

ENQUÊTE SUR LA PRÉVALENCE DES MYCOPLASMES DANS LE LAIT DE RÉSERVOIR DES TROUPEAUX DE BOVINS LAITIERS DU QUÉBEC

présenté par

Luc Bergeron

Direction de la santé animale et de l'inspection des viandes
Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation

David Francoz

Faculté de médecine vétérinaire
Université de Montréal

Marie Nadeau

Direction de la santé animale et de l'inspection des viandes
Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation

RAPPORT FINAL

Décembre 2010

Résumé

Le but de cette étude était de dresser le portrait de la situation concernant la mycoplasmosse bovine au Québec. Pour ce faire, le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, en collaboration avec la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal (FMV), a prévu la mise en place d'une enquête de prévalence. L'objectif spécifique était d'estimer la prévalence des mycoplasmes dans le lait de réservoir des troupeaux de bovins laitiers du Québec.

Entre avril et octobre 2009, des échantillons de lait de réservoir ont été prélevés par les médecins vétérinaires praticiens de l'Association des Médecins Vétérinaires Praticiens du Québec. La sélection des troupeaux participants s'est faite parmi tous les troupeaux de bovins laitiers du Québec, de façon aléatoire et de manière à ce que chacune des régions du Québec soit représentée. Au total, 117 troupeaux ont participé à cette enquête et 3 échantillons ont été prélevés pour chaque troupeau, soit 1 échantillon par mois. Les échantillons ont ensuite été acheminés au Laboratoire d'expertise en pathologie animale du Québec. Ils ont d'abord été analysés par culture bactérienne pour la recherche des mycoplasmes, puis l'espèce des isolats a été déterminée à l'aide de l'immunofluorescence indirecte. Ils ont aussi été analysés avec la technique par PCR pour la recherche et l'identification des mycoplasmes au Laboratoire de biologie moléculaire de la FMV. Pour qu'un troupeau soit considéré comme positif, le résultat devait être positif pour au moins un des trois échantillons à la suite de l'une ou l'autre de ces analyses.

À partir de ces résultats d'analyse, la prévalence des mycoplasmes dans le lait de réservoir des troupeaux de bovins laitiers du Québec a été estimée à 3,42 % (4/117; intervalle de confiance : 0,94 % - 8,50 %). Trois des quatre troupeaux positifs étaient des élevages de la même région du Québec, soit Chaudière-Appalaches.

Mots-clés : mycoplasmosse, mycoplasme, *Mycoplasma bovis*, enquête sur la prévalence, bovins laitiers, lait de réservoir

Abstract

The purpose of this study was to examine the bovine mycoplasmosis situation in the province of Québec. The Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, in collaboration with the University of Montréal Faculty of Veterinary Medicine (FMV), decided to conduct a prevalence survey. The specific objective was to estimate the prevalence of mycoplasmas in bulk tank milk in Québec dairy herds.

Between April and October 2009, bulk tank milk samples were taken by veterinary practitioners from the Québec Association of Veterinary Practitioners. The herds were randomly selected within all Québec dairy herds in a manner such that each region of the province of Québec was represented. A total of 117 herds participated in the survey and three samples, one per month, were taken from each herd. The samples were sent to the Québec Animal Pathology Laboratory. They were first analyzed by bacterial culture to search for mycoplasmas and the isolates were then identified to species using indirect immunofluorescence analysis. The samples were also analyzed by PCR at the FMV Molecular Biology Laboratory to search for and identify mycoplasmas. For a herd to be considered positive, at least one of the three samples had to be positive to either of these analyses.

Based on these results, the prevalence of mycoplasmas in bulk tank milk in Québec dairy herds was estimated at 3.42 % (4/117; confidence interval: 0.94 % - 8.50 %). Three of the four herds that tested positive were located in the same region of Québec, namely Chaudière-Appalaches.

Keywords : mycoplasmosis, mycoplasmas, *Mycoplasma bovis*, prevalence survey, dairy cattle, bulk tank milk

Table des matières

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT.....	IV
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES TABLEAUX	VIII
REMERCIEMENTS	IX
CHAPITRE 1. INTRODUCTION.....	1
1.2. DÉFINITION DE LA PROBLÉMATIQUE.....	1
1.2. OBJECTIF DE L'ENQUÊTE	2
CHAPITRE 2. RECENSION DE LA LITTÉRATURE	3
2.1. INTRODUCTION.....	3
2.2. MYCOPLASMES RESPONSABLES DE MAMMITES CHEZ LES BOVINS	4
2.3. PRÉVALENCE DES MAMMITES À MYCOPLASMES	5
2.4. INTRODUCTION DE L'INFECTION ET TRANSMISSION DANS L'ÉLEVAGE.....	6
2.4.1. <i>Transmission horizontale</i>	6
2.4.2. <i>Transmission verticale</i>	7
2.5. SIGNES CLINIQUES.....	8
2.6. ANALYSES MICROBIOLOGIQUES	9
2.6.1. <i>Culture bactérienne</i>	9
2.6.2. <i>Techniques par PCR</i>	10
2.6.3. <i>Recherche d'anticorps</i>	11
2.7. DIAGNOSTIC DE L'INFECTION DANS UN TROUPEAU ET IDENTIFICATION DES VACHES PORTEUSES.....	12
2.7.1. <i>Résultats faux positifs et faux négatifs</i>	12
2.7.2. <i>Stratégies diagnostiques</i>	13
2.8. TRAITEMENT DES MAMMITES À MYCOPLASMES.....	13
2.9. CONTRÔLE ET PRÉVENTION DES MAMMITES À MYCOPLASMES	14
2.9.1. <i>Identification et élimination des animaux porteurs</i>	14
2.9.2. <i>Contrôle des animaux introduits dans le troupeau</i>	15
2.9.3. <i>Bonnes pratiques de traite</i>	15
2.9.4. <i>Contrôle de l'infection chez les veaux</i>	16
2.9.5. <i>Vaccination</i>	16

CHAPITRE 3. MÉTHODOLOGIE	17
3.1. MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE	17
3.2. TRAITEMENT DES DONNÉES	17
3.3. COLLECTE DES DONNÉES	18
3.3.1. <i>Sélection des troupeaux</i>	18
3.3.2. <i>Échantillonnage des laits de réservoir</i>	20
3.3.2.1. Méthode d'échantillonnage des laits de réservoir	21
3.3.2.2. Nombre d'échantillons de lait de réservoir par troupeau.....	21
3.4. ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES ÉCHANTILLONS	21
3.4.1. <i>Sélection des microorganismes pathogènes à analyser</i>	21
3.4.2. <i>Méthode d'analyse microbiologique des laits de réservoir</i>	22
3.4.2.1. Recherche des mycoplasmes par culture bactérienne.....	22
3.4.2.2. Recherche des mycoplasmes par PCR	22
3.4.2.3. Recherche de <i>Staphylococcus aureus</i> et de <i>Streptococcus agalactiae</i> par culture bactérienne	23
CHAPITRE 4. RÉSULTATS	24
4.1. DESCRIPTION DES TROUPEAUX ÉCHANTILLONNÉS	24
4.2. PRÉVALENCE DES MYCOPLASMES DANS LE LAIT DE RÉSERVOIR	26
4.2.1. <i>Prévalence des mycoplasmes dans le lait de réservoir : recherche par culture bactérienne</i>	27
4.2.2. <i>Prévalence des mycoplasmes dans le lait de réservoir : recherche par PCR</i>	27
4.2.3. <i>Prévalence des mycoplasmes dans le lait de réservoir</i>	28
4.3. PRÉVALENCE DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ET DE <i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i> DANS LE LAIT DE RÉSERVOIR	29
4.3.1. <i>Prévalence de Staphylococcus aureus dans le lait de réservoir</i>	29
4.3.2. <i>Prévalence de Streptococcus agalactiae dans le lait de réservoir</i>	30
CHAPITRE 5. DISCUSSION	32
5.1. PRÉVALENCE DES MYCOPLASMES DANS LE LAIT DE RÉSERVOIR	32
5.2. COMPARAISON DES MÉTHODES D'ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES LAITS DE RÉSERVOIR	33
CHAPITRE 6. CONCLUSION.....	36
BIBLIOGRAPHIE.....	37
ANNEXE 1 : QUESTIONNAIRE.....	I

ANNEXE 2 : PROCÉDURE D'ÉCHANTILLONNAGE..... VI

Liste des tableaux

TABLEAU I. NOMBRE DE TROUPEAUX SÉLECTIONNÉS PAR RÉGION ADMINISTRATIVE DU QUÉBEC	20
TABLEAU II. NOMBRE DE TROUPEAUX ÉCHANTILLONNÉS PAR RÉGION ADMINISTRATIVE DU QUÉBEC	26
TABLEAU III. RÉSULTATS DE LA RECHERCHE ET DE L'IDENTIFICATION DES MYCOPLASMES PAR CULTURE BACTÉRIENNE ET PAR PCR POUR LES TROUPEAUX POSITIFS	28
TABLEAU IV. PRÉVALENCE DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> DANS LE LAIT DE RÉSERVOIR SELON LA RÉGION ADMINISTRATIVE DU QUÉBEC	30
TABLEAU V. PRÉVALENCE DE <i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i> DANS LE LAIT DE RÉSERVOIR SELON LA RÉGION ADMINISTRATIVE DU QUÉBEC	31

Remerciements

Les auteurs désirent remercier D^r Michel Donnelly, directeur général de l'Association des Médecins Vétérinaires Praticiens du Québec (AMVPQ), ainsi que tous les médecins vétérinaires praticiens et producteurs qui ont participé à l'enquête.

Des remerciements sont aussi adressés à Mélanie Trudel, Geneviève Arruda, D^{re} Geneviève Côté, Audrey Lambert, Ariane Boivin, D^{re} Julie-Hélène Fairbrother et D^{re} Olivia Labrecque du ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, à Guy Beauchamp et Donald Tremblay de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, et à D^r Jérôme Carrier de l'AMVPQ.

Chapitre 1. Introduction

1.2. Définition de la problématique

De novembre 2007 à février 2008, 14 fiches de signalement à propos de suspicions de problèmes du système respiratoire ou de mammites associés à *Mycoplasma bovis* ont été envoyées au ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation dans le cadre du Programme d'amélioration de la santé animale au Québec. Onze de ces fiches concernaient des bovins laitiers et la plupart faisait état de l'achat récent d'animaux. *Mycoplasma bovis* a été isolé dans le système respiratoire ou le pis des animaux dans neuf de ces cas.

En Amérique du Nord et en Europe, *Mycoplasma bovis* est le mycoplasme le plus souvent isolé dans les cas de mycoplasmoses et il s'agit de l'un des mycoplasmes considérés comme les plus pathogènes (Nicholas and Ayling 2003). Ce microorganisme peut causer une mammite purulente chronique chez les bovins adultes ainsi que des otites, des pneumonies et de l'arthrite chez les veaux. De jeunes bovins cliniquement en santé peuvent être porteurs de *Mycoplasma bovis* et l'excréter dans leurs sécrétions nasales pendant des mois, voire des années. Le lait de vaches adultes d'apparence saine peut également contenir cet agent infectieux.

La principale voie d'introduction des mycoplasmes dans un troupeau est l'achat d'animaux infectés. Les animaux s'infectent en ingérant du lait contaminé ou en ayant un contact étroit avec d'autres animaux infectés. Ces agents pathogènes affectent non seulement les troupeaux laitiers, mais aussi les troupeaux vaches-veaux. Il peut également toucher tous les secteurs en aval tels les parcs d'engraissement ainsi que les élevages de veaux de lait et de grain.

Les pertes économiques associées aux mycoplasmes sont donc importantes pour l'industrie bovine. Comme le traitement de la mycoplasmoses est infructueux dans la majorité des cas et qu'il n'existe pas de vaccin efficace, la prévention demeure l'élément clé. Lors de l'achat de bovins laitiers, l'identification des animaux porteurs et excréteurs fait partie des mesures préventives importantes.

On trouve peu de données sur la prévalence ou l'incidence de la mycoplasmosse bovine chez les bovins laitiers au Canada dans la littérature. Il est donc difficile de dresser le portrait de la situation actuelle concernant la mycoplasmosse bovine chez les bovins laitiers du Québec.

