été mis en culture. Après mise en culture liquide pendant 42 jours et après confirmation par PCR multiplex : quantitative (F57qPCRT) et qualitative (IS900PCRT) : parmi les 3 échantillons mis en culture, 2 PCR ont été réalisées. Les 5 résultats sont revenus négatifs et un échantillon très très faiblement positif (inférieur au seuil de positivité) pour cette méthanisation : **donc en conclusion sur 3 prélèvements, 3 négatifs.**

Résultats du 3^{ème} site de Méthanisation

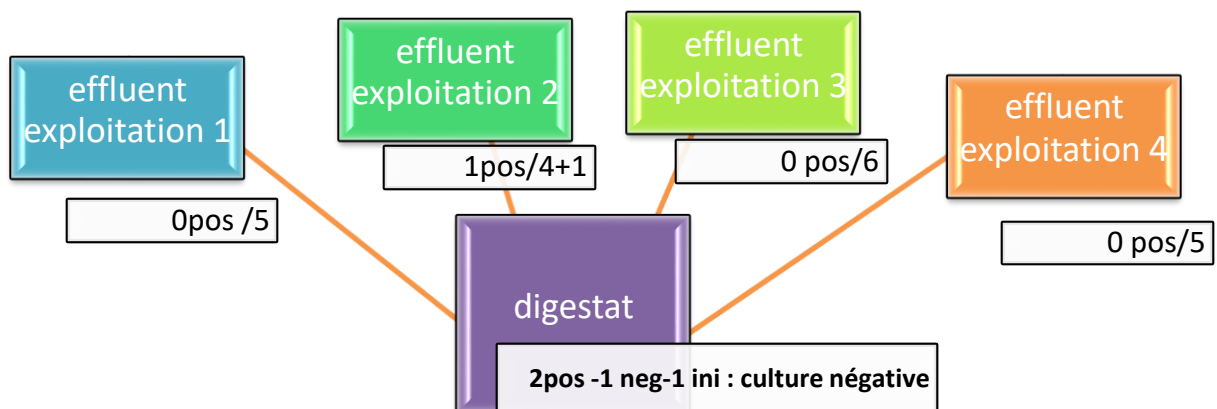
Le digestat issu de ces exploitations :

- Sur 2 prélèvements de digestat liquide homogène : 2 positifs

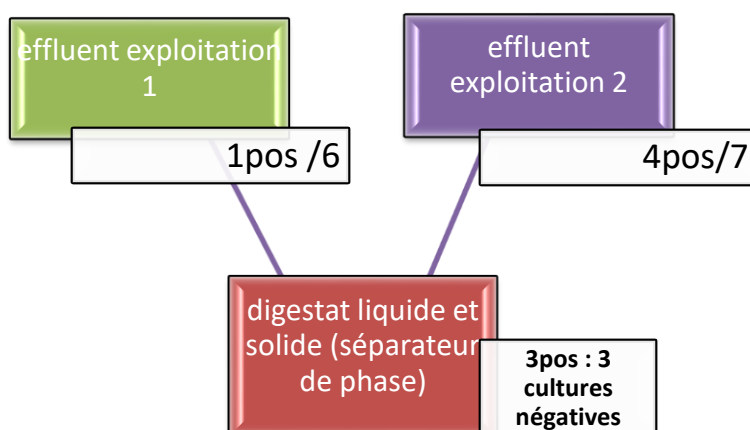
Les prélèvements avec résultats positifs sur digestats ont été mis en culture. Après mise en culture liquide pendant 42 jours et après confirmation par PCR multiplex : quantitative (F57qPCRT) et qualitative (IS900PCRT) : parmi les 2 échantillons mis en culture, pour chaque échantillons 2 PCR ont été réalisées. **Donc en conclusion sur 2 prélèvements, 3 négatifs et 1 très faiblement positif.**

3ème étape : bilan schématisé des résultats des méthanisations

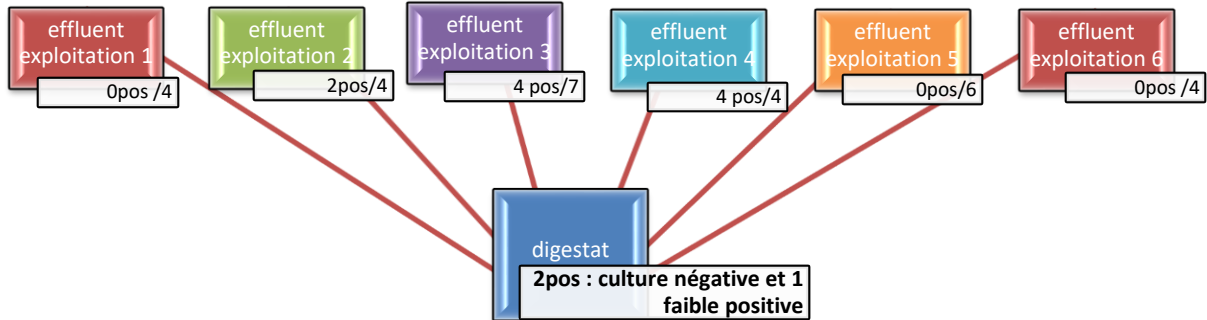
Résultats du 1^{er} site de Méthanisation



Résultats du 2^{ème} site de Méthanisation



Résultats du 3^{ème} site de Méthanisation



Conclusion

- Le nombre d'exploitation avec sérologie lait de tank positif : 1/10
- Le nombre d'exploitation avec au moins un résultat positif sur l'environnement : 6/12
- Le nombre d'exploitation n'ayant que des résultats négatifs en paratuberculose : 6/12
- Le nombre de digestat avec PCR en temps réel : 9

La comparaison entre les cas cliniques connus historiquement dans les exploitations et les résultats de prélèvements d'environnement sont corrélés dans 90% des cas.

Visualisation des données

code échantillon	Nbre de PCR d'environnements positifs / nbre d'échantillons prélevés	RESULTATS sero de lait de tank	DO	Cas cliniques connus	Commentaires
B1	1/4 + fosse positive (caillebotis)	POS	27	Oui	Elevages en suivi paratuberculose 1ère séroprévalence connue en déc. 2014 : 7.3 % d'anx positifs
C1	0/6 + fumier négatif	NEG	1	Non	
D1	0/5 + fumier négatif	NEG	3	Non	
E1	1/6 + lisier négatif	NEG	3	Non	
F1	4/7+ fumier positif	NEG	8	Oui	
G1	0/4	NEG	4	Non	
H1	2/4	NEG	6	Oui	
I1	4/7	NEG	6	Oui	
J1	4/4	NEG	5	Oui	
K1	0/6	NEG	0	non	

Sur 7 échantillons de digestats positifs en PCR classique

Digestats positifs	PCR en temps réel	Mise en culture liquide de 42 jours	
		F57qPCRT	IS900PCRT
GHIJK1 CHARMOIS	Pos ct 35	neg	Pos ct 37
GHIJK2 CHARMOIS	Pos ct 36	neg	Neg
ABCD1 COUSSEY	Pos ct 36	neg	Neg
ABCD4 COUSSEY	Pos ct 38	neg	Neg
EF1 RANCOURT	Pos ct 35	ADN<LQ	Neg
EF2 RANCOURT	Pos ct 36	neg	Neg
EF4 RANCOURT	Pos ct 34	neg	Neg
ABCD 2 COUSSEY	nég	Pas mis en culture	
ABCD 3 COUSSEY	ininterprétable	Pas mis en culture	

NB : Les Ct sont très élevés ce qui indique une très faible quantité de bactéries dans le prélèvement.

La PCR temps réel a été faite avec des prises d'essai d'un volume de 20ml et la culture en milieu liquide a été réalisée avec la même prise d'essai du même volume : 20ml ; Les échantillons de matières fécales ont tous été congelés. Les prises d'essai sont identiques volume de 20 ml et basé sur le même échantillon.

D'après les résultats de PCR en temps réel obtenus, avant la mise en culture, les CT (nombre de cycle d'amplification de l'ADN recherché) sont tous supérieurs à 34. Ce qui signifie qu'avant la mise en

culture, la mycobactérie a été retrouvée, certes, mais en très faible quantité dans les échantillons de digestats (qu'ils soient liquides ou solides).

Les échantillons positifs ont été mis dans un milieu de culture liquide durant 42 jours. Après mise en culture, le laboratoire a procédé à une expertise par PCR des bactéries poussées pour faire une vérification qualitative et quantitative de la bactérie paratuberculosis initialement recherchée.

La mycobactérie n'a été retrouvée que dans un échantillon et en très faible quantité : soit 1 digestat sur 7 est faiblement positif.

VI. Discussion de l'étude

La comparaison des cas cliniques déclarés en élevage avec les résultats sérologiques sur lait de tank ne permet pas de tirer de conclusions.

