

Évaluation des sources d'exposition à *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* dans les aliments et l'eau

Biljana Mihajlovic^{1,*}, Mark Klassen², Susan Springthorpe³, Hélène Couture¹ et Jeff Farber¹

1. Division de l'évaluation microbiologique, Bureau des dangers microbiens, Direction des aliments, Direction générale des produits de santé et des aliments, Santé Canada, Canada

2. Canadian Cattlemen's Association, Canada

3. Centre de Recherche en Microbiologie Environnementale (CRME), Faculté de médecine, Université d'Ottawa, Canada

* Adresse électronique de l'auteur-ressource: Biljana.Mihajlovic@hc-sc.gc.ca

Reçu le 8 juillet 2011; la version finale reçue le 20 octobre 2011

© 2011 Mihajlovic et al.; licensee InTech. Ceci est un article en libre accès distribué sous les termes de la Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), qui permet l'utilisation illimitée, la distribution et la reproduction sur tout support, à condition que le travail original est correctement cité.

Résumé On croit que *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) est l'agent causal de la paratuberculose (maladie de Johne) chez les ruminants. L'infection par MAP pourrait aussi être en cause dans la maladie de Crohn (MC) chez les humains. Bien qu'un lien de cause à effet doive toujours être démontré ou réfuté, un nombre croissant d'études récentes donnent à penser qu'il existe un lien entre MAP et la MC.

Il semble que les bovins infectés, de même que les vecteurs de transmission connexes soupçonnés tels que le lait, les produits laitiers et le bœuf, constituent la principale source d'exposition à MAP chez les humains. L'approvisionnement en eau ainsi que les légumes et les fruits contaminés par MAP sont d'autres voies d'exposition éventuelles à la bactérie chez les humains.

Lors de certaines études sur le lait pasteurisé et les fromages vendus au détail réalisées dans plusieurs pays autres que le Canada, un faible taux de survie de MAP a été démontré. Dans de nombreux autres pays, la prévalence de cellules viables de MAP a été établie à 1,6 à 2,9 % dans des échantillons de lait pasteurisé et à 3,6 %

dans des fromages vendus au détail. En outre, MAP viable a été découverte dans l'intestin et les tissus lymphoïdes associés d'animaux malades, de même que dans des organes autres que l'intestin. Le principal objectif du présent article consiste à examiner les observations scientifiques récentes sur l'exposition potentielle à MAP par les aliments et l'eau chez les humains.

Mots clés *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, aliments, eau

1. Introduction

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) est l'agent causal de la paratuberculose (maladie de Johne (MJ)) chez les ruminants. Il s'agit d'une maladie infectieuse d'évolution lente caractérisée par une entérite granulomateuse chronique dégénérative atteignant la partie distale de l'intestin grêle, du côlon et des tissus lymphoïdes associés [1]. Les signes cliniques de la maladie comprennent une diarrhée persistante chez

certaines espèces (bovins), la diminution de la production laitière, la perte de poids et l'émaciation graduelle. La paratuberculose est une maladie évolutive. Chez les animaux qui en sont atteints, l'émaciation progresse et habituellement, ils meurent de déshydratation et de cachexie aiguë. L'hypothèse selon laquelle les animaux âgés de moins de six mois sont les plus vulnérables à l'infection par MAP a été avancée [2]. Habituellement, les signes cliniques de la maladie ne sont pas détectés avant que l'animal atteigne l'âge de deux ans. Chez certains animaux infectés, les signes cliniques ne se manifestent jamais, mais dans ces cas, ils continuent d'excréter l'organisme et deviennent une source de MAP infectant leur descendance et d'autres animaux [3].

L'élevage d'autres ruminants tels que le bison, le chevreuil et le wapiti est en progression au Canada, et des cas d'infection par MAP ont aussi été observés chez ceux-ci [4]; [5]; [6]; [7]; [8]; [9]. L'infection par MAP et des éclosions de la maladie chez des ruminants sauvages ont aussi été signalés, dont chez des cerfs des keys, des mouflons d'Amérique, des chèvres des montagnes Rocheuses et des saïgas [10]; [11]; [12]. Il est établi que des espèces sauvages autres que les ruminants, par exemple, les primates, les renards, les belettes, les hermines, les corneilles noires, les corbeaux freux, les choucas des tours, les rats, les mulots sylvestres, les lièvres, les lapins et les blaireaux sont aussi vulnérables à l'infection par MAP [13]. Compte tenu de la vulnérabilité généralisée de plusieurs espèces animales, on a proposé de considérer MAP comme agent pathogène zoonotique pouvant infecter les humains et être à la source de maladies chez ceux-ci.

La maladie de Crohn est une affection intestinale inflammatoire (AII) qui atteint principalement l'intestin grêle et le côlon, mais qui provoque également des lésions dans le reste du tractus gastrointestinal chez les humains. La perte de poids, les douleurs abdominales, la diarrhée, la fièvre et la fatigue en sont les principaux symptômes. La maladie de Crohn est une affection chronique et débilitante exigeant, dans bien des cas, plusieurs résections de l'intestin. Jusqu'à présent, aucune guérison de la maladie par les médicaments n'a été observée, mais le traitement et la prise en charge de l'affection procurent un soutien. La maladie apparaît le plus souvent chez des patients âgés de 16 à 25 ans, lesquels en sont atteints la vie entière. L'objectif principal des traitements consiste à maîtriser la maladie en prolongeant et en multipliant les rémissions. Bien que l'origine infectieuse de la MC fasse l'objet de soupçons depuis longtemps, il demeure évident que des facteurs génétiques et immunologiques importants sont aussi en cause. Un nombre croissant d'études et une méta-analyse récente [14] donnent à penser qu'il existe un lien entre MAP et la MC, mais cette relation de cause à effet reste à être démontrée ou réfutée.