1.2. Objectif de l'enquête

Le but de cette étude est de dresser le portrait de la situation concernant la mycoplasmosse bovine au Québec. Pour ce faire, le Ministère a prévu la mise en place d'une enquête de prévalence. L'objectif spécifique est d'estimer la prévalence des mycoplasmes dans le lait de réservoir des troupeaux de bovins laitiers du Québec.

Chapitre 2. Recension de la littérature

2.1. Introduction

Le terme mycoplasme (en forme de fongus) est souvent utilisé pour désigner les bactéries appartenant à la classe des mollicutes (« peau molle »). Chez les bovins, les mycoplasmes sont à l'origine d'infections respiratoires, articulaires, mammaires, génitales, oculaires et otiques (Walker 1999). *Mycoplasma bovis* est actuellement l'espèce de mycoplasme la plus souvent isolée lors de mycoplasmose en Amérique du Nord et en Europe (Nicholas and Ayling 2003). Il est ainsi considéré comme une des principales causes de pneumonies, d'otites et d'arthrites septiques chez les génisses de remplacement au Québec. Au cours des dernières années, la communauté scientifique a porté une attention particulière aux infections à mycoplasmes chez l'espèce bovine. Des sections réservées sont même prévues lors des grands congrès internationaux.

Le premier rapport sur un cas de mammite associée à un mycoplasme a été fait en Angleterre par Davidson et Stuart (1960) à la suite de l'isolement de *Mycoplasma bovigenitalium*. L'année suivante, le premier cas de mammite à *Mycoplasma bovis*, anciennement nommé *Mycoplasma agalactiae var bovis*, était rapporté aux États-Unis (Hale et al. 1962). Depuis, de nombreuses autres espèces de mycoplasmes ont été isolées dans le lait de vaches atteintes d'une mammite à travers le monde (Fox et al. 2005, Gonzalez and Wilson 2003).

Il est bien admis que les infections à mycoplasmes entraînent d'importantes pertes économiques pour la filière bovine. En ce qui concerne les mammites, peu de statistiques ont été publiées. Toutefois, aux États-Unis, on estime que les pertes dues aux mammites à *Mycoplasma bovis* se chiffrent à plus de 108 millions de dollars par année (Nicholas and Ayling 2003).

2.2. Mycoplasmes responsables de mammites chez les bovins

À l'heure actuelle, plus d'une trentaine d'espèces de mycoplasmes ont été isolées chez les bovins. Parmi celles-ci, douze sont associées à des mammites ou ont causé expérimentalement une mammité. Il s'agit de *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovigenitalium*, *Mycoplasma alkalescens*, *Mycoplasma F38*, *Mycoplasma canadense*, *Mycoplasma californicum*, *Mycoplasma dispar*, *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma* sp. groupe 7, ainsi qu'*Acheloplasma laidlawii* et *Acheloplasma xanthum* (Gonzalez and Wilson 2003). *Mycoplasma bovoculi*, *Mycoplasma canis*, *Mycoplasma gallinarum* ont également été détectés dans des échantillons de lait, mais on ne spécifiait pas s'il s'agissait de cas de mammites (Ayling et al. 2004).

Mycoplasma bovis est de loin l'espèce la plus isolée, quelle que soit la région du monde (Gonzalez and Wilson 2003). Des cas de mammites à *Mycoplasma californicum*, à *Mycoplasma canadense* et à *Mycoplasma bovigenitalium* sont régulièrement rapportés, mais, selon la région du monde, à une fréquence moindre et plus variable que les mammites causées par *Mycoplasma bovis*. *Mycoplasma* sp. groupe 7 et *Mycoplasma alkalescens* sont détectés encore moins souvent et les autres espèces ne sont signalées que de façon sporadique (Gonzalez and Wilson 2003).

Lorsque des cas de mammites apparaissent dans un élevage, plusieurs espèces de mycoplasmes peuvent être détectées. Toutefois, la plupart du temps, les mycoplasmes sont les seuls agents isolés. Il arrive néanmoins que *Mycoplasma bovis* soit isolé simultanément à d'autres agents pathogènes mammaires. Ceux-ci peuvent être majeurs (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* et *Streptococcus uberis*) ou mineurs. Ainsi, on croit que *Mycoplasma bovis* pourrait augmenter la sensibilité de la glande mammaire aux infections causées par d'autres agents pathogènes (Bayoumi et al. 1988, Ghadersohi et al. 1999).

2.3. Prévalence des mammites à mycoplasmes

Des mammites à mycoplasmes ont été rapportées dans différents pays, notamment les États-Unis, le Canada, l'Australie, l'Irlande du Nord, l'Angleterre, l'Allemagne, les Pays-Bas, la Grèce, la France, l'Arabie saoudite, Israël, l'Inde et la République de Corée. Même si de nombreux auteurs s'accordent pour dire qu'il s'agit d'un problème en pleine expansion à travers le monde, son importance varie beaucoup d'un pays à l'autre (Feldmann et al. 2003, Fox et al. 2005, Ghadersohi et al. 1999, Gonzalez and Wilson 2003). Malheureusement, pour beaucoup de pays, il n'existe aucune donnée sur les prévalences individuelles et de troupeau des mammites à mycoplasmes. De plus, il peut être difficile de comparer les études qui ont été réalisées, car elles n'utilisent pas toutes la même méthodologie (lait de réservoir versus lait individuel; recherche par culture bactérienne versus recherche par PCR).

Au Canada, Olde Riekerink et al. (2006) rapportent une prévalence de troupeau de 1,9 % (5/258) pour *Mycoplasma* spp., dans une étude effectuée à partir d'échantillons de lait de réservoir de fermes laitières de l'Île-du-Prince-Édouard. Dans une autre étude réalisée en Ontario à partir d'échantillons de lait individuel provenant de vaches atteintes d'une mammite et soumis à un laboratoire universitaire dans le cadre de ses activités habituelles, Cai et al. (2005) mentionnent que 3 % (6/201) des troupeaux testés étaient contaminés par des mycoplasmes. Il y a plus de 30 ans, une autre étude ontarienne menée sur des échantillons de lait individuel a révélé que sur 64 troupeaux testés, 33 (51,5 %) étaient positifs à *Mycoplasma bovis* (Ruhnke et al. 1976).

Aux États-Unis, des études réalisées à partir de lait de réservoir montrent que dans 1,2 % à 9,4 % des troupeaux, au moins une vache a une infection intramammaire (IIM) à mycoplasmes (Anonyme 2003, Fox et al. 2003, Jasper et al. 1979, Kirk and Lauerman 1994, Kirk et al. 1997, Wilson et al. 2009). De plus, une recherche menée dans deux états australiens a indiqué que sur 186 et 167 troupeaux dont le lait de réservoir a été testé, 81

(43,5 %) et 103 (62,4 %) étaient infectés par *Mycoplasma bovis* (Ghadersohi et al. 1999). Aussi, en Allemagne, une autre étude a montré que le lait de réservoir de 27 troupeaux laitiers avec un haut comptage de cellules somatiques sur 65 (41,5 %) contenait des mycoplasmes (Feldmann et al. 2003). En Irlande du Nord, on a trouvé des vaches atteintes d'une IIM à *Mycoplasma bovis* dans 8 troupeaux sur 197 (5,6 %) testés entre 1993 et 1998 (Brice et al. 2000). En Grèce, sur 37 troupeaux testés, deux ont présenté des animaux avec une IIM à *Mycoplasma bovis*. Il est à noter que les auteurs de cette étude rapportent que tous les animaux positifs ont été importés d'autres pays européens (Filioussis et al. 2007).

Dans un troupeau positif, le nombre de vaches présentant une IIM causée par un mycoplasme varie beaucoup. Au Canada, une étude ontarienne a montré que de 15 % à 40 % des vaches provenant de troupeaux contaminés par des mycoplasmes étaient infectées (Ruhnke et al. 1976). Lors d'une étude menée en Australie, 61 des 90 vaches (67,7 %) d'un même troupeau testées individuellement étaient positives (Ghadersohi et al. 1999). En Allemagne, l'analyse du lait de chaque vache en lactation dans 4 troupeaux dont le lait de réservoir était positif aux mycoplasmes a montré une prévalence individuelle de 0 % à 11,7 % (Feldmann et al. 2003).

2.4. Introduction de l'infection et transmission dans l'élevage

2.4.1. Transmission horizontale

Les mammites à mycoplasmes sont considérées comme des mammites contagieuses au même titre que les mammites causées par *Staphylococcus aureus*. Par conséquent, la transmission de l'agent pathogène d'une vache infectée à une autre se fait principalement lors de la traite, notamment par le matériel de traite et les mains du trayeur (Jasper 1977). L'achat d'un animal infecté et porteur asymptomatique de mycoplasmes dans le pis permettrait l'introduction de l'infection dans un troupeau, puis sa propagation lors de la traite (Gonzalez and Wilson 2003).

2.4.2. Transmission verticale

De nombreux articles rapportent néanmoins des cas de mammites à mycoplasmes dans des troupeaux complètement fermés et auxquels aucun nouvel animal n'avait été introduit depuis de nombreuses années (Fox et al. 2005). De plus, la prévalence des mammites à mycoplasmes augmente aux États-Unis, malgré la mise en place de mesures de contrôle pour d'autres mammites contagieuses à transmission horizontale comme celles causées par *Staphylococcus aureus*.

D'autres mécanismes sont donc à l'origine des mammites à mycoplasmes. Il faut savoir que de nombreux animaux peuvent être porteurs asymptomatiques de mycoplasmes dans d'autres parties de leur organisme, comme la cavité nasale ou le tractus urogénital (Fox et al. 2005, Gonzalez and Wilson 2003). Par exemple, différentes espèces de mycoplasmes colonisent fréquemment la cavité nasale des veaux. La vache peut transmettre des mycoplasmes à son petit *in utero* ou lors du vêlage par des sécrétions vaginales infectées. Les veaux peuvent également devenir porteurs en consommant du lait contaminé. Des études montrent que les cavités nasales des veaux nourris avec du lait infecté par *Mycoplasma bovis* sont fortement colonisées par cette bactérie (Bennett and Jasper 1977, Pfutzner and Sachse 1996). Ces animaux peuvent alors excréter *Mycoplasma bovis* de façon importante au moins jusqu'à l'âge d'un an, puis contaminer leur descendance lors de leur première mise bas (Pfutzner and Sachse 1996). Ainsi, un cercle vicieux d'infection se crée dans le troupeau.

Deux hypothèses sont émises pour expliquer le rôle que pourraient jouer ces porteurs asymptomatiques dans l'apparition de mammites à mycoplasmes dans un élevage. Premièrement, il pourrait y avoir un transfert mécanique (contamination de l'environnement, léchage) de ces sites infectés vers le trayon et la glande mammaire de l'animal porteur ou d'une congénère. Deuxièmement, la transmission pourrait s'effectuer par une propagation interne de l'infection, par voie hématogène ou lymphatique. En effet,

les mycoplasmes sont capables de survivre dans certaines cellules de leur hôte, comme les macrophages, de se disséminer dans l'organisme à partir de foyers d'infection primaires et de se loger dans la glande mammaire. Une fois cette dernière infectée, l'IIM se propagerait dans le troupeau par la contamination des vaches entre elles lors de la traite (Fox et al. 2005). Ces deux mécanismes possibles de propagation sont donc importants à considérer en raison de la présence considérable de mycoplasmes chez les veaux et les jeunes taures et de leur rôle potentiel dans la transmission de la maladie. Ainsi, il est possible que des mammites à mycoplasmes apparaissent même dans les troupeaux fermés (Fox et al. 2005, Gonzalez and Wilson 2003). Le contrôle du statut de la glande mammaire des taures suite au vêlage devrait être fait de routine, puisqu'elles sont une source potentielle de nouvelles IIM dont les infections à mycoplasmes (Gonzalez and Wilson 2003). De plus, si la contamination de la glande mammaire s'effectue par voie interne à partir d'un autre site infecté, il devient très difficile de mettre en place des moyens de prévention efficaces (Fox et al. 2005).

2.5. Signes cliniques

De toutes les mammites à mycoplasmes, ce sont les mammites causées par *Mycoplasma bovis* qui présentent les signes cliniques les plus sévères. Le tableau clinique des mammites dues aux autres mycoplasmes est similaire, mais moins sévère (Jasper 1977). Des vaches de tout âge peuvent être affectées, et ce, à tous les stades de la lactation. Toutefois, celles ayant vêlé depuis peu de temps semblent être plus gravement atteintes.