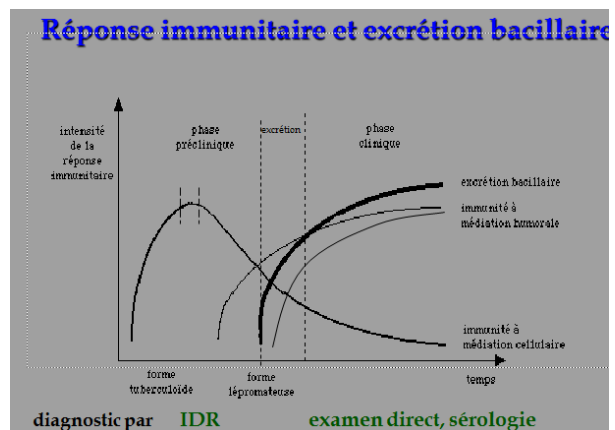
Par contre, l'élevage séropositif sur lait de tank était bien connu comme ayant eu des signes cliniques. Les prélèvements d'environnement confirment aussi cette positivité dans l'élevage.

Cette technique est connue pour détecter les élevages où le taux de positivité animal est supérieur à 10-15% (voir annexe).

Il est évident que la recherche d'anticorps par sérologique est complètement différente de la recherche PCR sur bouse et sont difficilement comparables.

La première permet de détecter la présence d'antigènes, la deuxième permet de mettre en évidence les m

L'expression de ces deux paramètres n'est pas forcément simultanée sur l'animal. Au contraire, l'excrétion suit la montée d'Ac (voir graphique ci-après). Par contre, le stress sur le troupeau (transition alimentaire période de vêlage, acidose....) peut impacter sur l'expression de l'excrétion de la mycobactérie et donc faire varier les résultats dans l'environnement des animaux (Dr Jacquemine VIALARD).



La technique PCR permet de détecter toute présence de trace d'ADN d'une cellule morte ou vivante et le fait que le résultat du digestat soit positif ne signifie pas forcément que la bactérie soit encore infectieuse. Une mise en culture de cette bactérie après méthanisation

permet de vérifier la viabilité et donc éventuellement la pathogénicité de cette bactérie. Ce qui a été mise en place.

Les résultats obtenus sont quasiment tous négatifs ce qui **signifierait** qu'elle n'a pas poussée donc elle ne **résisterait** pas à la méthanisation dans ces circonstances ou bien qu'elle était **en trop faible quantité** pour être détectable.

Mais les résultats ne sont pas tous négatifs, il en reste un qui est faiblement positif.

Aurait-elle résistée à la digestion dans les méthaniseurs ? Ceci n'est pas impossible.

Le prélèvement de digestat était congelé mais la congélation ne détruit pas la mycobactérie, ce n'est donc pas la raison de résultat faiblement positif.

Une autre possibilité liée à l'effet de dilution impactée par les mélanges d'effluent de diverses exploitations ainsi que d'autres matières organiques végétales, limiterait la détection de la mycobactérie et pourrait être à l'origine des résultats faiblement détectés voire négatifs. Ce qui pourrait signifier que cette mycobactérie aurait résisté mais n'étant pas fortement présente dans certains échantillons, elle n'aurait été détectée que dans le cas d'un dans un échantillon sur 7 !

Resterait à savoir si le peu de mycobactérie vivante et présente dans l'épandage des digestats, pourrait être à l'origine d'une contamination animale.

VII. Conclusion

Cette étude mérite d'exister et reste plutôt rassurante vis-à-vis des interrogations initialement posées à savoir est-ce qu'il existe un risque de contamination des animaux issus d'une exploitation supposée naïve au regard de la paratuberculose suite à l'épandage d'un digestat positif.

Il est toutefois difficile de tirer des conclusions définitives vu le faible nombre d'échantillons analysés.

Il semblerait plutôt raisonnable de continuer à faire des prélèvements réguliers de digestats et de les mettre en culture directement afin de pouvoir davantage affiner les résultats dans le temps et pour confirmer ou infirmer cette hypothèse de destruction ou de limitation de la viabilité de la mycobactérie paratuberculose.

Après il faudrait peut-être évaluer l'impact des volumes d'effluent fourni par chaque exploitation pour connaître s'il y a un effet de dilution sur les résultats de culture ou de PCR obtenus en amont. (Le volume d'effluent de l'exploit1* le risque paratuberculose + le volume de l'exploitation2*le risque paratuberculose = risque de contamination ou pas des digestats). De plus à priori les conditions de stockage des effluents avant la mise en digesteur, les délais d'attente, le type

d'effluent (lisier, fumier, séparateur de phase) sont différents d'une exploitation à l'autre et d'un site à l'autre.

Par contre, elle a révélé que la paratuberculose est présente dans ici 50 % des exploitations alors que seulement une seule exploitation a mis en place un plan de gestion de cette maladie. Des moyens existent « théoriquement simples » pour limiter son ampleur en amont dans les élevages.

Une chose est certaine : si dans les élevages en amont, il n'y a pas d'excrétion de mycobactérie, il est également certain de ne pas en retrouver dans les digestats, morte ou vivante !

Autre point sur la Fièvre Q

Testée dans 4 exploitations et un méthaniseur.

Fièvre Q

Dans un complexe de méthanisation, en plus des recherches sur la paratuberculose, il a été demandé de faire des recherches sur la FQ en AMONT dans les élevages et en AVAL dans le digestat.

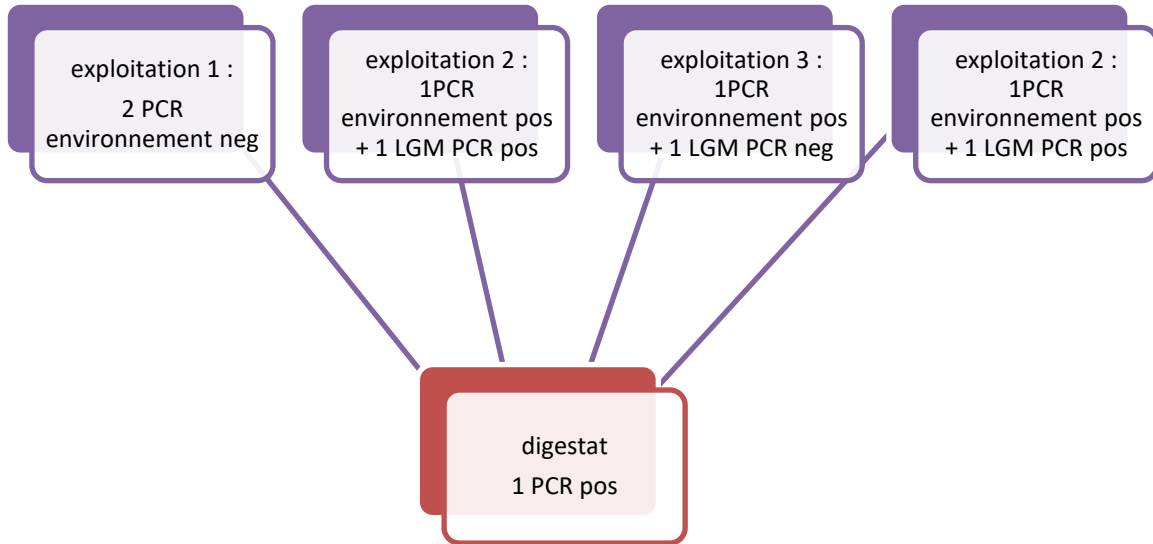
Le choix pour limiter les coûts s'est porté sur 2 échantillons par élevage en amont et un échantillon de digestat en aval.