Aucune conclusion à l'égard du rôle que MAP peut jouer dans l'étiologie de la MC ne figure dans le présent article, mais le potentiel d'exposition des Canadiens à cet organisme par des sources alimentaires y est étudié. Bien que les observations scientifiques ne soient toujours pas concluantes, plusieurs considèrent que limiter l'exposition humaine à MAP constitue une précaution justifiée.

La prévalence réelle de MAP dans l'approvisionnement alimentaire canadien est inconnue. Les vecteurs de transmission de MAP mis en cause chez les humains sont le lait, les produits laitiers (par exemple, le fromage, la crème, le beurre et le yogourt), le bœuf et l'eau. Cependant, on peut raisonnablement supposer que tout produit contaminé par des matières fécales de bovins, d'autres animaux, ou éventuellement d'humains, est susceptible d'être contaminé par MAP. Vu l'attention particulière consacrée au lait comme source de MAP, les données sur la présence de l'organisme dans ce produit sont plus abondantes que sur la contamination d'autres aliments par celui-ci. Par conséquent, le lait et l'efficacité de la pasteurisation constitueront les axes principaux du présent document. L'examen des autres produits laitiers, du bœuf, des fruits et légumes, du poisson et des mollusques et des crustacés tout de même l'eau et de l'environnement y est proportionnel à la disponibilité de l'information à leur propos. En matière de salubrité des aliments, aux fins du contrôle des aliments contaminés par MAP, la détermination de l'efficacité des technologies de transformation des aliments telles que le traitement thermique est essentielle. Le présent examen porte sur des observations scientifiques récentes et fournit une évaluation préliminaire de l'exposition à MAP par les aliments et l'eau chez les humains tout en résumant la distribution potentielle de MAP dans l'approvisionnement alimentaire canadien.

2. Méthodes diagnostiques

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* est un bacille intracellulaire acidorésistant dont la croissance est extrêmement lente. Ces organismes sont très petits (0,5 x 1,5 µm) et se présentent naturellement en amas regroupant jusqu'à plusieurs centaines de cellules bactériennes. À cause de la teneur élevée en lipides de leur paroi cellulaire, les mycobactéries résistent à la décoloration par l'alcool acide pendant la coloration résistante à l'acide (coloration de Ziehl-Neelsen ou de Kinyoun); elles retiennent le premier colorant (fuchsine phénatée) et deviennent rouges (acido-résistantes). On estime que les formes de MAP dépourvues de paroi cellulaire jouent un rôle important à l'égard de la MC [15] sans pouvoir être détectées par la coloration résistante à l'acide. On croit que MAP est un parasite pathogène obligatoire des animaux pouvant croître et proliférer dans

les cellules hôtes uniquement, le plus souvent, dans des macrophages [16]. En contexte de croissance *in vivo*, MAP obtient du fer des protéines liant le fer de l'hôte, particulièrement de la transferrine. En culture *in vitro*, la croissance de l'organisme nécessite de la mycobactine exogène (un agent chélateur du fer produit par toutes les autres mycobactéries) [1].

Actuellement, plusieurs méthodes existent pour diagnostiquer l'infection par MAP. Celles-ci peuvent être réparties en deux groupes. Le premier vise la détection de l'organisme (MAP) et comporte un examen microscopique de frottis de fèces et de tissus, une culture bactérienne standard, un milieu liquide radiométrique et une sonde d'ADN ou une réaction en chaîne de la polymérase (PCR). Généralement, la spécificité de cette méthode est élevée et la sensibilité de celle-ci augmente avec la progression de la maladie. Le second comporte des tests indirects et consiste en des épreuves qui détectent les réponses à médiation cellulaire ou les réponses immunitaires humorales, par exemple, les tests d'interféron gamma (IFN- γ) et méthode de dosage immunoenzymatique (ELISA). En règle générale, leur spécificité est assez élevée (97 à 99%), toutefois, leur sensibilité est faible dans bien des cas, soit à moins de 50% chez les animaux dont la coproculture est positive [17]; [18]; [19] ou de 20% chez les populations à faible incidence. À cause de la longueur et de la variabilité de la période d'infection inapparente et des « méthodes de référence » imparfaites employées pour définir l'état infectieux, il est difficile de déterminer la sensibilité et la spécificité d'une épreuve diagnostique pour cette maladie. En général, une culture des ganglions mésentériques et de l'iléon constitue la méthode de référence actuelle pour la confirmation de l'infection chez l'animal.

Pour diagnostiquer l'infection par MAP, le test **ELISA** est l'analyse sérologique la plus utilisée. Ce test exige peu de temps, il est économique et convient au dépistage chez un grand nombre d'animaux. La faible production d'anticorps aux phases initiales, plutôt que l'incapacité du test à détecter les anticorps sériques, rend la détection précoce de l'infection par MAP généralement ardue. Cependant, l'efficacité de la détection augmente avec la progression de la maladie. Chez les jeunes animaux récemment infectés récemment, la sensibilité du test serait faible; par conséquent, celui-ci ne peut être utilisé pour la détection de la maladie dans les exploitations agricoles exposées depuis peu [20]; [21]; [22]. Un test ELISA d'une spécificité accrue du ministère de l'Agriculture américain (USDA), évalué par des chercheurs de l'Université du Wisconsin, a été recommandé à titre de test de dépistage préliminaire visant à déterminer si l'infection par MAP est présente au sein du troupeau [23]; [24]. Chez les troupeaux positifs pour MAP, le test ELISA doit être suivi

par une épreuve PCR ou une coproculture bactériologique afin de confirmer l'infection chez les animaux dont le résultat est positif au test ELISA et de déterminer les animaux infectés ne produisant pas d'anticorps sériques (et qui ne sont pas détectables au moyen du test ELISA). Ainsi, lorsqu'une assurance de l'absence d'infection par MAP est nécessaire, deux tests distincts doivent être effectués. En d'autres mots, l'amélioration de la sensibilité de la détection de MAP peut se trouver améliorée en effectuant parallèlement plusieurs tests diagnostics.