Les signes cliniques sont très variables et non pathognomoniques. Il y a notamment une diminution substantielle de la production lactée, puisque l'on peut observer jusqu'à 90 % de baisse en 12 heures. Le lait peut changer d'apparence, c'est-à-dire contenir de simples grumeaux ou devenir purulent avec des caillots de fibrine. Il peut prendre une coloration normale ou brunâtre, ou encore ressembler à du sérum. Les signes de mammite clinique peuvent durer de deux à huit semaines. D'habitude, la mamelle est enflée et

indurée, mais il n'y a pas de chaleur ni de douleur. D'un à quatre quartiers peuvent être affectés en même temps, mais en règle générale, deux ou quatre quartiers sont touchés (Jasper 1977). La contamination des autres quartiers peut se faire par voie ascendante ou par voie hématogène. Malgré cela, l'état général de l'animal est la plupart du temps bon. Il y a très peu de signes systémiques, l'animal continuant à s'abreuver et à s'alimenter normalement (Gonzalez and Wilson 2003). Le retour à la production est possible, mais lent (de trois à quatre semaines) et variable. De plus, il dépendra beaucoup du stade de la lactation. L'effet sur la production de lait peut être considérable et même aller jusqu'au tarissement (Jasper 1977).

2.6. Analyses microbiologiques

Différentes méthodes de laboratoire sont disponibles pour établir un diagnostic d'IIM à mycoplasmes. Il s'agit principalement de la culture bactérienne, de l'identification du matériel génétique par PCR ou de l'identification des anticorps (Fox et al. 2005).

2.6.1. Culture bactérienne

Différentes précautions doivent être prises lorsque la recherche de mycoplasmes est demandée dans un échantillon de lait. Il est très important que le prélèvement soit fait dans des conditions d'asepsie rigoureuses afin d'éviter toute contamination. En effet, la surcroissance d'autres populations bactériennes peut sérieusement compromettre la survie des mycoplasmes dans l'échantillon et il peut être difficile, voire impossible, d'identifier les colonies de mycoplasmes lors de la culture sur gélose si d'autres bactéries sont présentes (Gonzalez and Wilson 2003). De plus, les mycoplasmes sont sensibles à la décongélation et aux trop longs délais entre l'échantillonnage et l'analyse (Boddie et al. 2002). Il faut donc travailler sur des échantillons les plus frais possible. Une fois prélevé, l'échantillon de lait doit être réfrigéré et acheminé au laboratoire de diagnostic dans les plus brefs délais. Si un délai de plus de 48 heures est prévu, il faut congeler l'échantillon, si possible à des

températures de -30 °C ou moins (Gonzalez and Wilson 2003). La décongélation doit alors se faire tranquillement à la température ambiante (Boddie et al. 2002).

Leur génome étant de petite taille, les mycoplasmes ont une capacité de biosynthèse limitée. Leur croissance est lente (de 2 à 5 jours, mais parfois jusqu'à 21 jours pour certaines espèces) et il est nécessaire d'utiliser des milieux de culture spécifiques (gélose Hayflick). On doit donc s'assurer que le laboratoire diagnostique est capable de faire ce type de culture et bien spécifier que la culture de mycoplasmes est demandée. Certains chercheurs recommandent de faire incuber le lait dans un bouillon d'enrichissement avant de le mettre sur une gélose afin de diminuer les résultats faux négatifs (Fox et al. 2005). Il faut une période d'incubation d'au moins sept jours avant de pouvoir considérer la culture comme négative.

Il est nécessaire par la suite de faire identifier l'espèce de mycoplasme isolée (Fox et al. 2005, Gonzalez and Wilson 2003) pour s'assurer qu'il s'agit bien d'un pathogène mammaire. Cette identification se fait dans des laboratoires spécialisés au moyen de techniques sérologiques ou d'inhibition de croissance, ou encore par PCR. L'identification par PCR est désormais considérée comme le « gold standard ».

2.6.2. Techniques par PCR

De plus en plus de laboratoires diagnostiques offrent désormais des services de recherche et d'identification des mycoplasmes dans le lait au moyen des techniques par PCR. Ces dernières présentent plusieurs avantages par rapport à la culture bactérienne. D'abord, le résultat est obtenu beaucoup plus rapidement, car l'analyse par PCR ne nécessite que quelques heures par comparaison à plusieurs jours ou semaines pour la culture (Fox et al. 2005). Ensuite, ces techniques seraient plus sensibles et permettent de diminuer les résultats faux négatifs (Fox et al. 2005). Enfin, selon les sondes d'ADN utilisées pour l'amplification, il est possible d'identifier immédiatement l'espèce de mycoplasmes (Fox et al. 2005). À l'opposé, l'utilisation de sondes universelles, c'est-à-dire

celles qui détectent la présence d'ADN de mycoplasmes sans en déterminer l'espèce, peut être à l'origine de faux positifs si la confirmation de l'espèce n'est pas faite par la suite. Soulignons cependant que la disponibilité et le coût de ces techniques limitent leur utilisation. De plus, la fiabilité des analyses est parfois incertaine, car celles-ci peuvent donner des résultats qui ne concordent pas avec ceux de la culture. Notons toutefois qu'il s'agit d'un domaine en pleine évolution et que l'on peut, dans certains cas, effectuer des analyses par PCR à des coûts moindres que les analyses par culture. Enfin, la seule information que les techniques par PCR fournissent est la présence ou non de l'ADN recherché dans l'échantillon. Cet ADN peut provenir autant d'organismes viables que d'organismes non viables, si bien que l'on peut toujours se questionner sur son rôle réel dans le développement de la maladie.

2.6.3. Recherche d'anticorps

La recherche d'anticorps contre les mycoplasmes peut se faire dans le sang ou directement dans le lait (Fox et al. 2005). Elle revêt très peu d'intérêt pour le diagnostic clinique de la maladie. La présence d'anticorps dans le lait, quant à elle, est plus spécifique d'une IIM à mycoplasmes. Toutefois, elle doit être confirmée avec une des techniques précédentes (Fox et al. 2005), et il n'existe que très peu de laboratoires qui fournissent cette analyse à l'échelle commerciale. La recherche d'anticorps dans le lait pourrait par contre être très intéressante pour exercer un contrôle lors d'achat d'animaux, car elle permet un résultat rapide, elle est peu coûteuse et elle indique s'il y a eu ou non une exposition préalable à *Mycoplasma bovis*.

2.7. Diagnostic de l'infection dans un troupeau et identification des vaches porteuses

2.7.1. Résultats faux positifs et faux négatifs

La recherche de mycoplasmes dans le lait de réservoir, à partir d'échantillons de lait de vaches avec une mammite clinique ou un comptage cellulaire élevé, peut permettre de déterminer le statut d'un troupeau. Un résultat négatif ne signifie cependant pas que le troupeau est indemne et que le risque de mammites est absent. En effet, comme cela a été mentionné auparavant, le risque de mammites à mycoplasmes existe toujours en raison de la présence très probable de porteurs asymptomatiques dans un troupeau.

De plus, les analyses microbiologiques peuvent donner des résultats faux négatifs. Ceux-ci peuvent s'expliquer en partie par l'excrétion intermittente de mycoplasmes dans le lait de vaches atteintes d'une mammite chronique. Cette excrétion peut être faible (40 % des animaux ayant d'une mammite chronique excrètent moins de 100 unités formant colonie par millilitre de lait) et non détectée, surtout lors d'analyses de lait de réservoir où la dilution est importante (Biddle et al. 2003). Lors de l'analyse de lait de réservoir, le résultat peut aussi être négatif car le lait des vaches en mammites cliniques ou avec un haut comptage cellulaire peut être jeté et, par conséquent, ne pas être mélangé dans le réservoir (Fox et al. 2005).

Plusieurs prélèvements à intervalles répétés sont nécessaires pour définir le statut d'un troupeau ou même d'un animal. Selon Gonzalez et Wilson (2003), si la culture de trois prélèvements de lait de réservoir réalisés à trois ou quatre jours d'intervalle est négative, la probabilité que les vaches ayant produit le lait analysé ne soient pas infectées atteint 70 %. Afin d'augmenter encore la sensibilité des analyses, il faudrait réaliser sept prélèvements quotidiens consécutifs (Gonzalez and Wilson 2003).

2.7.2. Stratégies diagnostiques

Il existe différentes stratégies pour identifier les animaux porteurs et excréteurs. On peut tout d'abord analyser le lait de chacun des animaux, mais cela est coûteux et long. Il est également possible de mélanger le lait des animaux afin de constituer des groupes (mélange du lait de 5 à 10 animaux fait au laboratoire, en règle générale) que l'on analyse par la suite. Si un groupe est positif, on analyse individuellement tous les laits qui constituent ce groupe. Dans les grands troupeaux, on peut aussi prélever et analyser le lait du réservoir après chaque groupe de traite, ce qui correspond à mélanger le lait de chacune des vaches d'un groupe (Fox et al. 2005). Enfin, une autre façon de procéder est d'analyser le lait des vaches qui présentent un comptage cellulaire élevé, de déterminer celles qui sont porteuses et de les éliminer (Fox et al. 2005).

Afin de faciliter l'identification des animaux infectés, il est possible, lors du prélèvement de lait, de faire un California Mastitis Test pour déterminer les quartiers qui ont un comptage cellulaire élevé. Le lait de ces quartiers sera préférablement analysé. À la suite de l'élimination des vaches infectées, si trois prélèvements de réservoir successifs s'avèrent négatifs, il est probable qu'il n'y ait pas d'autres animaux porteurs. Si un des prélèvements est positif, il faut procéder de la manière décrite précédemment. Parmi l'ensemble des procédures servant à identifier les animaux porteurs, les techniques par PCR semblent supérieures sur le plan de la rapidité, de la sensibilité et, dans certains cas, du coût.

2.8. Traitement des mammites à mycoplasmes

Il n'existe aucun traitement réellement efficace pour les mammites à mycoplasmes. De nombreuses associations d'antibiotiques ont été expérimentées pour le traitement intramammaire et systémique des mammites à mycoplasmes. Elles ont toutes donné des résultats mitigés (Jasper 1977). Les chercheurs s'accordent pour dire que le traitement de

ces mammites est inutile et qu'il ne fait que retarder le moment où l'animal sera éliminé du troupeau (Fox et al. 2005, Gonzalez and Wilson 2003).

Une vache qui présente des signes cliniques de mammite à mycoplasmes excrète les bactéries dans son lait pendant une période variant de quelques mois à plus de 13 mois, selon l'espèce de mycoplasme impliqué (Jasper 1977). Des guérisons spontanées sont rapportées (Gonzalez and Wilson 2003), mais en raison de la longueur de la période d'excrétion et des rechutes possibles, il est préférable de considérer qu'une vache porteuse de mycoplasmes est positive à vie.

2.9. Contrôle et prévention des mammites à mycoplasmes

2.9.1. Identification et élimination des animaux porteurs

La prévention des mammites à mycoplasmes repose sur le contrôle des achats d'animaux ainsi que sur l'identification et l'élimination des porteurs. L'identification des animaux porteurs doit être réalisée selon une des stratégies décrites plus haut. Ces animaux doivent par la suite être isolés des autres afin de minimiser le risque de transmission, et ce, jusqu'à leur élimination. Tous les animaux positifs devraient être éliminés le plus rapidement possible.

Pour des raisons économiques, par exemple lorsque beaucoup d'animaux sont positifs, il est parfois impossible d'éliminer tout de suite tous les animaux. Dans ce cas, les vaches non ou faiblement productrices doivent être éliminées immédiatement. Les autres animaux doivent être rassemblés en un groupe de traite « animaux porteurs » et être traités en dernier. Ils seront éliminés ultérieurement.

Cette approche est nécessaire et apporte de bons résultats pour le contrôle des mammites à *Mycoplasma bovis*, à *Mycoplasma californicum* et à *Mycoplasma canadense* (Bicknell et al. 1983, Brown et al. 1990, Mackie et al. 2000). Toutefois, Jackson et al.

(1981) mentionnent qu'un cas de mammite à *Mycoplasma bovis genitalium* a pu être contrôlé sans la mise en place de telles mesures. Après l'élimination, une surveillance régulière du lait de réservoir doit être faite afin de s'assurer qu'il n'y a pas de nouveaux animaux porteurs.