- ❖ Dans les élevages allaitants en l'absence de lait : 2 prélèvements d'environnement : PCR FQ/bouse
- ❖ Dans les élevages laitiers : prélèvements d'environnement Zone aire d'attente et prélèvements de lait de tank/ 1 PCR FQ sur bouse et 1 PCR FQ sur LGM

Résultats obtenus :

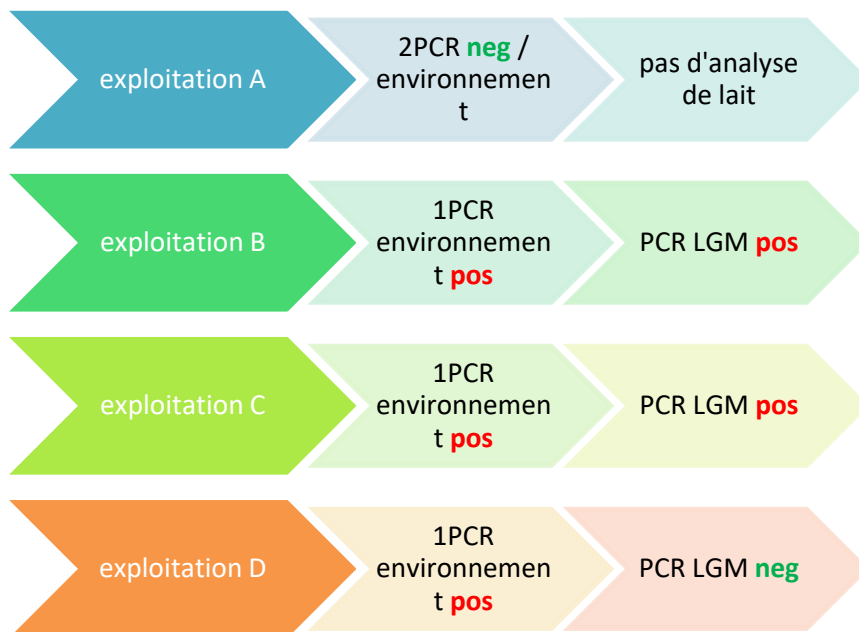
- 5 PCR FQ sur bouse d'environnement : 3 résultats positifs
- 3 PCR FQ sur lait de tank : 2 positives
- 1 PCR FQ sur digestat solide : 1 PCR positive

On retrouve de la fièvre Q dans 60 % des prélèvements d'environnement et dans 66 % des prélèvements laitiers.



En ce qui concerne la FQ aucune culture n'a pu être mise en place. Le fait de retrouver la bactérie dans les digestats ne signifie pas forcément qu'elle soit vivante et dangereuse. Il faudrait à l'avenir mettre en culture les digestats pour savoir si la bactérie pousse et donc vit et a conservé son pouvoir pathogène.

Méthanisation et Fièvre Q



La présence de cette bactérie signifie qu'elle circule dans 3 des exploitations contrôlées. Mais la circulation de cette bactérie n'est pas forcément en adéquation avec des cas cliniques. Une étude de R GUATTEO de l'ENVN a indiqué que la bactérie circulait dans 20 % des exploitations et que seulement dans 8% il y avait des cas cliniques.

La technique PCR permet de détecter toute présence d'ADN d'une cellule morte ou vivante et le fait que le résultat du digestat soit positif ne signifie pas forcément qu'il y ait un risque. Une mise en culture de cette bactérie après méthanisation permettrait de vérifier la viabilité et donc éventuellement la pathogénicité de cette bactérie après méthanisation.

Coût des analyses de l'étude FQ

	nbre	Tarif HT
PCR FQ / LGM	3	101.97
PCR FQ / environnement	5	190.55
PCR FQ / digestat	2 ?	76.22
PCR FQ	2	76.22 ?
total		368.74 +76.22 ?

ANNEXES

Etude méthanisation et risque sanitaire : tableau des résultats paratuberculose

type d'échantillon	code échantillon	type de prélèvement	DEMANDE	DATE DE PRELEMENT	RESULTATS	DO ou CT	culture PCR F57 quantitative	PRC IS900 qualitative
AIRE PAILLEE LOT 1	A1	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			
AIRE PAILLEE LOT 1	A1	bouse environnement	PCR FQ	19/05/2015	NEG			
AIRE PAILLEE LOT 2	A2	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			
AIRE PAILLEE LOT 2	A2	bouse environnement	PCR FQ	19/05/2015	NEG			
AIRE PAILLEE LOT 3	A3	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			
AIRE PAILLEE LOT 4	A4	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			
AIRE PAILLEE LOT 5	A5	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			
LGM	B1	lait de tank	SERO PARATUBERCULOSE	19/05/2015	POS	27		
LGM	B2	lait de tank	PCR FQ	19/05/2015	POS	32		
AIRE D'ATTENTE	B3	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			
AIRE D'ATTENTE	B3	bouse environnement	PCR FQ	19/05/2015	POS	34		
AIRE D'ALIMENTATION	B4	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	POS	37		
AIRE DE RACLAGE	B5	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			
ABREUVOIRS	B6	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			
FOSSE	B7	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	POS	34		
LGM	C1	lait de tank	SERO PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG	1		
LGM	C2	lait de tank	PCR FQ	19/05/2015	POS	32		
AIRE D'ATTENTE	C3	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			
AIRE D'ATTENTE	C3	bouse environnement	PCR FQ	19/05/2015	POS	34		
AIRE D'ALIMENTATION	C4	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			
AIRE DE RACLAGE	C5	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			
ABREUVOIRS	C6	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			

COUCHAGE	C7	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			
FUMIER	C8	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			
LGM	D1	lait de tank	SERO PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG	3		
LGM	D2	lait de tank	PCR FQ	19/05/2015	NEG			
AIRE D'ATTENTE	D3	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			
AIRE D'ATTENTE	D3	bouse environnement	PCR FQ	19/05/2015	POS	36		
AIRE D'ALIMENTATION	D4	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			
AIRE DE RACLAGE	D5	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			
ABREUVOIRS	D6	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			
FUMIER	D7	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			
DIGESTAT ABCD	ABCD 1	digestat solide	PCR FQ		POS	35		
DIGESTAT ABCD	ABCD 1	digestat solide	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	POS	36	neg	neg
DIGESTAT ABCD	ABCD 1	digestat solide	culture liquide si positif en PCR	19/05/2015				
DIGESTAT ABCD	ABCD 2	digestat solide	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			
DIGESTAT ABCD	ABCD 3	digestat liquide	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	INH			
DIGESTAT ABCD	ABCD 4	digestat liquide	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	POS	38	neg	neg
DIGESTAT ABCD	ABCD 4	digestat liquide	culture liquide si positif en PCR	19/05/2015				
LGM	E1	lait de tank	SERO PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG	3		
AIRE D'ATTENTE	E2	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			
AIRE D'ALIMENTATION	E3	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	POS	38		
AIRE DE RACLAGE	E4	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			
ABREUVOIRS LOT 1	E5	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			
LISIER VL	E6	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			
ABREUVOIRS LOT2	E7	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			
DIGESTAT EF	EF1	digestat solide	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	POS	35	adn<Lq	neg
DIGESTAT EF	EF1	digestat solide	culture liquide si positif en PCR	19/05/2015				
DIGESTAT EF	EF2	digestat solide	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	POS	36	neg	neg
DIGESTAT EF	EF2	digestat solide	culture liquide si positif en PCR	19/05/2015				
DIGESTAT EF	EF4	digestat liquide	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	POS	33	neg	neg
DIGESTAT EF	EF4	digestat liquide	culture liquide si positif en PCR	19/05/2015				

LGM	F1	lait de tank	SERO PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG	8		
AIRE D'ATTENTE LOT 1	F2	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	POS	37		
AIRE D'ALIMENTATION	F3	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	POS	35		
AIRE DE RACLAGE LOT 2	F4	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	POS	36		
ABREUVOIRS RACLAGE LOT 2	F5	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	POS	31		
AIRE PAILLEE LOT 1	F7	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			
AIRE PAILLEE LOT 2	F8	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			
AIRE PAILLEE LOT 3 GENISSES	F9	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	NEG			
FUMIER VL PHASE LIQUIDE	F11	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	19/05/2015	POS	34		
LGM	G1	lait de tank	SERO PARATUBERCULOSE	21/05/2015	NEG	4		
AIRE D'ATTENTE	G2	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	NEG			
AIRE D'ALIMENTATION	G3	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	NEG			
AIRE DE RACLAGE	G4	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	NEG			
ABREUVOIRS	G5	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	NEG			
DIGESTAT GHIJKL	GHIJKL1	digestat solide	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	pos	35	neg	37CT
DIGESTAT GHIJKL	GHIJKL1	digestat solide	culture liquide si positif en PCR	21/05/2015				
DIGESTAT GHIJKL	GHIJKL2	digestat solide	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	pos	36	neg	neg
DIGESTAT GHIJKL	GHIJKL2	digestat solide	culture liquide si positif en PCR	21/05/2015				
LGM	H1	lait de tank	SERO PARATUBERCULOSE	21/05/2015	NEG	6		
AIRE D'ATTENTE	H2	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	NEG			
AIRE D'ALIMENTATION	H3	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	POS	36		
AIRE DE RACLAGE	H4	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	NEG			
ABREUVOIRS	H5	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	POS	38		
LGM	I1	lait de tank	SERO PARATUBERCULOSE	21/05/2015	NEG	6		
AIRE D'ATTENTE	I2	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	POS	34		
AIRE D'ALIMENTATION	I3	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	POS	33		
AIRE DE RACLAGE	I4	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	POS	38		
ABREUVOIRS	I5	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	POS	37		
AIRE PAILLEE LOT 1	I7	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	NEG			
AIRE PAILLEE LOT 2	I8	bouse	PCR	21/05/2015	NEG			

		environnement	PARATUBERCULOSE				
AIRE PAILLEE LOT 3	I9	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	NEG		
LGM	J1	lait de tank	SERO PARATUBERCULOSE	21/05/2015	NEG	5	
AIRE D'ATTENTE	J2	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	POS	37	
AIRE D'ALIMENTATION	J3	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	POS	30	
AIRE DE RACLAGE	J4	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	POS	35	
ABREUVOIRS	J5	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	POS	36	
LGM	K1	lait de tank	SERO PARATUBERCULOSE	21/05/2015	NEG	0	
AIRE D'ATTENTE	K2	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	NEG		
AIRE D'ALIMENTATION	K3	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	NEG		
AIRE DE RACLAGE	K4	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	NEG		
ABREUVOIRS	K5	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	NEG		
AIRE PAILLEE LOT 1	K7	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	NEG		
AIRE PAILLEE LOT 2	K8	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	NEG		
AIRE PAILLEE LOT 1	L1	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	NEG		
AIRE PAILLEE LOT 2	L2	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	NEG		
AIRE PAILLEE LOT 3	L3	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	NEG		
AIRE PAILLEE LOT 4	L4	bouse environnement	PCR PARATUBERCULOSE	21/05/2015	NEG		