Selon certains auteurs, pour la détection de l'infection par MAP à ses débuts, les épreuves détectant l'IFN- γ , un effecteur de la réponse à médiation cellulaire à l'infection par MAP, sont plus efficaces que les autres tests immunologiques [25]. Cependant, la faiblesse de la sensibilité et de la spécificité du test a été signalée [26].

Hulten et coll. (2000a) [27] ont fait état d'une nouvelle méthode d'hybridation *in situ* pour la détection des formes de MAP dépourvues de paroi cellulaire (sphéropastes) dans des échantillons de tissus. Les auteurs ont injecté des sphéropastes de MAP dans des échantillons de bœuf, de même que plusieurs microorganismes témoins intacts ou de type sphéropastes afin de s'assurer de la spécificité et de la sensibilité de la méthode (*M. smegmatis*, *M. tuberculosis*, *Helicobacter pylori* et *Escherichia coli*). Puisque seuls les échantillons auxquels les formes de MAP dépourvues de paroi cellulaire, ou de type sphéropastes, ont hybridé avec la sonde, mais non avec MAP acidorésistant, cette méthode est prometteuse pour la détection des infections inapparentes par les formes de MAP dépourvues de paroi cellulaire. Depuis, les auteurs [28] ont recouru à cette technique pour la détection de MAP dans les tissus des patients atteints de MC.

Pour la détection de MAP, la **culture bactériologique** est la méthode diagnostique la plus concluante et utilisée. Toutefois, cette méthode comporte un inconvénient de taille: la croissance de l'organisme peut requérir de 8 à 16 semaines (et parfois jusqu'à un an). En raison de la durée de l'incubation, la contamination par des champignons ou d'autres bactéries survient fréquemment. Par conséquent, une étape de décontamination est requise pour éliminer sélectivement les organismes autres que les mycobactéries. Parvenir à une décontamination adéquate, sans désactiver MAP ni inhiber sa croissance, constitue la difficulté propre à ce processus, et une source de controverse quant à la méthodologie en mycobactériologie. L'effet indésirable de l'étape de décontamination sur MAP et par conséquent, sur la sensibilité de la culture bactériologique, a été démontré [29]. La culture de l'agent à partir d'échantillons cliniques ou prélevés dans l'environnement, notamment

d'aliments, comporte les étapes suivantes: 1) la concentration au moyen de la centrifugation, la filtration, la sédimentation ou la séparation immunomagnétique; 2) la décontamination et l'incubation préalable; et 3) la culture en recourant à un milieu bactériologique traditionnel, un milieu de culture radiométrique ou des systèmes de culture automatisés non radiométriques. Avec divers antibiotiques tels que la vancomycine, l'amphotéricine et l'acide nalidixique, le chlorure d'hexadecylpyridinium (HPC) et le chlorure de benzalkonium sont les décontaminants les plus fréquemment utilisés. En outre, le recours à une méthode de traitement fondée sur l'utilisation de détergent zwitterionique (C₁₈-carboxypropylbétaine [CB-18]) a été signalé [30]. Le seuil de détection le plus faible de cette méthode a été lié à son incidence moindre sur la viabilité des mycobactéries et à la capacité du détergent de disperser les organismes qui habituellement, s'amassent dans les sédiments traités. Une publication de Dundee et coll. (2001) [31] traite de l'évaluation comparative de quatre protocoles de décontamination visant l'isolement de MAP à partir de lait et fait état d'importants écarts entre l'efficacité des méthodes généralement utilisées. Les quatre méthodes en question sont les suivantes: 1) traitement au chlorure d'hexadecylpyridinium (HPC) 0,75% pendant 5 h; 2-3) méthodes Cornell recourant au bouillon d'infusion cœur-cerveille contenant du HPC 0,75 et 0,9%, respectivement; et 4) méthode CB-18. Le taux de récupération de MAP dans le lait des deux méthodes de Cornell s'est révélé médiocre (<1% des échantillons inoculés avec 10⁶ UFC/ml). Avec un taux de détection atteignant jusqu'à 17%, la méthode CB-18 s'est révélée plus prometteuse. Toutefois, ses limites de détection ont été établies à 10⁵-10⁶ UFC/40 ml de lait. Comme elle détecte 10-100 UFC/40 ml de lait, la méthode recourant au HPC 0,75% s'est révélée le seul moyen suffisamment sensible pour y détecter MAP. La piètre récupération de MAP à la suite de la décontamination peut entraîner une sous-estimation du nombre réel de ces organismes présents dans le lait.

L'existence de diverses variantes génotypiques de souches MAP est bien admise [32]; [33]. Il semble que les souches ont un certain degré de spécificité d'hôte, de même que diverses exigences pour leur croissance [33]; [34]. Par conséquent, la réussite de l'isolement de MAP par culture bactériologique dépend également du milieu de culture utilisé. Une souche fréquemment isolée chez les bovins (B) présente une bonne croissance sur le milieu de culture au jaune d'œuf de Herrold (HEYM) et que celle-ci s'améliore en présence de pyruvate de sodium tandis que les milieux de culture de Lowenstein-Jensen (LJ), Middlebrook 7H10 et 7H11 sans pyruvate ajouté sont recommandés pour favoriser la croissance de souches isolées chez les ovins (O) [35]. Donaghy et coll. (2003) [36] ont évalué trois milieux de culture