2.9.2. Contrôle des animaux introduits dans le troupeau

Le contrôle du statut des animaux nouvellement introduits (achats ou taures) dans le troupeau est important. Bayoumi et al. (1988) ont conclu que le contrôle des taures lors de leur introduction dans un troupeau de vaches en lactation devait faire partie des programmes de contrôle des mammites à mycoplasmes. À cause de l'excrétion intermittente des mycoplasmes dans le lait, on devrait idéalement effectuer plusieurs prélèvements (au moins trois) afin de s'assurer que ces animaux ne sont pas porteurs.

2.9.3. Bonnes pratiques de traite

De bonnes pratiques de traite doivent également être mises en place. Ainsi, il faut bien nettoyer le matériel de traite, utiliser des gants pour la traite, nettoyer minutieusement les trayons, employer un bain de trayons et avoir recours à une bonne technique d'infusion des traitements intramammaires (Jasper 1977). Les désinfectants à base d'acide peracétique ou d'iodophores sont très efficaces (Pfutzner and Sachse 1996). Par contre, ceux à base d'hypochlorite sont peu efficaces (Pfutzner and Sachse 1996). Boddie et al. (2002) ont testés l'efficacité de différents bains de trayons commerciaux contre *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovis genitalium* et *Mycoplasma californicum*. Ces bains étaient à base de chlorexidine, d'iode, d'ammonium quaternaire, de composés peroxygénés ou de composés chlorés. Tous se sont montrés efficaces.

2.9.4. Contrôle de l'infection chez les veaux

En raison du rôle possible des veaux dans l'apparition des mammites à mycoplasmes, on doit éviter de créer un cercle vicieux d'infection en les exposant à du lait contaminé. La pasteurisation du lait est efficace contre les mycoplasmes (Butler et al. 2000). On recommande donc d'alimenter les veaux avec du lait commercial de remplacement ou de pasteuriser le lait au préalable.

2.9.5. Vaccination

L'entreprise Biomune Company, située à Lenexa au Kansas, commercialise actuellement un vaccin pour la prévention des mammites à *Mycoplasma bovis* aux États-Unis et au Canada. Le vaccin renferme plusieurs souches différentes de *Mycoplasma bovis*. Il est recommandé pour la prévention des mammites à mycoplasmes chez les taures et les vaches multipares. En ce moment, aucune étude, autre que celles effectuées par le fabricant, ne démontre l'efficacité de ce vaccin. Jusqu'à présent, la plupart des vaccins pour la prévention des mammites à mycoplasmes chez les bovins qui ont été expérimentés n'ont pas réussi à prévenir la colonisation de l'organisme et les signes cliniques (Boothby et al. 1986a, b). L'utilisation d'un vaccin pour aider à lutter contre les mammites à mycoplasmes reste donc très controversée, et des études indépendantes sont nécessaires avant de recommander sans réserve la vaccination.

Chapitre 3. Méthodologie

3.1. Méthodologie générale

Pour les besoins de l'enquête, des échantillons de lait de réservoir ont été prélevés dans les troupeaux de bovins laitiers du Québec. Ce sont les médecins vétérinaires praticiens de l'Association des Médecins Vétérinaires Praticiens du Québec (AMVPQ) qui ont effectué les prélèvements. La sélection des troupeaux participants s'est faite parmi ceux qui participent au Programme de contrôle de la qualité et de l'innocuité du lait cru prélevé à la ferme, et ce, de façon aléatoire et de manière à ce que chacune des régions du Québec soit représentée. Au total, 117 troupeaux ont participé à l'enquête et 3 échantillons ont été prélevés pour chaque troupeau, soit 1 échantillon par mois.

Les échantillons ont ensuite été acheminés au Laboratoire d'expertises en pathologie animale du Québec (LEPAQ). Ils ont d'abord été analysés par culture bactérienne pour la recherche des mycoplasmes, puis l'espèce des isolats a été identifiée au moyen de l'immunofluorescence indirecte (IFI). Ces échantillons ont aussi été analysés par PCR pour la recherche et l'identification des mycoplasmes au Laboratoire de biologie moléculaire de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal (FMV).

La prévalence des mycoplasmes dans le lait de réservoir des troupeaux de bovins laitiers du Québec a été estimée à partir des résultats de ces analyses. Enfin, un questionnaire (annexe 1) a été administré aux éleveurs via les médecins vétérinaires praticiens de l'AMVPQ afin d'obtenir des informations complémentaires sur les troupeaux participants.

3.2. Traitement des données

Pour chaque troupeau, trois échantillons ont été analysés pour la recherche de mycoplasmes. Pour qu'un troupeau soit considéré comme positif, au moins un des trois échantillons devait être positif. La prévalence de troupeau des mycoplasmes dans le lait de réservoir a été estimée à partir des résultats de ces analyses : d'une part, à partir des

résultats obtenus par culture bactérienne (recherche par culture bactérienne et identification par IFI) et, d'autre part, à partir des résultats de la PCR (recherche et identification par PCR). Une prévalence de troupeau a aussi été estimée à partir des résultats combinés de ces deux méthodes de laboratoire. Les prévalences ont été calculées avec la version 9.2 du logiciel SAS (SAS 2008) et des intervalles de confiance autour de ces dernières ont été établis à l'aide de la méthode exacte.

3.3. Collecte des données

Dans le cadre de l'enquête, des échantillons de lait de réservoir de troupeaux de bovins laitiers du Québec ont été collectés. L'ensemble de la collecte de données s'est déroulé d'avril à octobre 2009.

3.3.1. Sélection des troupeaux

La sélection des troupeaux s'est faite parmi ceux qui participent au Programme de contrôle de la qualité et de l'innocuité du lait cru prélevé à la ferme. Tous les troupeaux qui commercialisent du lait au Québec sont inscrits à ce programme. Lors de la sélection, le 29 janvier 2009, un total de 6628 troupeaux de bovins laitiers étaient inscrits à ce programme.

Le nombre de troupeaux à échantillonner a été déterminé à l'aide du logiciel Win Episcopes 2.0 (Thrusfield et al. 2001), en considérant la taille de la population à l'étude, soit le nombre de troupeaux inscrits au Programme de contrôle de la qualité et de l'innocuité du lait cru prélevé à la ferme, et la prévalence de troupeau attendue. Cette prévalence a été estimée entre 2 % et 5 % avec une prédominance d'isolement de *Mycoplasma bovis* (Francoz, communication personnelle). Plus la prévalence attendue se rapproche de 50 %, plus le nombre d'échantillons augmente. C'est pour cette raison que la prévalence attendue de 5 % a été retenue afin de déterminer le nombre de troupeaux à échantillonner. Ainsi, pour une population de 6628 troupeaux, une prévalence attendue de 5 %, un niveau de

confiance de 95 % et une précision de 4 %, le nombre de troupeaux nécessaires à l'enquête a été établi à 115. Compte tenu des imprévus possibles, 125 troupeaux ont été sélectionnés. Au total, des échantillons ont été collectés pour 117 des 125 troupeaux sélectionnés (section 4.1).

La sélection des troupeaux participants s'est faite de façon aléatoire et de manière à ce que chacune des régions du Québec soit représentée. Elle a été réalisée à partir des données du Programme de contrôle de la qualité et de l'innocuité du lait cru prélevé à la ferme, où chaque troupeau inscrit possède un numéro unique de la Commission canadienne du lait. La sélection des troupeaux à échantillonner a été obtenue à l'aide d'un échantillonnage aléatoire stratifié où chaque région administrative du Québec représentait une strate. Étant donné que la prévalence attendue était la même pour chacune des régions, le nombre de troupeaux échantillonnés pour une région a été déterminé en proportion du nombre de troupeaux dans cette région (tableau I). Puis, pour chacune des régions, les troupeaux ont été sélectionnés au hasard (échantillonnage aléatoire simple) à l'aide de la fonction d'échantillonnage aléatoire du logiciel Excel 2003.

Tableau I. Nombre de troupeaux sélectionnés par région administrative du Québec

Région administrative	Nombre de troupeaux inscrits	Proportion du nombre de troupeaux (%)	Nombre de troupeaux sélectionnés
Bas-Saint-Laurent	764	11,53	14
Saguenay–Lac-Saint-Jean	364	5,49	7
Capitale-Nationale	236	3,56	4
Mauricie	300	4,53	6
Estrie	593	8,95	11
Montréal	1	0,02	0
Outaouais	90	1,36	2
Abitibi-Témiscamingue	144	2,17	3
Côte-Nord	4	0,06	0
Nord-du-Québec	0	0,00	0
Gaspésie–Îles-de-la-Madeleine	22	0,33	0
Chaudière-Appalaches	1431	21,59	27
Laval	2	0,03	0
Lanaudière	247	3,73	5
Laurentides	212	3,20	4
Montérégie	1255	18,93	24
Centre-du-Québec	963	14,53	18
Total	6628	100	125

3.3.2. Échantillonnage des laits de réservoir

Les échantillons de lait de réservoir ont été prélevés par les médecins vétérinaires praticiens de l'AMVPQ. Ils ont ensuite été acheminés au LEPAQ pour la recherche et l'identification des mycoplasmes.

3.3.2.1. Méthode d'échantillonnage des laits de réservoir

Des échantillons de lait de réservoir ont été prélevés puis acheminés au LEPAQ selon une procédure d'échantillonnage détaillée (annexe 2). Dans la majorité des cas, le délai entre le prélèvement d'un échantillon et l'analyse a été de moins de 24 heures. Ce délai n'a excédé 48 heures qu'une seule fois (section 4.2).

3.3.2.2. Nombre d'échantillons de lait de réservoir par troupeau

Comme il a été mentionné à la section 2.7.1, il est nécessaire de faire plusieurs prélèvements de lait de réservoir à intervalles répétés pour déterminer le statut d'un troupeau à l'égard des mycoplasmes. Dans le cadre de l'enquête, trois échantillons par troupeau ont été prélevés, soit un échantillon par mois.

3.4. Analyse microbiologique des échantillons

Les analyses microbiologiques des échantillons de lait de réservoir visaient la recherche des mycoplasmes et l'identification de l'espèce le cas échéant.

Parallèlement à ces analyses, une culture bactérienne de *Staphylococcus aureus* et de *Streptococcus agalactiae* a été réalisée pour obtenir de l'information complémentaire.

3.4.1. Sélection des microorganismes pathogènes à analyser

Lorsqu'un échantillon se révélait positif, l'espèce de mycoplasmes devait être identifiée. Dans le cadre de la présente enquête, les analyses microbiologiques réalisées au LEPAQ permettaient d'identifier les espèces suivantes par IFI : *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma bovis* et *Mycoplasma bovis*. Enfin, tous les isolats ont été conservés pour la réalisation du séquençage au Laboratoire d'épidémiosurveillance animale du Québec (LEAQ).

3.4.2. Méthode d'analyse microbiologique des laits de réservoir

Le personnel du LEPAQ a utilisé deux méthodes différentes pour rechercher des mycoplasmes dans les échantillons de lait de réservoir : la culture bactérienne et la PCR.

3.4.2.1. Recherche des mycoplasmes par culture bactérienne

Les échantillons analysés par culture bactérienne ont été soumis au LEPAQ moins de 48 heures suivant le prélèvement afin d'accroître les chances d'isoler le microorganisme. Tous les échantillons ont été conservés à 4 °C pendant le transport. Ils ont ensuite été inoculés sur des milieux spécifiques pour la recherche de mycoplasmes (d'une part, sur une gélose de Hayflik modifiée et, d'autre part, dans un bouillon d'enrichissement Hayflik).

Un protocole spécial a été suivi pour l'isolement des mycoplasmes. Chaque isolat a été identifié par IFI avec des antisérums spécifiques (section 3.4.1). Les échantillons ont ensuite été divisés en deux parties. Une partie a été soumise à une recherche par PCR et l'autre a été conservée à -70 °C pour analyses ultérieures.

Aucune culture pour la recherche de mycoplasmes ne pouvait être réalisée avec les échantillons reçus plus de 48 heures après le prélèvement. Dans un tel cas, le laboratoire communiquait avec le médecin vétérinaire praticien et d'autres échantillons étaient prélevés.