Coût des analyses paratuberculose

Les prélèvements ont été effectués par le GDS sur 2 jours et acheminés sans frais au LVD 88

	nbre	Facturation HT
PCR digestats	9	249.39€
Mise en culture méthode TREK	7	280€+12.05€ de frais d'envoi
Sero	5	40.68€
PCR paratuberculose	64+9	1598.02€+249.39€
Total / cout des analyses / paratuberculose		2429.71€

PRELEVEMENTS D'ENVIRONNEMENT

3.1.1. Concernant les prélèvements d'environnement

➤ *Interprétation des tests sur prélèvements d'environnement*

Les prélèvements d'environnement (basés sur la récolte de matières fécales en différents points des infrastructures d'élevage) se sont révélés être intéressants pour déterminer les statuts de troupeau (Raizman *et al.*, 2004). Ces prélèvements sont par

nature des mélanges de fèces et sont de bons prédicateurs du statut troupeau, à moindre coût (rapporté au coût des ELISA et cultures individuelles) et ne nécessitant aucune intervention ni contention sur les animaux (Berghaus *et al.*, 2006).

Cette technique permet de discriminer les élevages infectés contenant des excréteurs des élevages indemnes ou infectés sans excréteurs (cette dernière possibilité semble moins probable).

Raizman *et al.*, (2004) indique que la culture de prélèvements d'environnement (aire d'exercice, fumière et box de vêlage principalement) présente des résultats similaires (mais à moindre coût) que ceux obtenus par mélange de 100 prélèvements de fèces individuels pour établir le statut sain ou infecté d'un troupeau. Cet outil semble cependant présenter un défaut de sensibilité dans les troupeaux de faible prévalence (< 10 CFU/tube) mais de grande qualité pour détecter les élevages contenant des forts excréteurs (Raizman *et al.*, 2004 ; Smith *et al.*, 2011 ; Donat and Schau 2012).

Enfin, Raizman *et al.*, (2004) propose une estimation de la prévalence intra-troupeau compte tenu des résultats semi-quantitatifs obtenus pour deux prélèvements d'environnement : Fumière et aire d'exercice (Tableau 14).

Tableau 14 : Estimation de la prévalence attendue en culture fécale sur 100 prélèvements individuels en pool de 5 en fonction du rang de lactation

Corrélation avec les résultats semi-quantitatifs obtenus à partir de 2 prélèvements d'environnement
(Raizman *et al.*, 2004)

		AIRE D'EXERCICE			
CFU max.		Nul	Faible	Modéré	Fort
FUMIÈRE	Nul	2 % (0,3-4)	18 % (12-24)	20 % (12-28)	36 % (27-45)
	Faible	12 % (7-17)	29 % (22-36)	30 % (22-39)	46 % (38-55)
	Modéré	13 % (3-23)	29 % (16-42)	31 % (21-39)	47 % (36-58)
	Fort	29 % (23-35)	45 % (36-57)	46 % (36-56)	63 % (53-73)

Nul : CFU/tube=0 ; Faible : 0 < CFU/tube < 10 ; Modéré : 10 < CFU/tube < 50 ; Fort : CFU/tube > 50

Dans leur étude, Berghaus *et al.*, (2006) confrontent les prélèvements d'environnement à l'ELISA et à la culture fécale.

En effet, cette étude compare, sur 23 élevages d'en moyenne 680 vaches (de 350 à 2500) la capacité de discrimination infecté/indemne des cultures de prélèvements environnementaux (3 sites) vis-à-vis des résultats de 60 ELISA individuelles sur sérum et de 60 cultures fécales individuelles et en mélange (échantillonnage aléatoire). En ELISA, un élevage est considéré infecté si plus de 3 % des résultats individuels sont positifs. Les 3 sites de prélèvements sont : le couloir de sortie de la salle de traite, derrière les cornadis ainsi qu'autour des abreuvoirs.

Ils montrent que la proportion d'élevages détectés infectés (environ 70 %) est similaire pour ces trois méthodes mais que le prix total est respectivement 5 et 13 fois plus élevés pour les ELISA et les cultures fécales, respectivement.

De plus ils mettent en évidence que la proportion de prélèvements d'environnement positifs est significativement associée au nombre de séropositifs dans l'élevage ; constatation confirmée par Pillars *et al.*, (2009). Corrélation prouvée par le test de Spearman ; $r_s = 0,65$; $\alpha = 0,002$ (calcul personnel) ; représentation graphique présentée dans la Figure 5.

Ces derniers précisent que l'environnement peut rester fortement contaminé (prélèvements d'environnement positifs en culture malgré une forte diminution de la séroprévalence et de l'incidence). Nous rappelons ici la grande résistance de *Map* dans l'environnement : plus de 200 jours dans la fumière (Jorgensen 1977).

Concernant les tests applicables aux prélèvements d'environnement notons que les cultures (milieux liquides et solides) permettent de mettre en évidence des formes viables de *Map* ; les PCR ne distinguent pas les formes viables des formes mortes. Cependant, la détection par PCR est représentative de la détection des formes viables par culture en milieu liquide d'après Eisenberg *et al.*, (2010a,b). En outre, Roger *et al.*, (2010) conseillent tout de même de choisir, pour un prélèvement d'environnement, une culture sur milieu liquide type ParaJEM plutôt qu'une PCR pour détecter les troupeaux excréteurs.

Les prélèvements d'environnement prennent alors toute leur importance dans une logique de détermination rapide du statut de troupeau (infecté ou non), à bas prix et semblent apporter en plus une information quantitative permettant une première estimation de la prévalence intra-troupeau (Berghaus *et al.*, 2006). Cette matrice est aujourd'hui intégrée dans le programme américain de contrôle de la Paratuberculose exposé par la suite (USDA-APHIS 2008 et 2010).

4.3.4. Recherche d'un seuil de positivité optimal pour les prélèvements de grand mélange

Pour les prélèvements de grand mélange, à savoir pour les prélèvements d'environnement (AE, ST et Stab) ainsi que pour le lait de tank, les seuils de positivité du fabricant ont été réévalués. Le but était d'améliorer la spécificité de ces tests. Pour ce faire, des courbes ROC (Se en fonction de 1-Sp) ont été construites.

De plus, la courbe représentative de la fonction $f(x,y) = \sqrt{(1-y)^2 + x^2}$ (avec $y = Se$ et $x = 1-Sp$) permettait d'identifier le seuil optimal en terme de sensibilité et spécificité. Cette valeur de seuil optimal est obtenue pour $f(x,y)$ minimum.

Les courbes ROC ont été construites à partir des valeurs de sensibilité et de spécificité pour des valeurs de seuils comprises entre :

- pour les prélèvements d'environnement : $17 \leq Ct \leq 45$.
 - o Lorsque le Ct était supérieur à 45, le laboratoire d'analyse avait renseigné la valeur de 45 par défaut.
- pour le lait de tank : $-5 \leq \%S/P \leq 50$.

Tableau 58 : Synthèse des valeurs informatives des tests diagnostiques sur Lait de tank. Les cas de discrimination des statuts A, C et B₁ sont renseignés

Les résultats au seuil fabricant et au nouveau seuil (*) sont présentés.