fréquemment utilisés: le HEYM avec vancomycine, amphotéricine B et acide nalidixique (HEYM/VAN); le BACTEC 12B avec polymyxine, amphotéricine B, acide nalidixique, triméthoprim et azlocilline (BACTEC/PANTA PLUS); et le Middlebrook 7H10/PANTA pour la récupération de MAP dans le fromage. Les auteurs ont signalé que le 7H10/PANTA et, dans une moindre mesure, le HEYM/VAN se sont révélés très efficaces pour la récupération de MAP tout en inhibant la croissance de la culture de départ et de la microflore contaminante. Le Middlebrook 7H10/PANTA s'est révélé très efficace également pour la récupération de MAP dans le fromage, et ce, sans l'étape de décontamination préliminaire (HPC 0,75 % pendant 5 h) dont l'effet nuisible sur l'isolement de MAP par culture est connu. Enfin, Donaghy et coll. (2003) [36] ont fait état d'une méthode de culture pour la récupération de MAP dans des fromages cheddar. Le milieu solide de base 7H10-PANTA s'est révélé plus efficace que le milieu de culture au jaune d'œuf de Herrold et le milieu liquide BACTEC 12B pour la récupération de MAP pendant la fabrication et l'affinage du cheddar. Le système de culture des mycobactéries de Becton Dickinson (BACTEC radiométrique) est couramment utilisé pour la culture et la détection de MAP. Les principaux avantages de ce système sont sa capacité de culture de MAP chez une grande variété d'espèces animales et celle de détecter l'organisme plus rapidement que la culture bactériologique standard. Quelques études préliminaires ont signalé l'efficacité du système de culture en tubes avec indicateurs de croissance des mycobactéries (*mycobacterial growth indicator tube* [MGIT]) (modifié par l'ajout de mycobactine et d'émulsion de jaune d'œuf) pour la culture de MAP de spécimens animaux et humains [37]; [38]. Entre autres avantages du système de culture MGIT par rapport au système BACTEC radiométrique, notons qu'il ne nécessite pas l'utilisation de matériaux radioactifs ni d'un lecteur automatisé coûteux. Les deux systèmes fonctionnent avec le bouillon liquide et peuvent, par conséquent, être classés comme systèmes de culture à court terme. Le système MGIT contient également de la L-asparagine, de la pyroxydine, des oligoéléments, de la biotine et du glycérol, et on l'a estimé plus adéquat que le système BACTEC pour la récupération de MAP. Naser et coll. ont fait état des mêmes observations [39], [40] tout comme Thomas et coll. (2005) [41], qui ont estimé le système MGIT plus sensible que le système BACTEC pour la détection de MAP tant chez les humains que les animaux, tandis que selon Grant et coll. [29]; [42], les systèmes radiométriques BACTEC et MGIT procurent le même taux de récupération de MAP dans le lait. À la suite de la procédure de décontamination, le seuil de détection des deux systèmes est de 100-1 000 cellules/ml de lait. En tenant compte du fait qu'en général, MAP n'est pas présent en grand nombre dans le lait [43]; [44], on peut s'attendre à des résultats de culture faux-négatifs.

Comme solution de rechange aux systèmes fondés sur la culture, on a récemment fait état de deux systèmes rapides pour le dénombrement de MAP viable dans le lait. D'Haese et coll. [45], [46] ont traité d'une méthode rapide de dénombrement de cellules viables de MAP dans le lait au moyen de la cytométrie en phase solide (CPS). À la suite d'un protocole de décontamination complète, MAP est retenue sur un filtre et marqué par fluorescence avec un colorant spécifique aux organismes vivants (ChemChrome V6). Le taux de récupération de MAP dans le lait inoculé s'est élevé à 73 % (2 cellules/ml). Toutefois, le lait a été inoculé avec des formes de MAP avec paroi cellulaire alors que ce sont les formes de MAP dépourvues de paroi cellulaire qui pourraient constituer le contaminant préoccupant dans le lait liquide. Le potentiel de réaction croisée des anticorps avec les autres bactéries généralement présentes dans le lait pourrait être un inconvénient de ce test. Stanley et coll. (2002) [47] ont proposé le recours à l'amplification des phages pour la détection en 24 à 48 h de cellules viables de MAP dans le lait. Cependant, l'un des inconvénients de cette méthode est l'étape de décontamination qui pourrait éliminer les phages et avoir un effet inhibiteur éventuel sur le test.

Méthodes moléculaires : La détection de la séquence d'insertion IS900 (présente en 14 à 18 copies dans le chromosome de MAP) en utilisant la PCR est un test rapide, spécifique et relativement sensible pour la détection de MAP dans le lait et dans d'autres spécimens cliniques et environnementaux. Elle est utilisée systématiquement pour la confirmation de MAP issu de culture bactériologique. Malheureusement, à cause des inhibiteurs présents dans le lait et les spécimens fécaux, et les difficultés liées à la perturbation de la paroi cellulaire de MAP pour l'extraction de l'ADN, le test n'a pas la sensibilité recherchée, et son seuil de détection a été établi à 1 000 organismes de MAP ou davantage par ml de lait [43]. Certaines difficultés de la détection de MAP ont été surmontées en appliquant des étapes de traitement préalables à la PCR, par exemple, la séparation immunomagnétique (SIM) ou la SIM couplée à une procédure recourant aux billes d'agitation afin de séparer sélectivement et de concentrer les cellules de MAP dans les spécimens (et extraire l'ADN des cellules de MAP ainsi récupérées) dont le seuil de détection a été établi entre 20 UFC/ml et < 10 UFC/ml de lait [48]; [49]. Dans les études reposant sur la PCR, < 100 cellules de MAP/ml de lait ont été détectées [50]; [51]. Buergelt et Williams (2004) [52] ont indiqué que la PCR par amorces incluses appliquée à des échantillons de lait a permis de détecter la plupart des vaches infectées par MAP, que ce soit sur le plan clinique ou sub-clinique, ce qui révèle son potentiel comme outil de dépistage sensible de MAP. Bien que la PCR soit une méthode rapide et très spécifique, elle ne distingue pas les cellules viables des cellules mortes. Selon certaines études, des mycobactéries

environnementales contiennent un homologue du locus IS900, lequel peut provoquer des résultats faux-positifs avec cette méthode [53]; [54]. Cependant, les amorces de PCR correctement conçues [55], ou l'analyse de l'endonucléase de restriction des produits de PCR d'IS900 [53], peuvent distinguer aisément les véritables produits d'IS900 des faux.