3.4.2.2. Recherche des mycoplasmes par PCR

Les échantillons reçus au LEPAQ ont ensuite été acheminés au laboratoire de biologie moléculaire de la FMV pour la recherche et l'identification des mycoplasmes par PCR. Ils devaient être soumis au LEPAQ dans les trois premiers jours de la semaine afin que le personnel de la FMV puisse en faire l'analyse avant la fin de cette même semaine. Ils ont été conservés à 4 °C en attendant leur envoi à la FMV.

Dans un premier temps, l'analyse PCR pour la recherche des mycoplasmes a été réalisée. Dans un deuxième temps, les échantillons positifs ont été analysés par PCR pour *Mycoplasma bovis*. Les extractions d'ADN des laits positifs à mycoplasme et négatifs à *Mycoplasma bovis* ont été transférées au LÉAQ pour séquençage.

3.4.2.3. Recherche de *Staphylococcus aureus* et de *Streptococcus agalactiae* par culture bactérienne

Les échantillons de lait ont aussi été inoculés sur des géloses supplémentées avec du sang de mouton (5 %) pour la recherche de *Staphylococcus aureus* et de *Streptococcus agalactiae*. Les gélosesensemencées ont ensuite été incubées à 35 °C en présence de CO₂ pour une période allant jusqu'à 48 heures. Comme méthode d'enrichissement, les échantillons de lait ont subi deux traitements. Premièrement, ils ont été congelés à -20 °C pendant 24 heures pour ensuite êtreensemencés sur des géloses au sang et incubés pendant 24 heures à 35 °C en présence de CO₂. Deuxièmement, les échantillons de lait congelés ont été incubés pendant 24 heures à 35 °C dans une atmosphère normale, puisensemencés comme décrit précédemment. L'examen des géloses incubées, le repiquage des isolats suspectés et l'identification de ces bactéries ont été exécutés par la suite. Ces analyses ont toutes été réalisées au LEPAQ.

Chapitre 4. Résultats

4.1. Description des troupeaux échantillonnés

Parmi les 125 troupeaux sélectionnés au hasard pour l'enquête, 5 ont dû être remplacés dès le début de la collecte de données pour différentes raisons : refus de l'éleveur (3 troupeaux), échantillon difficilement accessible (1 troupeau) et vente de la ferme (1 troupeau). Chacun de ces troupeaux a été changé, de façon aléatoire, contre un troupeau qui provenait de la même région et qui était suivi par le même médecin vétérinaire praticien que le troupeau à remplacer. Malgré l'envoi de deux lettres de rappel, cinq médecins vétérinaires praticiens, responsables de huit troupeaux en tout, n'ont pas participé à l'enquête. Au total, des échantillons ont été prélevés sur 117 des 125 troupeaux sélectionnés (tableau II). La collecte de données s'est déroulée d'avril à octobre 2009.

Pour chaque troupeau échantillonné, le médecin vétérinaire praticien responsable devait administrer aux éleveurs un questionnaire (annexe 1) afin d'obtenir des informations complémentaires. Les prochains paragraphes présentent une synthèse des informations recueillies.

Le nombre moyen de vaches en lactation dans les troupeaux analysés était de 47,6, alors qu'il s'élevait à 56,0 en incluant les vaches tarées. La race Holstein était la principale race présente dans les élevages échantillonnés, soit dans 97,4 % (114/117) de ces derniers.

Dans 63,2 % (72/114) des troupeaux, la totalité des vaches ont reçu un traitement antibiotique intramammaire au tarissement, tandis que dans 43,0 % d'entre eux (49/114), toutes les vaches atteintes d'une mammites clinique pendant la lactation ont reçu un traitement antibiotique intramammaire. Les éleveurs et leurs médecins vétérinaires praticiens considéraient qu'il y avait des problèmes de mammites à un comptage cellulaire moyen de 293 795 cellules par millilitre et 50,0 % (57/114) de ces derniers ont rapporté des comptages cellulaires de plus de 400 000 cellules par millilitre au cours de la dernière année. Des problèmes de mammites contagieuses ont été rapportés par 53,5 % (61/114) des éleveurs et 77,6 % (90/116) de ces derniers ont pris des mesures particulières afin de

contrôler ce type de problème. Fait intéressant, aucun (0/116) des troupeaux échantillonnés n'a reçu un diagnostic de mammite à mycoplasmes confirmé en laboratoire au cours des deux dernières années.

Pour 39,3 % (46/117) des troupeaux, la totalité des vaches en lactation et des vaches tarées ont été élevées sur la ferme. Au cours des deux dernières années, des animaux ont été introduits dans 54,3 % (63/116) des troupeaux analysés, et lors de ces introductions, 74,6 % (47/63) des éleveurs ont demandé un comptage cellulaire bas pour l'animal, 12,7 % (8/63) un comptage cellulaire bas pour le réservoir de lait, 12,7 % (8/63) une culture bactérienne du lait de l'animal et aucun (0/63) éleveur n'a demandé une culture bactérienne du lait de réservoir.

Les vaches en lactation étaient gardées en stabulation entravée dans 90,5 % (105/116) des troupeaux échantillonnés et la paille était le type de litière utilisé dans 73,3 % (85/116) des élevages. Au cours de la dernière année, seulement 0,9 % (1/116) et 3,5 % (4/116) des élevages ont reçu un diagnostic confirmé en laboratoire de diarrhée virale bovine et de paratuberculose, respectivement. Un programme de vaccination contre les virus respiratoires était en place dans 77,4 % (89/115) des troupeaux.

Dans 10,3 % (12/117) des troupeaux, les veaux ont eu des contacts nez à nez avec des vaches adultes après la séparation d'avec leur mère, mais avant leur sevrage. En ce qui a trait aux génisses de remplacement, ces contacts se sont produits dans 10,3 % (12/117) des troupeaux. Aussi, dans 98,3 % (114/116) des élevages, les génisses de remplacement ont été élevées sur la ferme et pour 27,2 % (31/114) d'entre eux, elles ont été gardées dans un bâtiment à part. Les éleveurs ont rapporté que les veaux de 86,0 % (92/107) des troupeaux ont consommé du lait entier non pasteurisé avant leur sevrage. Dans 76,1 % (89/117) des élevages, c'est la même personne qui s'est occupée des soins des veaux et de la traite. Seulement 4,4 % (5/115) des éleveurs ont rapporté un diagnostic d'infection à *Mycoplasma bovis* confirmé en laboratoire chez les génisses de remplacement au cours des deux dernières années. De plus, 61,7 % (71/115), 10,1 % (11/109) et 27,9 % (31/111) des

éleveurs ont observé des problèmes de pneumonie, d'otite et d'arthrite respectivement chez les génisses de remplacement. Enfin, dans 43,9 % (50/114) des troupeaux échantillonnés, les veaux ont été vaccinés contre les virus respiratoires avant l'âge de 6 mois.

Tableau II. Nombre de troupeaux échantillonnés par région administrative du Québec

Région administrative	Nombre de troupeaux inscrits	Nombre de troupeaux sélectionnés	Nombre de troupeaux échantillonnés
Bas-Saint-Laurent	764	14	11
Saguenay–Lac-Saint-Jean	364	7	5
Capitale-Nationale	236	4	4
Mauricie	300	6	6
Estrie	593	11	10
Montréal	1	0	0
Outaouais	90	2	2
Abitibi-Témiscamingue	144	3	3
Côte-Nord	4	0	0
Nord-du-Québec	0	0	0
Gaspésie–Îles-de-la-Madeleine	22	0	0
Chaudière-Appalaches	1431	27	25
Laval	2	0	0
Lanaudière	247	5	5
Laurentides	212	4	4
Montérégie	1255	24	24
Centre-du-Québec	963	18	18
Total	6628	125	117

4.2. Prévalence des mycoplasmes dans le lait de réservoir

Le délai entre le prélèvement d'un échantillon de lait de réservoir par un médecin vétérinaire praticien et le début de l'analyse par culture bactérienne au LEPAQ a été de moins de 24 heures dans 84,9 % (298/351) des cas et de 24 à 48 heures dans 14,8 %

(52/351) des cas. Il a excédé 48 heures une seule fois. Le délai entre le prélèvement et le début de l'analyse du deuxième échantillon de l'élevage 032 a été de 96 heures. Cet échantillon c'est avéré négatif par culture bactérienne. Ce résultat a toutefois été conservé pour la suite des analyses étant donné que cet échantillon c'est aussi avéré négatif pour la recherche des mycoplasmes par PCR.

En ce qui concerne le délai entre le prélèvement d'un échantillon et le début de l'analyse par PCR au laboratoire de biologie moléculaire de la FMV, il a été de moins de 72 heures dans 92,9 % (326/351) des cas. Le délai le plus long a atteint environ une semaine.

4.2.1. Prévalence des mycoplasmes dans le lait de réservoir : recherche par culture bactérienne

Pour qu'un troupeau soit considéré comme positif, au moins un des trois échantillons devait être positif. Au total, deux échantillons se sont révélés positifs pour la recherche de *Mycoplasma* spp. par culture bactérienne, soit les premiers échantillons des troupeaux 063 et 071. L'espèce de ces mycoplasmes a ensuite été identifiée, soit *Mycoplasma bovis* pour le troupeau 063 et *Acholeplasma laidlawii* pour le troupeau 071.

Ainsi, à la suite de la recherche par culture bactérienne, la prévalence des mycoplasmes dans le lait de réservoir des troupeaux de bovins laitiers du Québec a été estimée à 1,71 % (2/117; intervalle de confiance : 0,21 % - 6,00 %).

4.2.2. Prévalence des mycoplasmes dans le lait de réservoir : recherche par PCR

Encore une fois, pour qu'un troupeau soit considéré comme positif, au moins un des trois échantillons devait être positif. Au total, 3 échantillons se sont révélés positifs pour la recherche de *Mycoplasma* spp. par PCR, soit le premier échantillon du troupeau 063, le

deuxième du troupeau et 058 et le troisième du troupeau 091. L'espèce de ces mycoplasmes a ensuite été identifiée par PCR pour *Mycoplasma bovis* pour les troupeaux 063 et 058. Pour le troupeau 091, malgré plusieurs tentatives par séquençage, l'espèce n'a pas pu être identifiée.

Ainsi, à la suite de la recherche par PCR, la prévalence des mycoplasmes dans le lait de réservoir des troupeaux de bovins laitiers du Québec a été estimée à 2,56 % (3/117; intervalle de confiance : 0,53 % - 7,30 %).

4.2.3. Prévalence des mycoplasmes dans le lait de réservoir

En somme, à la suite des recherches par culture bactérienne et par PCR, la prévalence des mycoplasmes dans le lait de réservoir des troupeaux de bovins laitiers du Québec a été estimée à 3,42 % (4/117; intervalle de confiance : 0,94 % - 8,50 %). Trois des quatre troupeaux positifs étaient des élevages de la même région du Québec, soit Chaudière-Appalaches (tableau III).

Tableau III. Résultats de la recherche et de l'identification des mycoplasmes par culture bactérienne et par PCR pour les troupeaux positifs

Troupeaux	Culture bactérienne		PCR		Région administrative
	Recherche	Identification	Recherche	Identification	
058	Négatif	–	Positif	<i>M. bovis</i> ¹	Chaudière-Appalaches
063	Positif	<i>M. bovis</i>	Positif	<i>M. bovis</i>	Chaudière-Appalaches
071	Positif	<i>A. laidlawii</i> ²	Négatif	–	Chaudière-Appalaches
091	Négatif	–	Positif	<i>M. spp.</i> ³	Montérégie

1. *Mycoplasma bovis*

2. *Acholeplasma laidlawii*

3. *Mycoplasma spp.* : l'espèce de mycoplasme n'a pas pu être identifiée

4.3. Prévalence de *Staphylococcus aureus* et de *Streptococcus agalactiae* dans le lait de réservoir

Parallèlement aux analyses pour les mycoplasmes, des cultures bactériennes de *Staphylococcus aureus* et de *Streptococcus agalactiae* ont été réalisées à partir des échantillons de lait de réservoir. Pour qu'un troupeau soit considéré comme positif, au moins un des trois échantillons devait être positif.