	Lait de Tank : LT		
	A vs BC	C vs AB	AB ₁ vs B ₂ C
Seuil	% S/P = 15		
Résultat favorable	NEG	POS	NEG
Sensibilité	0,99	0,21	0,97
Spécificité	0,09	0,97	0,07
Indice de Youden	0,08	0,18	0,04

	Lait de Tank : LT*		
	A vs BC	C vs AB	AB ₁ vs B ₂ C
Seuil	% S/P = 3		
Résultat favorable	NEG	POS	NEG
Sensibilité	0,74	0,93	0,67
Spécificité	0,65	0,65	0,79
Indice de Youden	0,39	0,58	0,45

Par ailleurs, la sensibilité de la culture individuelle est équivalente à celle de la culture en mélange (Kalis *et al.*, 2000 ; Christensen *et al.*, 2000), et plus particulièrement dans un contexte de faible prévalence (Tavornpanich, 2004). Cette dernière étude conclut que des mélanges de 10 échantillons prélevés dans un troupeau avec une prévalence inférieure à 4%, permet de discriminer plus de 81 % des troupeaux infectés.

Cependant Van Schaik et Tavornpanich rapportent des résultats positifs de mélanges alors que les cultures individuelles faites en parallèle sont négatives. Les auteurs expliquent cette observation par une mauvaise homogénéisation de l'échantillon individuel avant mélange et prélèvement de la fraction destinée à la culture.

source :thèse Brugel Charlotte 2014

La PCR temps réel a été faite avec des prises d'essai (des prélèvements d'environnement-lisiers ou digestats) d'un volume de 20ml et la culture en milieu liquide a été réalisée avec la même prise d'essai du même volume : 20ml ; Les échantillons de matières fécales ont tous été congelés. Les prises d'essai sont identiques volume de 20 ml et basé sur le même échantillon.

4.1.1. Concernant les troupeaux laitiers

4.1.1.1. Valeur informative des tests en combinaisons pour discriminer les statuts A

Tableau 59 : Synthèse des valeurs informatives des tests diagnostiques seuls et des combinaisons d'intérêts pour discriminer les troupeaux laitiers de statut A

Test ou combinaison	Critère de positivité	Se	Sp	Youden
ENVIRONNEMENT et LAIT DE TANK				
AE	NÉGATIF - PCR Trek	0,76	0,67	0,43
AE*	NÉGATIF - PCR Trek	0,83	0,58	0,41
ST	NÉGATIF - PCR Trek	0,77	0,69	0,46
LT	NÉGATIF - IDVET	0,99	0,09	0,08
AE + ST		0,66	0,79	0,46
AE + LT		0,77	0,70	0,46
LT + ST		0,76	0,71	0,47
AE + ST + LT		0,66	0,82	0,48

Tableau 64 : Rappel de la définition des statuts pour les cheptels laitiers (Système AB₁B₂C)

Concernant LES CHEPTELS LAITIERS	
Statut A	$0 \leq \text{Séroprévalence troupeau} \leq 3,5 \%$
Statut B₁	$3,5 \% < \text{Séroprévalence troupeau} \leq 10,5 \%$ ET AUCUN cas clinique rapporté sur les 3 dernières années
Statut B₂	$3,5 \% < \text{Séroprévalence troupeau} \leq 10,5 \%$ ET AU MOINS UN cas clinique rapporté sur les 3 dernières années
Statut C	Séroprévalence troupeau $> 10,5 \%$

Tableau 65 : Rappel de la définition des statuts pour les cheptels allaitants (Système AB₁B₂C)

Concernant LES CHEPTELS ALLAITANTS	
Statut A	$0 \leq \text{Séroprévalence troupeau} \leq 5,5 \%$
Statut B₁	$5,5 \% < \text{Séroprévalence troupeau} \leq 18 \%$ ET AUCUN cas clinique rapporté sur les 3 dernières années
Statut B₂	$5,5 \% < \text{Séroprévalence troupeau} \leq 18 \%$ ET AU MOINS UN cas clinique rapporté sur les 3 dernières années
Statut C	Séroprévalence troupeau $> 18 \%$

➤ Concernant les prélèvements de grand mélange : environnement et lait de tank

Globalement les tests diagnostiques sur prélèvement d'environnement semblent présenter un fort potentiel informatif ; tant pour la discrimination des troupeaux de statut A que pour la discrimination des statuts C. Conformément aux observations de Berghaus *et al.*, (2006) les prélèvements de grand mélange sont de bons prédicateurs des statuts de troupeau et donc, *a priori*, une bonne base pour la construction de combinaisons de tests diagnostiques.

Les prélèvements ST (Salle de Traitement) et LT (Lait de Tank) semblent plus informatifs pour la détection des statuts de forte prévalence C tandis que le prélèvement AE (Aire d'Exercice) semble plus informatif pour la détection des statuts à plus faible prévalence A et AB₁. Ces observations pouvaient être attendues. En effet, compte tenu de la pathogénie de la maladie, le lait de tank se positive tardivement et lorsque la prévalence intra-troupeau est forte. De même, lorsque la prévalence est faible, la probabilité de détecter au moins un excréteur par des prélèvements d'environnement est faible ; d'autant plus au niveau de l'aire d'exercice (AE) où l'effet dilution est beaucoup plus important que pour la salle de traitement (ST).

Les effets des nouveaux seuils sur la sensibilité et la spécificité des tests sont résumés dans le Tableau 66 en fonction du type de statut que l'on cherche à discriminer.

Nous avons établis des nouveaux seuils de positivité pour les PCR sur prélèvements d'environnement (nouveau seuil : Ct = 33 au lieu de Ct = 45) et pour la sérologie sur lait de tank (nouveau seuil %S/P = 3 au lieu de %S/P = 15) dans le but d'améliorer la spécificité de cet outil diagnostique.

Tableau 66 : Tableau récapitulatif des effets sur la sensibilité et la spécificité des nouveaux seuils, en fonction des statuts à discriminer

	Effet des nouveaux seuils sur ...	
	... la sensibilité	... la spécificité
Détection des A	Amélioration (sauf LT)	Détérioration
Détection des AB ₁	Détérioration ou aucun effet (Stab) (sauf AE : amélioration)	Amélioration ou aucun effet (Stab) (sauf AE : détérioration)
Détection des C	Aucun effet (sauf LT : amélioration)	Amélioration (sauf LT : détérioration)

Tableau 68 : Comparaison des valeurs informatives pour l'ELISA sur Lait de Tank entre l'étude de Chognard (2011) et la notre

	LT (ELISA Idvet)	
	Chognard (2011)	Notre étude
Pour discriminer les statuts A (cheptels laitiers)		
Critère de positivité	0 % de mélange positif	
Se	1	0,99
Sp	0,09	0,09
Pour discriminer les statuts C (cheptels laitiers)		
Critère de positivité	> 50 % de mélanges positifs	
Se	0,28	0,21
Sp	0,98	0,97

Tableau 69 : résumé des valeurs informatives des combinaisons d'intérêt pour la discrimination des statuts A, C et AB₁ pour les cheptels laitiers et allaitants

	Se	Sp
Cheptels LAITIERS		
Pour discriminer les statuts A		
L1 + L2 + AE	0,67	0,86
L1 + L2 + ST	0,65	0,84
L1 + L2 + AE* +ST	0,61	0,90
Pour discriminer les statuts C		
LT* + ST *	0,64	0,84
AE* + ST* + LT*	0,54	0,87
PCR Trek L1	0,50	0,77
ST* + LT* + PCR Trek L1	0,36	0,91
AE* + LT* + PCR Trek L1	0,38	0,91
AE* + PCR Trek L1	0,53	0,82
Pour discriminer les statuts AB₁		
L1 + L2 + AE	0,53	0,93
L1 + L2 + AE*	0,57	0,86
Cheptels ALLAITANTS		
Pour discriminer les statuts A		
VA1 + Stab	0,70	0,70
VA1 + Stab*	0,47	0,90
Pour discriminer les statuts AB₁		
VA1 + VA3 + Stab	0,80	1
VA1 + VA3 + Stab*	0,83	0,80