Plus récemment, dans un article de Beumer et coll. (2010) [56], faisant état d'une détection de MAP par PCR dans 81% des échantillons d'eau potable et de biofilm a suscité d'autres controverses relatives à la valeur de la détection de MAP par PCR en n'utilisant que la séquence IS900 d'extraits d'ADN. Toutefois, Chiodini et Chamberlin (2011) [57] ont contesté le fait que MAP est un contaminant omniprésent dans l'environnement et ne font état que d'une très faible incidence de MAP dans l'eau potable. Les deux groupes ont convenu [56], [57] que IS900 et 251F doivent être présentes dans MAP, mais des souches dans lesquelles IS900 est absente tandis que 251F est présente et vice versa [57] viennent compliquer encore davantage l'identification de MAP. Plusieurs groupes utilisent systématiquement plus d'un locus pour l'identification de MAP.

D'autres éléments génétiques spécifiques à MAP, par exemple F57, Hsp X et ISMav2 ont aussi été étudiés comme solution de rechange à IS900 pour la détection de MAP par PCR [58]; [59]; [60]. Alexander et coll. (2009) [61] ont apporté des précisions sur les événements d'insertion et de suppression qui ont défini MAP dans un vaste éventail d'échantillons cliniques et ont conclu que dans les véritables espèces de MAP, LSP^{A8} est systématiquement absent. Manifestement, les spécifications définitives pour l'utilisation des méthodes moléculaires pour la détection de MAP sont toujours en cours de détermination et requièrent d'autres travaux. La question de la crédibilité que l'on doit accorder aux études faisant état d'un résultat positif pour MAP qui découle de la seule détection d'IS900 d'échantillons environnementaux est discutable.

Coculture avec des protozoaires libres: La coculture de MAP avec certains protozoaires libres peut améliorer sa détection [62]; [63]. Bien que cela puisse être démontré systématiquement en laboratoire, la mesure dans laquelle cette situation se produit dans l'environnement ou dans les aliments est inconnue. En établissant une analogie avec *Legionella*, l'incorporation de MAP dans des protozoaires libres pourrait amplifier le potentiel de contact avec les humaines et leur exposition à la bactérie. Bien que les protozoaires libres soient omniprésents et se trouvent dans les laiteries et les usines de transformation des viandes, leur relation synergique potentielle avec MAP dans ces milieux demeure nébuleuse.

3. Prévalence de MAP

Lait et autres produits laitiers

Lait

La contamination du lait par MAP peut se produire de deux façons: soit les organismes sont directement répandus dans le lait par le pis, soit il est contaminé par des matières fécales. Même une petite quantité de matière fécale peu suffire à introduire d'importantes populations de MAP dans le lait cru. Le fait que la culture de MAP à partir de lait de vaches atteintes cliniquement de paratuberculose soit possible est connu de longue date [64]. Toutefois, chez les animaux atteints d'une infection inapparente, l'organisme peut aussi se propager dans le lait [44]. Les auteurs [44] ont signalé que 11,6% des porteurs asymptomatiques excrètent en moyenne de 4×10^2 UFC/ml à 16×10^2 UFC/ml de lait. Dans le cadre de cette étude, MAP a été cultivé à partir de lait de 19% de vaches saines excrétant de grandes quantités de MAP dans leurs fèces et de lait de 11% et de 3% de vaches excrétant respectivement peu et moyennement l'organisme. Chez les vaches infectées cliniquement, l'excrétion de l'organisme peut varier de < 100 UFC/ml et atteindre $1\ 000$ UFC/ml de lait [43]; [44]; [65]. Des 81 échantillons de ganglion lymphatique mammaire prélevés chez des vaches asymptomatiques, 22 (27%) se sont révélés positifs à la culture. Dans une étude dont Streeter et coll. ont fait état (1995) [3], l'organisme a été cultivé à partir du colostrum de 22,2% animaux cliniquement normaux dont la coproculture s'est révélée positive et du lait de 8,3% de ceux-ci. MAP peut être présent en bien plus grand nombre dans les fèces d'une vache infectée que dans son lait. Selon l'estimation, le nombre de bacilles viables présents chez un bovin cliniquement atteint de paratuberculose varie de 10^5 à 10^6 UFC/g et peut même excéder 10^8 UFC/g de fèces [66]; [67].

Selon des enquêtes sérologiques récentes chez des bovins laitiers, dans les provinces canadiennes, les taux de prévalence chez l'animal varient de 2,4 à 9,1% [68]. Comme exposé ci-dessus, tant les animaux qui présentent des symptômes que les animaux asymptomatiques excrètent sporadiquement dans leurs fèces un nombre important d'organismes. Ainsi, puisque la MJ est présente chez les bovins laitiers canadiens, il semble inévitable que MAP se retrouve dans les réservoirs de lait cru.

Il est difficile d'estimer le taux de contamination du lait dans les réservoirs sans connaître le taux de contamination du lait à l'exploitation agricole. Par exemple, selon le nombre de vaches positives pour MAP dans le troupeau et le moment auquel le lait est mis en commun, quelle est sa prévalence dans le lait cru à l'exploitation agricole? Sans ces données, et en tenant compte du faible taux de récupération de MAP vivante à partir du lait, il serait hasardeux de conjecturer le degré

de contamination du lait cru ou de celui vendu au détail. Une étude visant à déterminer la prévalence des excréteurs dans le lait (ELISA et culture) dans les troupeaux positifs pour MAP devraient être combinée avec une culture pour détecter MAP dans le lait cru afin d'estimer le mieux possible la quantité d'organismes réellement présents dans le lait en vrac.

Lait pasteurisé

Plusieurs chercheurs ont évalué la survie de MAP dans le lait pasteurisé en recourant à une variété de systèmes de pasteurisation de laboratoire ainsi que dans des installations de pasteurisation commerciales [65]; [69]; [70]; [71]; [72]. La présence de cellules viables de MAP a été détectée par des groupes de recherche de la République tchèque, du Royaume-Uni, des États-Unis et de l'Inde [73]; [74]; [75]; [76] dans le lait vendu au détail.