4.3.1. Prévalence de *Staphylococcus aureus* dans le lait de réservoir

À la suite de la recherche par culture bactérienne, la prévalence de *Staphylococcus aureus* dans le lait de réservoir des troupeaux de bovins laitiers du Québec a été estimée à 84,62 % (99/117; intervalle de confiance : 76,80 % - 90,60 %) en isolement primaire et à 95,73 % (112/117; intervalle de confiance : 90,30 % - 98,60 %) après enrichissement. Ces prévalences ont aussi été estimées selon les régions administratives du Québec (tableau IV).

Tableau IV. Prévalence de *Staphylococcus aureus* dans le lait de réservoir selon la région administrative du Québec

Région administrative	Prévalence (% (nombre de troupeaux positifs/nombre de troupeaux))	
	Isolement primaire	Enrichissement
Bas-Saint-Laurent	90,91 (10/11)	100,00 (11/11)
Saguenay–Lac-Saint-Jean	80,00 (4/5)	100,00 (5/5)
Capitale-Nationale	50,00 (2/4)	75,00 (3/4)
Mauricie	83,33 (5/6)	100,00 (6/6)
Estrie	80,00 (8/10)	100,00 (10/10)
Outaouais	100,00 (2/2)	100,00 (2/2)
Abitibi-Témiscamingue	0,00 (0/3)	66,67 (2/3)
Chaudière-Appalaches	96,00 (24/25)	100,00 (25/25)
Lanaudière	100,00 (5/5)	100,00 (5/5)
Laurentides	100,00 (4/4)	100,00 (4/4)
Montérégie	79,17 (19/24)	91,67 (22/24)
Centre-du-Québec	88,89 (16/18)	94,44 (17/18)
Total	84,62 (99/117)	95,73 (112/117)

4.3.2. Prévalence de *Streptococcus agalactiae* dans le lait de réservoir

À la suite de la recherche par culture bactérienne, la prévalence de *Streptococcus agalactiae* dans le lait de réservoir des troupeaux de bovins laitiers du Québec a été estimée à 7,69 % (9/117; intervalle de confiance : 3,60 % - 14,10 %) en isolement primaire et à 8,55 % (10/117; intervalle de confiance : 4,20 % - 15,20 %) après enrichissement. Ces prévalences ont aussi été estimées selon les régions administratives du Québec (tableau V).

Tableau V. Prévalence de *Streptococcus agalactiae* dans le lait de réservoir selon la région administrative du Québec

Région administrative	Prévalence (% (nombre de troupeaux positifs/nombre de troupeaux))	
	Isolement primaire	Enrichissement
Bas-Saint-Laurent	0,00 (0/11)	0,00 (0/11)
Saguenay–Lac-Saint-Jean	20,00 (1/5)	40,00 (2/5)
Capitale-Nationale	0,00 (0/4)	0,00 (0/4)
Mauricie	0,00 (0/6)	0,00 (0/6)
Estrie	0,00 (0/10)	0,00 (0/10)
Outaouais	0,00 (0/2)	0,00 (0/2)
Abitibi-Témiscamingue	0,00 (0/3)	0,00 (0/3)
Chaudière-Appalaches	8,00 (2/25)	8,00 (2/25)
Lanaudière	0,00 (0/5)	0,00 (0/5)
Laurentides	0,00 (0/4)	0,00 (0/4)
Montérégie	16,67 (4/24)	16,67 (4/24)
Centre-du-Québec	11,11 (2/18)	11,11 (2/18)
Total	7,69 (9/117)	8,55 (10/117)

Chapitre 5. Discussion

5.1. Prévalence des mycoplasmes dans le lait de réservoir

La prévalence des mycoplasmes dans le lait de réservoir des troupeaux de bovins laitiers du Québec qui a été estimée lors de l'enquête, à savoir 3,42 % (4/117; intervalle de confiance : 0,94 % - 8,50 %), concorde avec ce qui est rapporté dans la littérature en Amérique du Nord, soit des prévalences de troupeau allant de 1,2 % à 9,4 % (Anonyme 2003, Cai et al. 2005, Fox et al. 2003, Jasper et al. 1979, Kirk and Lauerman 1994, Kirk et al. 1997, Olde Riekerink et al. 2006, Wilson et al. 2009).

Par contre, pour l'enquête ainsi que pour la majorité des études citées ci-dessus, la prévalence apparente qui est généralement rapportée est probablement sous-estimée par rapport à la prévalence réelle. En effet, des résultats faux négatifs suite aux analyses microbiologiques sont possibles. L'excrétion intermittente des mycoplasmes dans le lait par des vaches infectées chroniquement (Biddle et al. 2003), l'excrétion faible dans le lait de certaines vaches lorsque la dilution du lait de réservoir par les vaches négatives est importante (Biddle et al. 2003) et le fait que le lait des vaches avec une mammite clinique ou avec un haut comptage cellulaire n'est généralement pas collecté dans le réservoir (Fox et al. 2005) sont les principales explications qui soutiennent cette hypothèse.

Ainsi, il est nécessaire de faire plusieurs prélèvements à intervalles répétés afin d'augmenter la sensibilité des analyses. Dans le cadre de l'enquête, trois échantillons par troupeau ont été prélevés, soit un échantillon par mois. Quelques auteurs mentionnent le recours à des stratégies d'échantillonnage semblables dans le contexte d'autres études sur la prévalence des mycoplasmes dans le lait de réservoir (Fox et al. 2003, Jasper et al. 1979, Kirk et al. 1997, Olde Riekerink et al. 2006, Wilson et al. 2009).

Dans le cadre de l'enquête, les quatre troupeaux qui ont été trouvés positifs l'ont été pour un seul des trois prélèvements. Même si des prélèvements ont été effectués à intervalles répétés, quelques auteurs rapportent aussi que la répétabilité des résultats positifs obtenus à partir d'échantillons de lait de réservoir n'a pas été observée dans la majorité des

cas (Fox et al. 2003, Jasper et al. 1979, Kirk et al. 1997, Olde Riekerink et al. 2006, Wilson et al. 2009). Ce manque de répétabilité peut s'expliquer non seulement par la possibilité de résultats faux négatifs mentionnée précédemment, mais aussi par une modification du statut de l'élevage. Les échantillons étant prélevés à environ un mois d'intervalle, il se peut que des changements apportés au sein du troupeau pendant cette période aient favorisé l'apparition de mammites à mycoplasmes (achat d'animaux, introduction de taures dans le troupeau de vaches en lactation) ou leur disparition (ségrégation, élimination d'animaux).

Trois des quatre troupeaux positifs sont des élevages de la même région du Québec, soit Chaudière-Appalaches. Le nombre de troupeaux à échantillonner et la sélection de ces derniers c'est fait de façon à ce qu'ils soient représentatifs du cheptel de bovins laitiers du Québec. Par contre, le nombre limité de troupeaux échantillonnés dans chaque région de la province ne permet pas de comparer les résultats de prévalence entre ces régions. Néanmoins, cette observation est intéressante et mériterait une analyse plus poussée.

Les résultats obtenus ne permettent pas de déterminer si la saison a un effet sur la prévalence de la mycoplasmosse chez les bovins laitiers au Québec. Étant donné que les données ont été collectées d'avril à octobre 2009 et que quelques études californiennes ont démontré une prévalence plus importante durant l'hiver (Bayoumi et al. 1988, Jasper et al. 1979, Kirk et al. 1997), il est possible que la prévalence apparente soit sous estimée. D'un autre côté, aucun effet n'a été observé lors d'une étude réalisée dans l'état de Washington (Fox et al. 2003).

5.2. Comparaison des méthodes d'analyse microbiologique des laits de réservoir

Les deux méthodes de laboratoire les plus fréquemment utilisées pour la recherche et l'identification des mycoplasmes à partir d'échantillons de lait de réservoir sont la culture bactérienne pour la recherche, combinée à l'immunofluorescence indirecte (IFI)

pour l'identification, et la technique par PCR pour la recherche et l'identification. La majorité des études sur la prévalence utilise l'une ou l'autre de ces méthodes, alors que dans le cas de l'enquête les deux ont été utilisées.

La culture bactérienne est largement utilisée depuis plusieurs années pour la recherche des mycoplasmes, mais elle a comme désavantage qu'il faut attendre plusieurs jours après le début des analyses pour obtenir des résultats. Plusieurs auteurs ont rapporté ce problème (Cai et al. 2005, Fox et al. 2005, Gonzalez and Wilson 2003). Des délais de 3 à 14 jours ont été observés lors de l'enquête. En ce qui concerne la technique par PCR, les délais ont été de moins de 24 heures.

Le délai entre le prélèvement d'un échantillon et le début de l'analyse par culture bactérienne n'a jamais excédé 96 heures et a été de moins de 24 heures dans 84,9 % (298/351) des cas. Tous les échantillons ont été gardés à 4 °C pendant le transport. Cela a possiblement permis de bien les conserver. Cai et al. (2005) ont démontré que le nombre de *Mycoplasma bovis* viables ne change pas de façon importante dans un échantillon conservé à 4 °C pendant 96 heures. Par contre, lorsque le délai excède 48 heures, la croissance excessive de microorganismes contaminants peut diminuer le nombre de mycoplasmes viables dans l'échantillon ou rendre impossible la détection de colonies sur la gélose inoculée (Gonzalez and Wilson 2003).

Pour ce qui est du délai entre le prélèvement d'un échantillon et le début de l'analyse par PCR, il n'a jamais excédé une semaine et a été de moins de 72 heures dans 92,9 % (326/351) des cas. Encore une fois, cette façon de procéder a possiblement permis une bonne conservation des échantillons. Pour les quelques délais de plus de 96 heures, même si la diminution de mycoplasmes viables est possible, la technique par PCR a l'avantage de détecter les mycoplasmes viables ou non (Cai et al. 2005).

En ce qui a trait aux coûts des analyses pour les clients, la technique par PCR est la moins coûteuse des deux. En effet, la recherche par culture bactérienne coûte 26 \$ CAN,

l'identification par IFI, 24,50 \$ CAN, la recherche par PCR, 17,50 \$ CAN et l'identification par PCR pour *Mycoplasma bovis*, 17,50 \$ CAN. Dans bien des cas, les clients demandent directement l'analyse par PCR pour *Mycoplasma bovis*.

Pour 3 des 4 troupeaux trouvés positifs lors de l'enquête, soit les troupeaux 058, 071 et 091, les résultats diffèrent selon la méthode utilisée. Le troupeau 058 s'est révélé négatif à la suite de la culture bactérienne pour *Mycoplasma bovis*. Par contre, avec la technique par PCR, il s'est révélé positif. Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par le manque de sensibilité de la culture bactérienne ou par l'absence de mycoplasmes viables dans l'échantillon de lait analysé (Cai et al. 2005). Quant au troupeau 091, il a été trouvé positif pour *Mycoplasma* spp. avec la technique par PCR seulement. De plus, l'espèce de mycoplasmes n'a pu être identifiée par PCR ou par séquençage. Pour le troupeau 071, l'espèce de mycoplasmes qui a été identifiée est *Acheloplasma laidlawii* et ce résultat est seulement positif pour la culture bactérienne. Bien que plusieurs chercheurs aient étudié la pathogénicité de cette espèce pour la glande mammaire bovine, les résultats sont parfois contradictoires et l'existence de souches pathogènes et non pathogènes d'*Acheloplasma laidlawii* est une possibilité qui est considérée par certains chercheurs (Gonzalez and Wilson 2003).

Bref, la recherche et l'identification des mycoplasmes avec la technique par PCR utilisée pour l'enquête ont l'avantage d'être plus rapides et moins coûteuses que la culture bactérienne en plus d'avoir une excellente sensibilité et spécificité. En contrepartie, cette technique permet seulement l'identification de *Mycoplasma bovis*. Des problèmes de contamination croisée des échantillons sont aussi possibles étant donné la grande sensibilité de cette technique. La recherche des mycoplasmes par culture bactérienne et l'identification par IFI sont des méthodes largement utilisées depuis plusieurs années. La culture bactérienne a une sensibilité comparable à la technique par PCR et a l'avantage de permettre l'identification de plusieurs espèces de mycoplasmes.

Chapitre 6. Conclusion

La prévalence des mycoplasmes dans le lait de réservoir des troupeaux de bovins laitiers du Québec qui a été estimée lors de l'enquête concorde avec ce qui est rapporté dans la littérature en Amérique du Nord. Par contre, la prévalence apparente est probablement sous-estimée par rapport à la prévalence réelle. En effet, des résultats faux négatifs des analyses microbiologiques sont possibles. Le fait que trois des quatre troupeaux positifs de cette enquête soient des élevages de la même région du Québec, soit Chaudière-Appalaches, est une observation intéressante qui mériterait une analyse plus poussée.