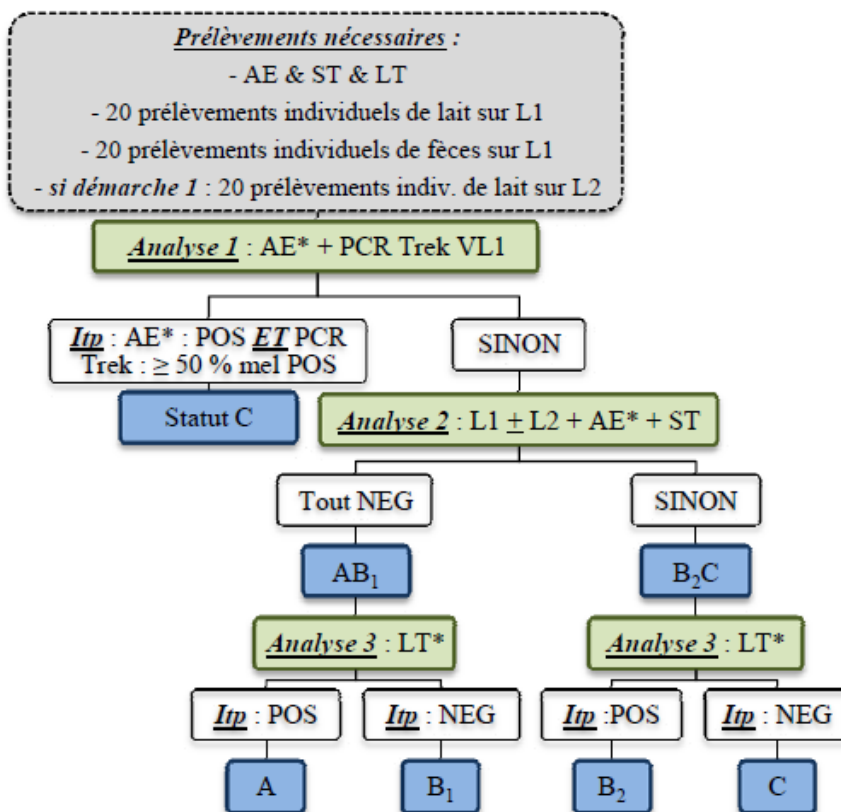


Figure 13 : Proposition de deux marches à suivre (1 et 1bis) pour les troupeaux laitiers dans le but d'isoler rapidement les troupeaux C

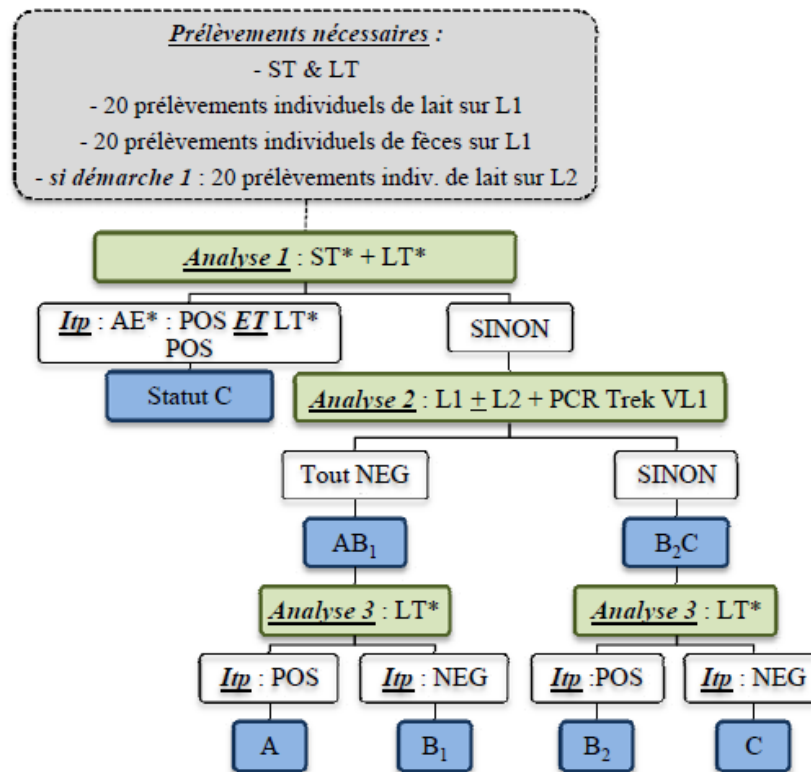


Figure 14 : Proposition de deux marches à suivre (2 et 2bis) pour les troupeaux laitiers dans le but d'isoler rapidement les troupeaux C

Tableau 71 : Avantages et inconvénients des démarches 1, 1bis, 2 et 2bis

	Démarches 1 et 1bis	Démarches 2 et 2bis
AVANTAGES	<p>La première étape discrimine rapidement les élevages dans lesquels l'excrétion fécale est en cours et forte (ce qui va de paire avec un environnement « POS »).</p> <p>La démarche 1 discrimine le plus de troupeaux C.</p>	<p>La première étape est peu onéreuse et peu contraignante (ST et LT).</p> <p>La PCR Trek sur les L1 intervient spécifiquement pour la discrimination des statuts favorables : les troupeaux A semblent plus robustes : environnement quasiment toujours négatif et jamais d'excrétion détectée sur les L1</p>
INCONVÉNIENTS	<p>La première étape est assez couteuse.</p>	<p>La 1^{ère} étape ne renseigne pratiquement que sur l'environnement.</p> <p>Les 2 et 2bis semblent moins bien adaptées à la classe B1.</p> <p>L'analyse du lait de tank intervient deux fois (étapes 1 et 3).</p>

Prélèvements d'environnement ... un nouveau mode de diagnostic de la paratuberculose !

Publié le 15 octobre 2014 par [admin](#)

Dans le cadre de la lutte contre la paratuberculose, l'ARSIA propose une nouvelle méthode de diagnostic des troupeaux infectés et de suivi des troupeaux sains basée sur des prélèvements fécaux réalisés dans le milieu de vie (prélèvements d'environnement) des animaux.

L'étude (encore en cours), menée par l'ARSIA à ce sujet, donne des résultats très encourageants. En effet, environ 90% des troupeaux prélevés ont des résultats concordants entre les prélèvements d'environnement et les tests individuels réalisés lors du bilan annuel.

La mise au point d'un tel test permet de proposer une étape préalable à l'entrée du troupeau, dans un plan de lutte contre la paratuberculose :

En effet, ce test de troupeau permet de classer les cheptels ayant obtenu un résultat négatif comme « faiblement à risque » alors qu'un bilan individuel n'est à réaliser que dans les autres troupeaux (positifs sur prélèvements d'environnement) afin de détecter les animaux infectés et de les réformer.

Pratiquement

Voici les points importants pour que le vétérinaire puisse poser un diagnostic troupeau via les prélèvements d'environnement :

1. une demande d'analyse spécifique pré-remplie et comportant les étiquettes nécessaires pour identifier les prélèvements réalisés doit être demandée au service de l'administration de la santé de l'ARSIA (admin.santé@arsia.be ou 083/23.05.15 option 4).
2. les prélèvements de matières fécales doivent être réalisés dans les trois zones suivantes :
 - la zone d'attente avant la salle de traite (uniquement si troupeau laitier)
 - la zone de repos (ou zone de vie) et d'alimentation
 - la fosse à lisier
3. les matières fécales doivent être prélevées sur la plus grande surface possible de chaque zone de prélèvements et ce pour que l'échantillon soit représentatif du plus grand nombre d'individus possible. La multiplication de prise d'échantillons à différents endroits va permettre cette représentativité. La technique consiste donc à traverser chaque zone de prélèvement de long en large (marcher en zigzags) et à prélever le plus souvent possible de petites quantités de matières fécales.
4. le matériel à prélèvement se compose de trois pots d'un demi-litre (1 par zone à prélever) et d'une cuillère, disponibles à l'ARSIA. Il est important de noter que le pot ne devra être rempli qu'une fois toute la surface parcourue !

ATTENTION !

ATTENTION !

L'analyse réalisée au laboratoire est une PCR après enrichissement sur un pool des 3 prélèvements envoyés. Vous ne recevrez donc qu'un seul résultat.

Interprétation des résultats

Négatif : Le risque de circulation de la bactérie responsable de la paratuberculose dans le troupeau est faible. Un contrôle de ce résultat est conseillé une fois par an.

Positif (+, ++, +++ ou ++++) : Il y a circulation de la bactérie responsable de la paratuberculose dans le troupeau. Un bilan individuel des bovins adultes est nécessaire pour permettre la détection et l'élimination des animaux infectés.

Pour tout renseignement complémentaire ou concernant les modalités du plan de contrôle proposé par l'industrie laitière et du plan de lutte proposé par l'ARSIA, n'hésitez pas à prendre contact avec notre service de l'administration de la santé. (admin.santé@arsia.be ou 083/23.05.15, option 4)

ANONYMISATION DES RESULTATS

Afin de pouvoir faire les prélèvements sans pénaliser les élevages choisis pour cette étude, il a été choisi de rendre anonyme les résultats d'analyses paratuberculose ou FQ. Cette demande vient des éleveurs, en accord avec le GDS.