En raison des difficultés que pose la culture de MAP, les études de survie à la suite de la pasteurisation se sont révélées problématiques. Un résumé des études sur l'inactivation de MAP dans le lait par la pasteurisation figure au tableau 1. Grant et coll. (1999) [77] ont avancé qu'en des concentrations supérieures à 100 UFC/ml, MAP peut survivre à la pasteurisation haute température courte durée (HTST) (72°C pendant 15 secondes), possiblement grâce à l'agglutination des cellules dans le lait cru contaminé naturellement. Cette étude donne aussi à penser qu'en faisant passer la durée de l'HTST de 15 à 25 secondes, l'inactivation de MAP présent en grandes concentrations (10^6 UFC/ml) serait possible. L'augmentation de la température n'a pas eu le même effet. Depuis 1993, plusieurs études ont montré la capacité de MAP à survivre à la pasteurisation en discontinue ou à l'HTST [78]. Ces études ont fait l'objet de critiques en raison de la variabilité mentionnée ci-dessus des méthodes de pasteurisation en laboratoire ainsi que du fait qu'il est possible que l'inoculation de lait cru ne reflète pas le processus naturel de contamination puisque les souches de laboratoire peuvent être plus ou moins résistantes au traitement thermique. Il convient de noter que dans la plupart des études, le lait utilisé n'était pas du lait contaminé naturellement, mais plutôt du lait inoculé avec MAP issue d'une culture en laboratoire. En résumé, l'agglutination des cellules, la présence ou l'absence d'une paroi cellulaire, le stade de croissance et le nombre de bacilles présents dans le lait avant la pasteurisation sont les facteurs dont on pense qu'ils influent sur la survie de MAP [16].

Type d'échantillon	Type de pasteurisation	Appareillage	Réduction / Survie de MAP	Référence
Lait enrichi (2 souches bovines, 2 souches humaines)	Standard* HTST**	Bain-marie / réacteur agité en lots de laboratoire	1 log ou moins	[70]
Lait enrichi – 100 UFC/ml (3 souches bovines thermorésistantes)	HTST	Unités de pasteurisation de laboratoire	Inefficace***	[77]
Lait enrichi (variation de 7×10^3 à 16×10^3 UFC/ml) (1 souche type, 1 souche humaine, 3 isolats bovins)	63 °C, 15 secondes 66 °C, 15 secondes 69 °C, 15 secondes 72 °C, 15 secondes	Unité de laboratoire – débit turbulent	Efficace, mais le lait pasteurisé héberge vraisemblablement une faible concentration en cellules viables de MAP	[71]
Lait enrichi (2 mélanges possibles; 4 ou 5 isolats de souches naturelles par mélange)	Combinaisons : 72, 75, 78 °C et intervalles de 15, 20 et 25 secondes	Pasteurisateur industriel mis au point à des fins de recherche	Réduction > 6 log Des cellules viables peuvent subsister	[79]
Lait infecté naturellement	HTST et 72 °C, 15 et 25 secondes	Unité à vocation commerciale	6,9 % des 144 échantillons positifs pour MAP après la pasteurisation	[69]
Lait enrichi (5,0 à 7,7 log) (3 souches naturelles)	Standard 65,5 °C, 16 secondes HTST 71,7 °C, 20 secondes et 74,4 °C, 15 secondes	Écoulement en flux-piston et pasteurisateur de laboratoire	Élimination de 5 à 7,7 log Des cellules viables peuvent subsister	[80]
Lait enrichi (10^3 à 10^6 UFC/ml)	Échelonnement : 67 °C, 15 secondes jusqu'à 135 °C, 5 secondes	Pasteurisateur industriel mis au point à des fins de recherche	Élimination de 5 à 7 log Des cellules viables peuvent subsister	[72]
*La pasteurisation standard consiste en une exposition à 63 °C pendant 30 minutes. **Le procédé HTST consiste en une exposition à 72 °C pendant 15 secondes. ***Dans le cadre de cette étude, l'augmentation de l'efficacité en faisant passer le temps de pasteurisation de 15 à 25 secondes a été démontrée.				

Tableau 1. Résumé des études sur l'inactivation de MAP dans le lait par la pasteurisation

Bien que tous les groupes de recherche aient tenté de reproduire le processus de pasteurisation industrielle aussi fidèlement que possible, les méthodes et l'équipement utilisés variaient grandement, ce qui nuit considérablement à la comparaison des résultats obtenus. Pearce et coll. (2001) [71] se sont efforcés d'imiter la pasteurisation commerciale en reproduisant les conditions susceptibles d'assurer la remontée d'un débit turbulent de lait liquide dans le chambreur tubulaire et ont analysé les données cinétiques à divers points du processus. En conditions de débit turbulent, les couches de lait se mélangent entre elles, ce qui fait en sorte que la vitesse de passage est approximativement la même pour toutes les particules de lait circulant dans le tuyau. La situation diffère lorsqu'un pasteurisateur de laboratoire à plus petite échelle fonctionnant en régime d'écoulement laminaire en raison du diamètre inférieur du tuyau et de

la vitesse de passage moindre du produit est utilisé. En règle générale, les conditions d'écoulement laminaire sont considérées comme le pire des scénarios, car puisque la vitesse de passage des particules de lait dans le tuyau est plus rapide au centre et que celles-ci peuvent remonter jusqu'à deux fois plus rapidement que la particule moyenne, elles influent sur le temps de retenue. La conception d'un système adéquat est d'une importance cruciale pour faire en sorte que le temps de retenue minimal obligatoire du processus de pasteurisation soit atteint en conditions d'écoulement laminaire. La concentration en MAP dans le lait enrichi variait de $0,7 \times 10^3$ à 16×10^3 UFC/ml une fois le lait cru entier chauffé pendant 15 secondes à 72, 69, 66 et 63°C. En matière de résistance à la chaleur des souches utilisées (isolats humains ou bovins), aucune différence importante n'a été observée. Aucune souche exposée à 72°C pendant 15