L'enquête confirme que des prélèvements répétés de lait de réservoir sont nécessaires afin de déterminer le statut d'un troupeau laitier à l'égard des mycoplasmes. Elle montre aussi que la culture bactérienne et la technique par PCR sont des outils diagnostics intéressants pour arriver à cette fin.

Bibliographie

Anonyme. 2003. *Mycoplasma* in Bulk Tank Milk on U.S. Dairies. Fort Collins: Animal and Plant Health Inspection Service. United States Department of Agriculture.

Ayling RD, Bashiruddin SE, Nicholas RA. 2004. *Mycoplasma* species and related organisms isolated from ruminants in Britain between 1990 and 2000. *Vet Rec* 155: 413-416.

Bayoumi FA, Farver TB, Bushnell B, Oliveria M. 1988. Enzootic mycoplasmal mastitis in a large dairy during an eight-year period. *J Am Vet Med Assoc* 192: 905-909.

Bennett RH, Jasper DE. 1977. Nasal prevalence of *Mycoplasma bovis* and IHA titers in young dairy animals. *Cornell Vet* 67: 361-373.

Bicknell SR, Gunning RF, Jackson G, Boughton E, Wilson CD. 1983. Eradication of *Mycoplasma bovis* infection from a dairy herd in Great Britain. *Vet Rec* 112: 294-297.

Biddle MK, Fox LK, Hancock DD. 2003. Patterns of *Mycoplasma* shedding in the milk of dairy cows with intramammary *Mycoplasma* infection. *J Am Vet Med Assoc* 223: 1163-1166.

Boddie RL, Owens WE, Ray CH, Nickerson SC, Boddie NT. 2002. Germicidal activities of representatives of five different teat dip classes against three bovine *Mycoplasma* species using a modified excised teat model. *J Dairy Sci* 85: 1909-1912.

Boothby JT, Jasper DE, Thomas CB. 1986a. Experimental intramammary inoculation with *Mycoplasma bovis* in vaccinated and unvaccinated cows: effect on milk production and milk quality. *Can J Vet Res* 50: 200-204.

Boothby JT, Jasper DE, Thomas CB. 1986b. Experimental intramammary inoculation with *Mycoplasma bovis* in vaccinated and unvaccinated cows: effect on the mycoplasmal infection and cellular inflammatory response. *Cornell Vet* 76: 188-197.

Brice N, Finlay D, Bryson DG, Henderson J, McConnell W, Ball HJ. 2000. Isolation of *Mycoplasma bovis* from cattle in Northern Ireland, 1993 to 1998. *Vet Rec* 146: 643-644.

Brown MB, Shearer JK, Elvinger F. 1990. Mycoplasmal mastitis in a dairy herd. *J Am Vet Med Assoc* 196: 1097-1101.

- Butler JA, Sickles SA, Johanns CJ, Rosenbusch RF. 2000. Pasteurization of discard *Mycoplasma* mastitic milk used to feed calves: thermal effects on various *Mycoplasma*. J Dairy Sci 83: 2285-2288.
- Cai HY, Bell-Rogers P, Parker L, Prescott JF. 2005. Development of a real-time PCR for detection of *Mycoplasma bovis* in bovine milk and lung samples. J Vet Diagn Invest 17: 537-545.
- Davidson I, Stuart P. 1960. Isolation of a *Mycoplasma*-like organism from an outbreak of bovine mastitis. Vet Rec 72: 766.
- Feldmann M, Wucherpfennig D, Schmidt R, Hoedemaker M. 2003. Occurrence of *Mycoplasma* spp. in milk samples from dairy herds with high bulk somatic cell counts in the north-west of Germany. Tierarztl Prax 31: 237-242.
- Filioussis G, Christodoulopoulos G, Thatcher A, Petridou V, Bourtzi-Chatzopoulou E. 2007. Isolation of *Mycoplasma bovis* from bovine clinical mastitis cases in Northern Greece. Vet J 173: 215-218.
- Fox LK, Kirk JH, Britten A. 2005. *Mycoplasma* mastitis: a review of transmission and control. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 52: 153-160.
- Fox LK, Hancock DD, Mickelson A, Britten A. 2003. Bulk tank milk analysis: factors associated with appearance of *Mycoplasma* spp. in milk. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 50: 235-240.
- Ghadersohi A, Hirst RG, Forbes-Faulkener J, Coelen RJ. 1999. Preliminary studies on the prevalence of *Mycoplasma bovis* mastitis in dairy in cattle in Australia. Vet Microbiol 65: 185-194.
- Gonzalez RN, Wilson DJ. 2003. Mycoplasmal mastitis in dairy herds. Vet Clin North Am Food Anim Pract 19: 199-221.
- Hale HH, Helmboldt CF, Plastringe WN, Stula EF. 1962. Bovine mastitis caused by a *Mycoplasma* species. Cornell Vet 52: 582-591.
- Jackson G, Boughton E, Hamer SG. 1981. An outbreak of bovine mastitis associated with *Mycoplasma canadense*. Vet Rec 108: 31-32.
- Jasper DE. 1977. *Mycoplasma* and *Mycoplasma* mastitis. J Am Vet Med Assoc 170: 1167-1172.

- Jasper DE, Dellinger JD, Rollins MH, Hakanson HD. 1979. Prevalence of mycoplasmal bovine mastitis in California. *Am J Vet Res* 40: 1043-1047.
- Kirk JH, Lauerma LH. 1994. *Mycoplasma* Mastitis in Dairy Cows. *Food Animal* 16: 541-558.
- Kirk JH, Glenn K, Ruiz L, Smith E. 1997. Epidemiologic analysis of *Mycoplasma spp.* isolated from bulk-tank milk samples obtained from dairy herds that were members of a milk cooperative. *J Am Vet Med Assoc* 211: 1036-1038.
- Mackie DP, Finlay D, Brice N, Ball HJ. 2000. Mixed *Mycoplasma* mastitis outbreak in a dairy herd. *Vet Rec* 147: 335-336.
- Nicholas RA, Ayling RD. 2003. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. *Res Vet Sci* 74: 105-112.
- Olde Riekerink RG, Barkema HW, Veenstra S, Poole DE, Dingwell RT, Keefe GP. 2006. Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. *Can Vet J* 47: 567-572.
- Pfutzner H, Sachse K. 1996. *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. *Rev Sci Tech* 15: 1477-1494.
- Ruhnke HL, Thawley D, Nelson FC. 1976. Bovine mastitis in Ontario due to *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis*. *Can J Comp Med* 40: 142-148.
- SAS. 2008. SAS 9.2. Cary: SAS Institute Inc.
- Thrusfield M, Ortega C, de Blas I, Noordhuizen JP, Frankena K. 2001. WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet Rec* 148: 567-572.
- Walker RL. 1999. Molliculites. Pages 165-172 in Hirsh DC, Zee YC, eds. *Veterinary Microbiology*. Malden: Blackwell Science Ltd.
- Wilson DJ, Goodell G, Justice-Allen A, Smith ST. 2009. Herd-level prevalence of *Mycoplasma spp.* mastitis and characteristics of infected dairy herds in Utah as determined by a statewide survey. *J Am Vet Med Assoc* 235: 749-754.

Annexe 1 : Questionnaire



QUESTIONNAIRE

Enquête de prévalence des mycoplasmes dans le lait de réservoir des troupeaux de bovins laitiers du Québec

1 Nom et localisation de l'élevage

Nom de l'éleveur : ¹⁰¹

Numéro d'identification ministériel (NIM) : ¹⁰²

Adresse : ¹⁰³

Ville : ¹⁰⁴

Code postal : ¹⁰⁵

Région du Québec : ¹⁰⁶

Nom du médecin vétérinaire : ¹⁰⁷

Date de saisie du questionnaire : ¹⁰⁸

2 Le troupeau

Quelle est la principale race de vache laitière présente sur l'élevage?²⁰¹

Holstein

Jersey

Ayrshire

Suisse brune

Autre :

Combien y a-t-il de vaches en lactation actuellement dans le troupeau (si le chiffre précis n'est pas connu, mettre une approximation)?²⁰²

Combien y a-t-il de vaches (en lactation et tarées) actuellement dans le troupeau (si le chiffre précis n'est pas connu, mettre une approximation)?²⁰³

Quel pourcentage de toutes les vaches (en lactation et tarées) présentes ont été élevées sur la ferme?²⁰⁴ %

Avez-vous eu un diagnostic d'infection au virus de la diarrhée virale bovine (confirmé par un test de laboratoire ou une nécropsie) dans le troupeau au cours de la dernière année?²⁰⁵

Oui Non

Avez-vous eu un diagnostic de paratuberculose (confirmé par un test de laboratoire ou une nécropsie) dans le troupeau au cours de la dernière année?²⁰⁶

Oui Non

Pour votre programme de vaccination contre les virus respiratoires, utilisez-vous?²⁰⁷

Un vaccin vivant
 Un vaccin tué
 Un vaccin vivant et un vaccin tué
 Aucun vaccin

3 Les vaches en lactation

Quel est le principal type de logement des vaches en lactation?³⁰¹

Stabulation entravée

Stabulation libre avec logette

Stabulation libre

Autre :

Quel type de litière est utilisé pour les vaches en lactation?³⁰²

Paille

Ripe

Paille et ripe

Aucun

Autre :

Quel pourcentage de toutes les vaches reçoivent un traitement antibiotique intramammaire au tarissement?³⁰³ %

Quel(s) produit(s) de tarissement intramammaire utilisez-vous?³⁰⁴

• • •

Avez-vous changé de produit de tarissement intramammaire au cours des deux dernières années?³⁰⁵

Oui Non

Si oui, quel(s) produit(s) de tarissement intramammaire utilisiez-vous avant?³⁰⁶

• • •

Quel pourcentage des vaches avec une mammite clinique pendant la lactation reçoivent un traitement antibiotique intramammaire?³⁰⁷ %

Quel(s) produit(s) de traitement intramammaire utilisez-vous en cas de mammite clinique pendant la lactation?³⁰⁸

• • •

4 Biosécurité et achat

Est-ce que des animaux ont été introduits dans le troupeau au cours des deux dernières années?⁴⁰¹

Oui Non

Si oui, avant d'introduire un animal dans l'élevage, est-ce que vous demandez?

	Oui	Non
Un comptage cellulaire bas pour l'animal ⁴⁰²	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Un comptage cellulaire bas pour le réservoir ⁴⁰³	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Une culture bactérienne du lait de l'animal ⁴⁰⁴	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Une culture bactérienne du lait de réservoir ⁴⁰⁵	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Après leur séparation d'avec leur mère, mais avant le sevrage, est-ce que les veaux laitiers ont un contact (nez à nez) avec des vaches adultes?⁴⁰⁶

Oui Non

Est-ce que les génisses de remplacement (moins de six mois) ont un contact (nez à nez) avec des vaches adultes?⁴⁰⁷

Oui Non

5 Mammites contagieuses

À partir de quel niveau de comptage cellulaire du lait de réservoir considérez-vous avoir des problèmes de mammites?⁵⁰¹ cellules/millilitre

Avez-vous eu un ou plusieurs comptages cellulaire de plus de 400 000 cellules/millilitre au cours de la dernière année?⁵⁰²

Oui Non

Avez-vous des problèmes de mammites contagieuses (exemple : *Staphylococcus aureus*)?⁵⁰³

Oui Non

Prenez-vous des mesures particulières pour le contrôle des mammites contagieuses (exemple : identification et ségrégation des animaux infectés)?⁵⁰⁴

Oui Non

Avez-vous déjà eu des mammites à mycoplasmes (confirmées par une culture, un PCR ou une nécropsie) dans le troupeau au cours des deux dernières années?⁵⁰⁵

Oui Non

Si oui, s'agissait-il de *Mycoplasma bovis*?⁵⁰⁶

Oui Non

6 Veaux et génisses de remplacement

Est-ce que les génisses de remplacement sont élevées sur la ferme?⁶⁰¹

Oui Non

Si oui, est-ce que les génisses de remplacement sont élevées dans un bâtiment séparé?⁶⁰²

Oui Non

Est-ce que les veaux reçoivent du lait entier non pasteurisé?⁶⁰³

Oui Non

Quel pourcentage de lait donné à aux veaux est?