Vente à l'export : exigences vis-à-vis de la paratuberculose

D'autres exigences que la paratuberculose : leptospirose, PI3, pasteurellose, BVD, IBR, FQ, teignes, fasciolose,

Pays importateur	Conditions paratuberculose	délai	FQ
Pays de l'UE avec la Suisse	rien		
Birmanie	Aucun cas de paratuberculose déclaré	Au cours des 5 dernières années	ras
Koweït	Test Elisa paratuberculose		ras
Iran	Absence de cas clinique	Au cours de 6 derniers mois	idem
Irak	Aucun cas de paratuberculose déclaré	Au cours des 5 dernières années	ras
Inde	Aucun cas de paratuberculose déclaré	Au cours des 2 dernières années + Test Elisa paratuberculose	
Maroc	Aucun cas connu de paratuberculose	Au cours des 5 dernières années	
Mongolie	Aucun cas déclaré de paratuberculose	Au cours des 5 dernières années	
Afghanistan , Palestine Lybie	RAS		
Niger Pakistan Pays tiers Qatar Syrie comme d'autres	Pas de certificat		
Serbie	Pas signe clinique de paratuberculose	Depuis 12 mois	
Algérie	Aucun cas clinique de paratuberculose déclaré	Au cours des 5 dernières années	
Egypte	Aucun cas clinique de paratuberculose déclaré + teste séro individuelle	Au cours des 5 dernières années	

Tunisie	Aucun cas clinique de paratuberculose + teste sérologique individuel	Au cours des 5 dernières années	
Ukraine	Pas de paratuberculose	Depuis les 6 derniers mois	
Turquie	Cliniquement indemne de paratuberculose	Depuis 24 mois	
Cameroun	RAS		
Bosnie Herzégovine	RAS		

ETUDE METHANISATION suite

COMPLEMENT D'ANALYSE SUR LES DIGESTATS juin 2017

Les prélèvements de digestats ont été congelés au laboratoire vétérinaire des Vosges avant mise en culture dans un autre laboratoire. Il est fort probable que cette congélation ait réduit faiblement ou fortement la viabilité de la mycobactérie paratuberculosis surtout pendant 2 mois de congélation entre -20 à -80°C.

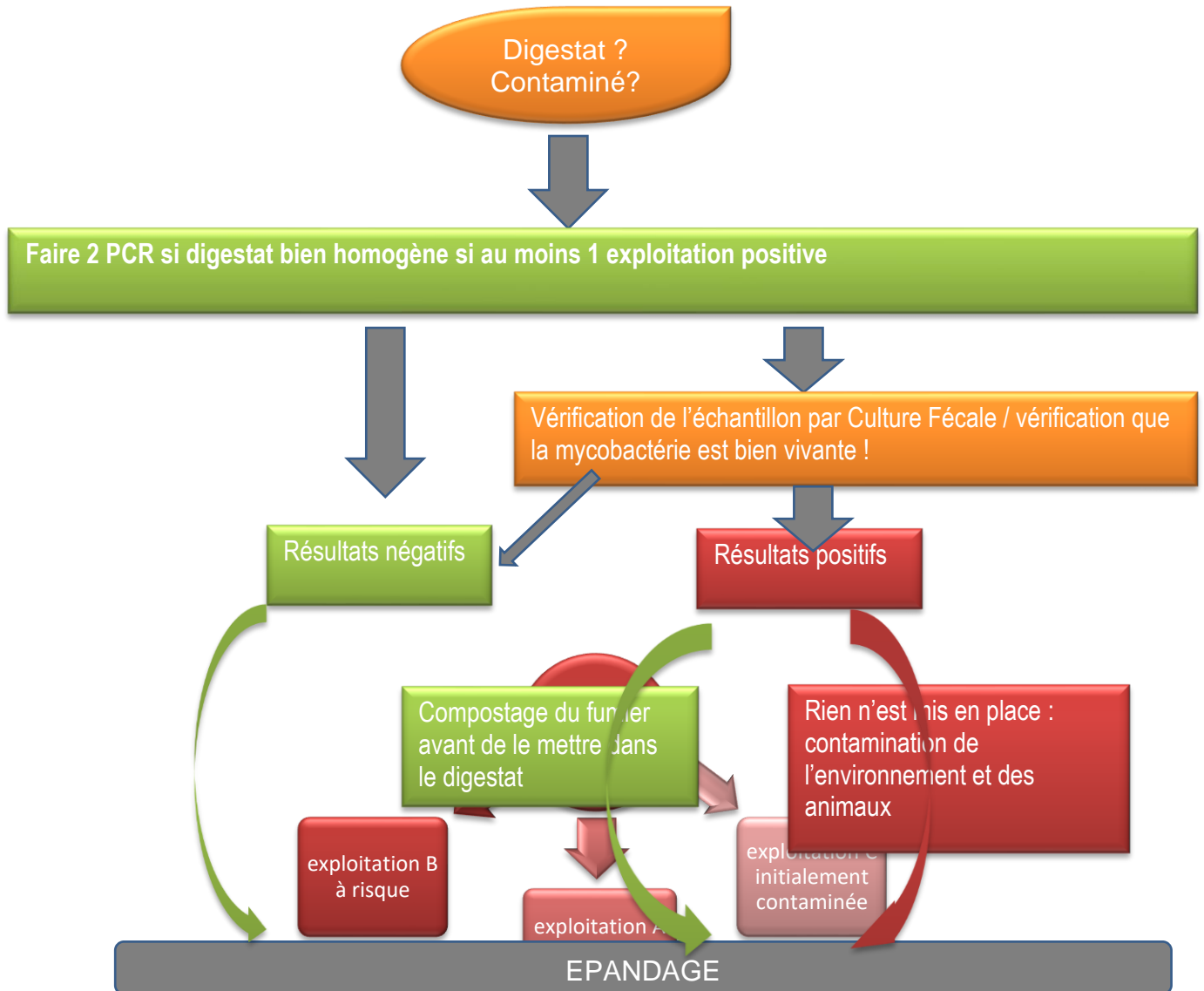
- Les 65 prélèvements ont été effectués le 21/5/15 et amenés le même jour au laboratoire des Vosges.
- Les analyses PCR ont été effectuées le 27/5/15

Ces prélèvements ont été envoyés pour mise en culture par le laboratoire des Vosges au LABOCEA Quimper le 20/7/15 (prélèvements oubliés dans le congélateur du LVDA88 ?) et résultats des mises en culture F57qPCRT et IS900PCRT le 7/9/2015.

Pour information la procédure de prélèvements et d'analyse avaient été vues préalablement pour le directeur technique du Laboratoire.

Procédure initiale

EN AVAL / IDENTIFICATION DES DIGESTATS issus de mélange de troupeaux
avec présence de mycobactéries identifiées



Proposition :

Refaire des prélèvements de digestat dans les 3 méthaniseurs collectifs suivant le même protocole.

Volume de prélèvement : 200 ml

Méthaniseur avec digestat liquide : 2 prélèvements

Méthaniseur avec séparateur de phase : 3 prélèvements

- 2 en phase solide :

- 1 en périphérie de tas
- 1 en profondeur de tas
- 1 en phase liquide

Les prélèvements sont réalisés si possible dans la journée et amenés au LVD 88 pour être envoyés au laboratoire LABOCEA 29 334 Quimper à température ambiante. **Il est demandé de ne pas congeler les échantillons qui vont être mis en culture.**

Demande d'analyse au laboratoire LABOCEA : **Il est demandé de ne pas congeler les échantillons qui vont être mis en culture.**

- PCR classique paratuberculose sur tous les échantillons
- Pour les échantillons positifs en PCR faire une culture liquide avec PCR trek

BUDGET PREVISIONNEL :

1 journée de prélèvement pour les 3 sites.

3 méthanisations :

Technique d'analyse	Tarif unitaire	Nbre de digestat à analyser	Tarif HT
PCR sur bouse	30	8	94.72
Culture liquide			
PCR suite TREK ind. Paratuberculose LABOCEA	15	7	160
Enrichissement TREK ind. Paratuberculose	25	7	335
		Montant total des analyses HT	589.72

DEMANDE D'ANALYSES		
		LDVA des Vosges
Demande du GDS 88 prélèvements réalisés le 11/4/17 par Carine HAAS	facturation au GDS 102 rue André Vitu 88000 Epinal	METHANISATION ET PARATUBERCULOSE
nom du prélèvements de digestats	demande d'analyse PCR paratuberculose au LVD 88	demande de culture liquide si le résultat PCR est positif Culture liquide au laboratoire de Quimper
1 METHA COUSSEY DIGESTAT SOLIDE extérieur	OUI	OUI si positif en PCR
2 METHA COUSSEY DIGESTAT SOLIDE profond	OUI	OUI si positif en PCR
3 METHA COUSSEY DIGESTAT LIQUIDE 1	OUI	OUI si positif en PCR
4 METHA COUSSEY DIGESTAT LIQUIDE 2	OUI	OUI si positif en PCR
5 METHA RANCOURT DIGESTAT SOLIDE extérieur	OUI	OUI si positif en PCR
6 METHA RANCOURT DIGESTAT SOLIDE profond	OUI	OUI si positif en PCR
7 METHA RANCOURT DIGESTAT LIQUIDE 1	OUI	OUI si positif en PCR
8 METHA RANCOURT DIGESTAT LIQUIDE 2	OUI	OUI si positif en PCR
9 METHA CHARMOIS DIGESTAT LIQUIDE 1	OUI	OUI si positif en PCR
10 METHA CHARMOIS DIGESTAT LIQUIDE 2	OUI	OUI si positif en PCR