secondes n'a survécu, et une seule souche présentait des survivants après une exposition de 15 secondes à 69°C. Le temps de réduction décimal moyen extrapolé (valeur D, temps requis pour réduire la concentration en bactéries de 1 log₁₀) à 72°C ou D₇₂ pour les cinq souches de MAP examinées a été de < 2,03 secondes, ce qui représente une réduction de 7 log₁₀ avec un intervalle de confiance de 95%. Des résultats semblables ont été observés par [79] et [80]. L'étude de Stabel et Lambertz (2004) [80] a démontré une réduction de 5,0 - 7,7 log₁₀ de MAP à 71,7 °C pendant 15 secondes en utilisant deux pasteurisateurs, trois souches de terrain bovines différentes et des taux élevés (10⁸) et faibles (10⁵) d'inoculation. Ces résultats ont donné à penser que le lait pasteurisé adéquatement n'hébergera vraisemblablement qu'une faible quantité de MAP.

Plus récemment, Hammer et coll. [72] ont démontré que de faibles concentrations de MAP peuvent être détectées après le traitement thermique du lait écrémé, du lait entier et de la crème. Les échantillons ont été inoculés avec 10³ à 10⁵ UFC/ml à des combinaisons durée-température variant de 15 secondes à 67°C à 5 secondes à 135°C. Une réduction de 5,0 à 7,0 log₁₀ des cellules viables de MAP a été observée. Selon l'analyse statistique, la survie dépendait de la température et du temps de retenue, mais pas de la numération bactérienne initiale. On a avancé que MAP survit le mieux dans le lait entier, puis dans la crème et enfin dans le lait écrémé. L'homogénéisation, que ce soit en amont ou en aval, n'a pas entraîné d'inactivation pendant le traitement thermique. Les résultats obtenus à la suite d'une double pasteurisation se sont révélés identiques. Les effets de l'agglutination et l'état physiologique des cellules ainsi que les mécanismes d'inactivation thermique constituent les facteurs influençant possiblement leur thermorésistance.

Grant et coll. (2002a) [69] ont effectué des essais de pasteurisation en utilisant une unité commerciale (à débit turbulent) afin d'examiner la survie de MAP dans le lait infecté naturellement. Au cours des essais de pasteurisation, 10 (6,7%) des 144 échantillons se sont révélés positifs pour les cellules viables de MAP. Les échantillons maintenus pendant 15 et 25 secondes à 72°C étaient positifs, ce qui indique que le contaminant MAP naturel dans le lait cru peut survivre au processus de pasteurisation d'un pasteurisateur commercial. Les chercheurs ont laissé s'écouler de 24 à 72 h entre le traitement thermique et les diagnostics, ce qui a permis la récupération des cellules ayant subi des atteintes non mortelles. Qui plus est, dans le cadre d'une étude réalisée en 1999-2000 [74], des cellules de MAP ont été détectées dans 1,6% (4/244) du lait cru et dans 1,8% (10/567) des échantillons de lait pasteurisé dans un établissement commercial au R.-U.; les 10 échantillons pasteurisés positifs étaient issus de 8 (3,3%) des 241 laiteries qui y ont

participé. Sept des échantillons de lait positifs par culture ont été soumis à un traitement thermique de 72 à 74°C pendant 15 secondes; les autres ont été soumis au même traitement, mais de 72 à 75°C pendant un temps de retenue prolongé de 25 secondes. De plus, de l'ADN de MAP a été détecté par séparation immunomagnétique-PCR dans 7,8 et 11,8% des échantillons de lait cru et pasteurisé respectivement. La raison du taux de détection de MAP plus élevé dans le lait pasteurisé que dans le lait cru est inconnue. Toutefois, on peut avancer l'hypothèse selon laquelle l'homogénéisateur ou le débit turbulent dans le pasteurisateur a dispersé des amas de MAP, ce qui a entraîné la formation d'autres colonies et a rendu, à partir du même nombre de cellules, l'ADN de MAP plus accessible. La contamination du lait pasteurisé est improbable, car les laiteries dont les échantillons de lait pasteurisé contenant les cellules viables de MAP se sont révélés négatifs pour les coliformes. Cela permet de présumer qu'un temps et une température de pasteurisation adéquats ont été atteints, et qu'une contamination postérieure à la pasteurisation ne s'est pas produite. Un survol de la présence de MAP dans le lait et les produits laitiers analysés figure au tableau 2.

En 2004, la Food Safety Authority of Ireland (FSAI) a communiqué les résultats d'une enquête sur le lait cru en vrac et le lait pasteurisé dans des établissements commerciaux [81]. De l'ADN de MAP a été détecté dans 12,9% (50/389) des échantillons de lait cru et dans 9,8% (35/357) de lait pasteurisé en recourant à la séparation immunomagnétique (SIM)-PCR. MAP cultivable a été détecté dans un seul échantillon de lait cru (0,3 %). Les auteurs ont conclu que puisque aucune MAP n'a été isolée dans le lait pasteurisé dans les établissements commerciaux, leur procédure de pasteurisation (au minimum à 71,1 °C pendant 15 secondes ou toute combinaison équivalente) est jugée efficace.

Toutefois, la comparaison entre les taux de détection de MAP par la PCR et la culture dans le lait cru donne à penser que la méthode de culture est insuffisamment sensible et pose un risque important de produire des résultats faux-négatifs. Millar et coll., qui ont fait état des mêmes résultats (1996) [82], ont réalisé une étude approfondie du lait pasteurisé vendu au détail en Angleterre et au pays de Galles et ont découvert qu'au moyen de la PCR, des résultats positifs pour MAP ont été obtenus dans 7% des échantillons de lait vendu au détail, tandis qu'en Suisse, 19,7% des échantillons de lait cru en réservoirs contenaient de l'ADN de MAP [83].