Du lait de remplacement :⁶⁰⁴ %

Un pool de lait entier non pasteurisé :⁶⁰⁵ %

Un pool de lait entier pasteurisé :⁶⁰⁶ %

Du lait provenant de vaches mammites ou à comptage cellulaire élevé ou avec des résidus médicamenteux :⁶⁰⁷ %

Est-ce que c'est la même personne qui s'occupe des soins des veaux et de la traite?⁶⁰⁸

Oui Non

Avez-vous eu des infections à *Mycoplasma bovis* (pneumonie, otite ou arthrite confirmées par une culture, un PCR ou une nécropsie) chez les génisses de remplacement au cours des deux dernières années?⁶⁰⁹

Oui Non

Quel pourcentage de des génisses de remplacement ont les problèmes suivants?

Pneumonie :⁶¹⁰ %

Otite :⁶¹¹ %

Arthrite :⁶¹² %

Quel(s) antibiotique(s) utilisez-vous principalement (l'éleveur) pour le traitement des infections chez les veaux et les génisses de remplacement dans les cas suivants?

Pneumonie : ⁶¹³	•	<input type="text"/>	•	<input type="text"/>
Arthrite : ⁶¹⁴	•	<input type="text"/>	•	<input type="text"/>
Diarrhée : ⁶¹⁵	•	<input type="text"/>	•	<input type="text"/>
Otite : ⁶¹⁶	•	<input type="text"/>	•	<input type="text"/>
Omphalite : ⁶¹⁷	•	<input type="text"/>	•	<input type="text"/>

Est-ce que les veaux sont vaccinés contre les virus respiratoires avant l'âge de six mois?⁶¹⁸

Oui Non

Annexe 2 : Procédure d'échantillonnage



PROCÉDURE D'ÉCHANTILLONNAGE

Enquête de prévalence des mycoplasmes dans le lait de réservoir des troupeaux de bovins laitiers du Québec

1. Prélèvement et envoi des échantillons

Dans le cadre de cette enquête, vous devez prélever un échantillon du réservoir de lait de chacun des troupeaux sélectionnés, à trois reprises sur une période d'environ trois mois. Dans la mesure du possible, ces échantillons doivent être prélevés aux dates proposées afin de faciliter la gestion des échantillons au laboratoire (voir la lettre de transmission). Voici les procédures à suivre :

- Brasser le réservoir de lait avant le prélèvement pendant 5 à 10 minutes;
- Prélever un échantillon du réservoir de lait de manière la plus aseptique possible, afin d'éviter toute contamination (seringue et pipette stériles, gants);
- Utiliser un tube à lait usuel;
- Identifier l'échantillon à l'aide d'un marqueur permanent en indiquant le nom de la ferme ainsi que le numéro d'échantillon correspondant (voir la lettre de transmission);
- Garder l'échantillon réfrigéré en tout temps (avant et pendant le transport). Ne jamais congeler l'échantillon. Si l'échantillon est congelé il ne pourra pas être analysé;
- Prélever l'échantillon un lundi, mardi ou mercredi;
- Préparer l'échantillon en vue du transport en utilisant la technique du triple emballage : tube de lait, absorbant, emballage secondaire, réfrigérant, protection contre les chocs, emballage extérieur, marquage;
- S'assurer que l'échantillon est acheminé au laboratoire le même jour que le prélèvement;
- Faire l'envoi de l'échantillon par Dicom Express (cocher « port dû » et inscrire le numéro de compte : 598107) à l'adresse suivante :

Laboratoire d'expertise en pathologie animale du Québec
Réception des échantillons
2700, rue Einstein, C.R.C.135
Québec (Québec) G1P 3W8

- Inscrire « Enquête prévalence mycoplasmes » dans la section description du troupeau et anamnèse ainsi que le code de programme « 0714 » dans la section motif de soumission de la demande d'analyse de laboratoire (annexe 1).

2. Questionnaire

Vous devez remplir un questionnaire pour chacun des troupeaux sélectionnés. Ce questionnaire doit être envoyé au D^r Luc Bergeron à l'adresse suivante :

Institut national de santé animale
200, chemin Sainte-Foy, 11^e étage
Québec (Québec) G1R 4X6.

Si vous désirez obtenir une version électronique de ce questionnaire, vous devez en faire la demande à l'adresse suivante : luc.bergeron@mapaq.gouv.qc.ca.

3. Facturation

Les honoraires vétérinaires associés à cette collecte de données sont remboursés en totalité par le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation par l'entremise du *Programme d'amélioration de la santé animale au Québec*. Pour le paiement, vous devez inscrire sur votre relevé d'honoraires « Enquête prévalence mycoplasmes » et le faire parvenir au D^r Luc Bergeron.

Pour chaque troupeau sélectionné, un total de trois relevés d'honoraires doivent être soumis. Ci-dessous, notre estimation du temps maximum que vous pouvez facturer au tarif régulier pour cette collecte de données :

1. Premier prélèvement et questionnaire : une visite plus 45 minutes **ou** 60 minutes si c'est dans le cadre d'une autre visite;
2. Deuxième prélèvement : une visite **ou** 15 minutes si c'est dans le cadre d'une autre visite;
3. Troisième prélèvement : une visite **ou** 15 minutes si c'est dans le cadre d'une autre visite.

Même si vous faites ces prélèvements dans le cadre d'une autre visite, vous devez facturer les honoraires associés à cette collecte des données sur un relevé d'honoraires séparé (sans la visite). Vous trouverez un exemple de relevé d'honoraires à l'annexe 2.

Pour toute information supplémentaire concernant cette procédure d'échantillonnage, veuillez communiquer avec le D^r Luc Bergeron au 418 380-2100, poste 3106 ou à l'adresse suivante : luc.bergeron@mapaq.gouv.qc.ca.

Annexe 1

Agriculture, Pêches et Alimentation Québec		LABORATOIRES DE DIAGNOSTIC ET D'ÉPIDÉMIOLOGIE													
Institut national de santé animale		LAIT													
		No de dossier :													
NOM DU VÉTÉRINAIRE :		NOM DU PROPRIÉTAIRE :													
No d'identification ministériel (NIM) du vétérinaire		No d'identification ministériel (NIM) du propriétaire													
1 2 3 4 5 6 7 8 9		1 2 3 4 5 6 7 8 9													
Adresse de la clinique		Adresse du site d'origine des soumissions													
000, rue clinique vétérinaire		000, rue propriétaire													
Ville clinique vétérinaire		Ville propriétaire													
Code postal XXX 0X0		Code postal XXX 0X0													
Tél. : (000) 000-0000		Tél. : (000) 000-0000													
Fax : (000) 000-0000															
MOTIF DE SOUMISSION		DESCRIPTION DU TROUPEAU ET ANAMNÈSE													
Programme : 0714		Espèce : Race :													
Contrôle (préventif) <input type="checkbox"/> Maladie (curatif) <input type="checkbox"/>		Nombre d'individus (total) :													
Échantillons		Comptage cellulaire :													
Nombre : réfrigéré 1 congelé		Nombre de malades :													
Origine : vaches <input type="checkbox"/> réservoir <input type="checkbox"/>		Traitement :													
Observations cliniques		Commentaires :													
<input type="checkbox"/> Mam. Subclinique <input type="checkbox"/> Mam. Chronique		ENQUÊTE PREVALENCE MYCOPLASMES													
<input type="checkbox"/> Mam. Aigue <input type="checkbox"/> R.A.S.															
Analyses demandées															
<input type="checkbox"/> Antibiogramme <input checked="" type="checkbox"/> Mycoplasme <input type="checkbox"/> Autres :															
POUR COMPLÉTER LA SECTION CI-DESSOUS, VOIR INFORMATION AU VERSO															
Tube no	Échantillons				Identification animale	Lactation (1-2-4)	Période (a-b-c-t)	Tube no	Échantillons				Identification animale	Lactation (1-2-4)	Période (a-b-c-t)
	Q1	Q2	Q3	Q4					Comp.	Q1	Q2	Q3			
1					Réservoir # 0-000			16							
2								17							
3								18							
4								19							
5								20							
6								21							
7								22							
8								23							
9								24							
10								25							
11								26							
12								27							
13								28							
14								29							
15								30							
Échantillon (s) prélevé (s) le : 2009-00-00															
Commentaires :															
J'affirme que les renseignements fournis sont exacts et qu'ils peuvent servir d'information au ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation aux fins d'identifications et de statistiques. Conformément aux espérances du chapitre III de la Loi sur l'accès aux documents des organismes publics et sur la protection des renseignements personnels, le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec vous informe que les renseignements nominatifs recueillis sur cette fiche seront traités de façon confidentielle et ne seront communiqués qu'aux seules personnes ou organismes autorisés selon les modalités prévues à la Loi sur l'accès, article 67, 67.2 et 68.1.															
Signature du médecin vétérinaire : N Date : 2009-00-00															
Échantillons expédiés le : 2009-00-00															
Signature du propriétaire ou son (sa) représentant (e)															
RÉSERVE AU LABORATOIRE :															
Date de réception : Heure de réception :															
État des échantillons à la réception : chambrés <input type="checkbox"/> réfrigérés <input type="checkbox"/> congelés <input type="checkbox"/> réfrigérant <input type="checkbox"/> au comptoir <input type="checkbox"/>															
Colis acceptés <input type="checkbox"/> Colis acceptés non conforme <input type="checkbox"/> Colis refusés <input type="checkbox"/> raison :															
Commentaires :															

5.7-Spécimens envoi F- Lait (05-07)

Annexe 2

**Agriculture, Pêcheries
et Alimentation
Québec**

RELEVÉ D'HONORAIRES
Programme d'amélioration de la santé animale au Québec

NIM 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Bénéficiaire: Ferme X

9 0 0 2 4 Québec
Code géographique Municipalité

* En outre, mentionner dans le cas où les services ont été dispensés après une visite domiciliaire en vertu du code gén. le poste du vétérinaire.

DOSSIER													
Cas N°	Espèce	Code DX	Espèce	N° d'identification de l'animal	Nombre d'animaux				MOC*	Diagnostic clinique	Tari	Ouv \$	Planch \$
					Examés	Traité	Mort	Surv					
1	P	IMY	12	Réservoir	0	0	0	1			V	45 07	
2	P	IMY	12	Réservoir	0	0	0	1			H	87 65	
3													
4				ENQUÊTE PRÉVALENCE MYCOPLASMES									
5													
6													
7									Matériel		2 00		

AUTRES HONORAIRES ET SERVICES :

Tarif supplémentaire 2 3 Si tarif à l'heure: 1 0 1 4 5 134 70

Coursit Prévenir Kilomètre TOTAL Sous-total

ORDONNANCE VÉTÉRINAIRE NON RENOUVELABLE											
Cas N°	Nom du médicament	Code de G.M.V.	Formet	Concentration	Quantité	Dose	Administration	Durée	Déla Consultat- Lac/Our	Yards	Coût \$

MATÉRIEL UTILISÉ :

1) C = Intervention curative P = Intervention préventive
2) Labo, 1 = MAFPAQ 2 = FMV 3 = Autres
3) Consignes au numéro de cas de la partie «Dossier»
4) Déla d'attente: Les produits provenant des animaux faisant l'objet de cette ordonnance ne doivent pas être utilisés à des fins de consommation dans un déla inférieur au nombre de jours (J) ou au nombre d'heures (H) suivant la fin de l'utilisation de ce médicament.
5) MOC = Motif de Consultation
Conditions relatives au paiement de par le bénéficiaire: Net 30 jours. Des traie d'administration de l'ordre de 1,0% par mois ou 18% par année seront exigés du bénéficiaire sur tout montant non payé à l'échéance.

ATTEINTE DU PLAFOND : Oui Non Payé Facturé (paiement à l'ordre du vétérinaire) TOTAL BÉVEUR

X Signature du bénéficiaire 2 0 1 9 0 3 3 1 0 1 8 0 0

Année Mois Jour Heure début (00:01 à 24:00) Signature du Vétérinaire N° de permis 0000

MANDATAIRE T.P.S. N° T.V.Q. N° DOSSIER : 600502

INQA 2005-08