ANALYSES ENVOYÉES AU LABO BIO SELLAL		
		LDVA des Vosges
Demande du GDS 88 prélèvements réalisés le 11/4/17 par Carine HAAS <div style="text-align: center;">METHANISATION ET PARATUBERCULOSE</div> nom du prélèvements de digestats		
1	METHA COUSSEY DIGESTAT SOLIDE extérieur BS	donné à Bio Sellal
2	METHA COUSSEY DIGESTAT SOLIDE profond BS	donné à Bio Sellal
3	METHA COUSSEY DIGESTAT LIQUIDE 1 BS	donné à Bio Sellal
4	METHA COUSSEY DIGESTAT LIQUIDE 2 BS	donné à Bio Sellal
5	METHA RANCOURT DIGESTAT SOLIDE extérieur BS	donné à Bio Sellal
6	METHA RANCOURT DIGESTAT SOLIDE profond BS	donné à Bio Sellal
7	METHA RANCOURT DIGESTAT LIQUIDE 1 BS	donné à Bio Sellal
8	METHA RANCOURT DIGESTAT LIQUIDE 2 BS	donné à Bio Sellal
9	METHA CHARMOIS DIGESTAT LIQUIDE 1 BS	donné à Bio Sellal
10	METHA CHARMOIS DIGESTAT LIQUIDE 2 BS	donné à Bio Sellal

Résultats biosellal du 15/5/17 sans congélation				
Nom de l'échantillon	Ct cible MAP	Ct cible IPC	Concentration MAP (GE/g de digestat)	Echantillon
Digestat 2	undet	27,97	/	sec +
Digestat 1	undet	29,15	/	sec ++
Digestat 2	undet	27,97	/	sec +
Digestat 3	31,37	27,99	1,40E+04	liquide +
Digestat 4	30,79	27,82	2,10E+04	liquide +
Digestat 5	34,48	28,23	1,54E+03	sec +
Digestat 6	33,48	27,9	3,12E+03	sec +
Digestat 7	33,76	28	2,56E+03	liquide ++
Digestat 8	33,48	28,2	3,12E+03	liquide ++
Digestat 9	31,52	27,98	1,25E+04	liquide +
Digestat 10	31,3	27,46	1,46E+04	liquide +

Résultats du LVDA 88

N°Animal	PARATUBPCR 14/04/2017 *
COUSSEY SOL EXT	ND
COUSSEY SOL PROF	ND
COUSSEY LIQUIDE 1	D (Ct=34)
COUSSEY LIQUIDE 2	D (Ct=32)
RANCOURT SOL EXT	D (Ct=37)
RANCOURT SOL PROF	D (Ct=35)
RANCOURT LIQ 1	D (Ct=35)

NOMBRE DE PRELEVEMENTS : 10 DIGESTAT
 DATE DE PRELEVEMENT : 11/04/2017

REMARQUE :

N°Animal	PARATUBPCR 14/04/2017 *
RANCOURT LIQ 2	D (Ct=38)
CHARMOIS LIQ 1	D (Ct=32)
CHARMOIS LIQ 2	D (Ct=33)

Facture HT LVD88 : 241.83 € / les PCR

Frais d'envoi des prélèvements au LABOCEA : 94.72 HT

Culture liquide au laboratoire LABOCEA

Commande N° :

Date de prélèvement : 11/04/2017

Bordereau N° : 137939



Date de réception des échantillons : 18/04/2017

Nombre de prélèvements : 10

Date de validation du dossier : 06/06/2017

Ce rapport d'essai comporte 1 page(s) page 1/1

N° Animal <i>Age ou rang portée</i>	Tube	<i>F57qPCRT60</i> 06/06/2017	<i>IS900PCRT</i> 06/06/2017				
M COUSSEY DSEX	1	neg	neg				
M COUSSEY DSPR	2	neg	neg				
M COUSSEY DL1	3	neg	neg				
M COUSSEY DL2	4	neg	39 (Ct)				
M RANCOURT DSE	5	neg	neg				
M RANCOURT DSP	6	neg	neg				
M RANCOURT DL1	7	neg	neg				
M RANCOURT DL2	8	neg	neg				
M CHAMOIS DL1	9	neg	neg				
M CHAMOIS DL2	10	12913 copies/ml	34 (Ct)				

Bilan des résultats obtenus SANS congélation des DIGESTATS juin 2017

Echantillons juin 2017	Résultats PCR LVD88 14-4-17	Résultats PCR biosellal 15-5-17 Ct cibleMAP	Résultats PCR biosellal 15-5-17 CT cible IPC	Biosellal 15/5/17 concentration MAP (GE /gde digestat)	Culture Liquide et PCR treck LABOCEA 6-6-17 F57qPCRT60	Culture Liquide et PCR treck LABOCEA 6-6-17 IS900PCRT
P1 Digestats solide prélèvement à l'extérieur du tas COUSSEY ABCD	ND	undet	29.15	0	neg	neg
P2 Digestats solide prélèvement en profondeur (compost chauffé) du tas COUSSEY ABCD	ND	undet	27.97	0	neg	neg
P3 Digestats liquide prélèvement dans la méthanisation en fin de digestaion COUSSEY ABCD	D ct 34	31.37	27.99	1.4.10⁴	neg	neg
P4 Digestats liquide prélèvement dans la méthanisation reste 45 jours de digestion COUSSEY ABCD	D ct 32	30.79	27.82	2.1.10⁴	neg	D ct 39
P5 Digestats solide pris à l'extérieur du tas RANCOURT EF	D ct 37	34.48	28.23	1.5.10³	neg	neg
P6 Digestats solide pris à l'intérieur (très chaud) du tas RANCOURT	D ct 35	33.48	27.9	3.12.10³	neg	neg
P7 Digestats liquide Rancourt EF	D ct 35	33.76	28	2.56.10³	neg	neg
P8 Digestats liquide Rancourt EF	D ct 38	33.48	28.2	3.12.10³	neg	neg
P9 Digestats liquide en sortie de lagunage CHARMOIS L'Orgueilleux GHIJK	D ct 32	31.52	27.98	1.25.10⁴	neg	neg
P10 Digestats liquide en sortie de lagunage CHARMOIS L'Orgueilleux GHIJK	D ct 33	31.3	27.6	1.46.10⁴	12913 copies/ml	D ct34

Sur 7 échantillons de digestats positifs en PCR classique fait en mai 2015

Mai 2015		Mise en culture liquide de 42 jours	
Digestats positifs	PCR en temps réel	F57qPCRT	IS900PCRT
GHIJK1 CHARMOIS	Pos ct 35	neg	Pos ct 37
GHIJK2 CHARMOIS	Pos ct 36	neg	Neg
ABCD1 COUSSEY	Pos ct 36	neg	Neg
ABCD4 COUSSEY	Pos ct 38	neg	Neg
EF1 RANCOURT	Pos ct 35	ADN<LQ	Neg
EF2 RANCOURT	Pos ct 36	neg	Neg
EF4 RANCOURT	Pos ct 34	neg	Neg
ABCD 2 COUSSEY	nég	Pas mis en culture	
ABCD 3 COUSSEY	ininterprétable	Pas mis en culture	

Pas de différence significatives entre les 2 résultats 2015 et 2017

Conclusion :

Que les prélèvements soient congelés ou pas la mycobactérie est présente dans les prélèvements de digestats : PCR positives,
Elle est aussi vivante mais en faible quantité : culture liquide avec des résultats négatifs ou très faiblement positifs, avec identification par PCR des mycobactéries.

La mycobactérie paratuberculosis est retrouvée en PCR dans les digestats de toutes les méthanisations quand la paratuberculose sévit dans les exploitations d'origine des effluents. Elle est retrouvée vivante en infime quantité : culture négative ou faiblement dépistée.

Restera à se poser les questions suivantes :

- ⇒ Est-ce que la présence d'une infime quantité de mycobactérie suffit à la contamination des animaux (jeunes – vieux) ?

- ⇒ Et savoir orienter les conseils pour limiter les risques de contamination par l'environnement d'animaux non issus de cheptels touchés.
 - Eviter l'épandage de digestat dans les parcelles de jeunes animaux : prairie et foin ?
 - Limiter la contamination des effluents en essayant d'assainir les exploitations en amont

Tous nos remerciements aux éleveurs participants à cette étude.