Lieux	Prévalence détectée par la PCR (%) (détectée par culture)	Matrice	Référence
Canada (Ontario)	15 % (0 %)	Lait pasteurisé en établissement commercial	[85]
États-Unis (Californie, Minnesota et Wisconsin)	2,8 (2,8 %)	Lait pasteurisé en établissement commercial	[75]
Irlande	9,8	Lait pasteurisé en établissement commercial	[81]
	12,9 (0,3 %)	Lait cru	
Angleterre et pays de Galles	7	Lait pasteurisé en établissement commercial	[82]
Royaume-Uni (Angleterre)	11,8 (1,8 %)	Lait pasteurisé en établissement commercial	[74]
	7,8 (1,6 %)	Lait cru	
Suisse	19,7	Lait cru en vrac	[83]
République tchèque	(1,6 %)	Lait pasteurisé en établissement commercial	[73]
Inde	(58 %)	Lait pasteurisé en établissement commercial	[76]
Argentine	(< 3)	Lait pasteurisé en établissement commercial	[84]
République tchèque et Grèce	30,9 (3,6 %)	Féta, fromages à pâte dure, semi-ferme et molle de lait de vache, de brebis et de chèvre	[87]
États-Unis (Minnesota et Wisconsin)	5 (0 %)	Fromage de lait pasteurisé vendu au détail	[88]
Suisse	4,2 (0 %)	Fromage de lait cru	[89]
7 pays de l'Union européenne	49 (0 %)	Préparation en poudre pour nourrissons	[92]

Tableau 2. Données internationales sur la prévalence de MAP dans les produits laitiers vendus au détail

Dans le cadre d'une étude américaine [75], en appliquant deux méthodes de culture et en recourant à la PCR, des cellules viables de MAP ont été détectées dans 2,8% (20/702) des échantillons de lait vendu au détail. Ces échantillons provenaient de supermarchés situés en Californie, dans le Minnesota et au Wisconsin. Des résultats semblables ont été obtenus en République tchèque [73] en recourant à une méthode de culture. Des cellules viables de MAP y ont été détectées dans 1,6% (4/244) des échantillons de lait pasteurisé (71,7°C pendant 15 secondes) recueillis dans les supermarchés et d'autres magasins. Les auteurs en ont aussi détecté dans 2% (2/100) des échantillons de lait pasteurisé (71,7°C pendant 15 secondes) issus de troupeaux dont l'infection par MAP était connue, mais ils n'en ont détecté aucune (0% [0/100]) dans le lait issu d'un troupeau désigné comme exempt de la MJ. De plus, en Argentine, des chercheurs ont isolé des cellules viables de MAP dans 2,9% (2/70) des échantillons de lait vendu dans des établissements commerciaux, dont dans un échantillon de lait pasteurisé et dans un autre ultrapasteurisé (138°C pendant 30 secondes) [84]. Pour les deux échantillons qui se sont révélés positifs à la culture, le même résultat a été obtenu pour la détection d'IS900 par la PCR. En Inde, des cellules viables de MAP ont été détectées dans 72% (13/18) des

échantillons de lait pasteurisé vendu au détail analysés [76]. En ce qui a trait aux produits laitiers pasteurisés offerts sur le marché, les auteurs ont détecté des cellules viables de MAP dans 56% (5/9) des échantillons.

Les chercheurs de l'Université de Guelph ont fait état d'une enquête sur la présence de MAP dans le lait pasteurisé obtenu dans des établissements de détail et des usines laitières dans le sud-ouest de l'Ontario [85]. Des 710 échantillons de lait analysés, 110 (15%) se sont révélés positifs au moyen de la PCR par amorces incluses spécifiques d'IS900. Chaque échantillon a été analysé trois fois, et les résultats obtenus sont décrits ci-dessous, exprimés en nombre de réactions positives aux trois tests: 73 x 1/3; 32 x 2/3; 5 x 3/3. Aucune cellule viable de MAP n'a été isolée de la culture en milieu liquide ni de la culture sur agar de 44 échantillons de lait vendu au détail dont les résultats se sont révélés positifs ni dans 200 des échantillons dont les résultats se sont révélés négatifs par la méthode de PCR. Les auteurs ont évoqué plusieurs raisons possibles de l'échec de la détection de MAP, par exemple la sensibilité insuffisante de la méthode utilisée, la contamination ou la présence d'un petit nombre d'organismes viables qui n'ont pas été détectés au moyen de la culture. Également, une étude des combinaisons

durée-température utilisées pour la pasteurisation du lait liquide au Canada a démontré que toutes les températures appliquées étaient supérieures à 72°C (de 72,9 à 83,5°C) [85]. Toutefois, 41% (13/32) des installations appliquaient un temps de retenue de moins de 25 secondes et 9% (3/32), un temps de retenue inférieur à 20 secondes. À l'exception d'un établissement où la combinaison durée-température appliquée était de 72,9°C pendant 19 secondes, tous les établissements canadiens pratiquant un temps de retenue de moins de 25 secondes appliquaient une température élevée ($\geq 73^\circ\text{C}$).

En conclusion, selon l'examen des documents publiés en anglais de 1980 à 2010, la question de l'efficacité de la pasteurisation en matière d'éradication de MAP demeure nébuleuse. Les données combinées permettent de présumer que les pratiques de pasteurisation en vigueur sont aptes à éliminer la concentration de MAP susceptible d'être présente dans l'approvisionnement commercial en lait. Cependant, la présence de cellules viables de MAP dans les échantillons de lait pasteurisé vendu au détail évoquée dans de multiples études révèle que les pratiques actuelles peuvent permettre, bien que rarement, la survie ou la réintroduction de MAP. Seule l'étude réalisée en Inde [76] a signalé un degré élevé de survie de MAP dans le lait pasteurisé. On doit tenir compte du fait que l'Inde est un pays en voie de développement où le contrôle de la santé publique sur l'industrie laitière est moins efficace que celui appliqué dans les pays développés. Cerf et coll. (2007) [86] ont évalué la probabilité de détecter MAP dans des échantillons de lait pasteurisé de 50 ml à moins de 1% en recourant à un modèle quantitatif et à la simulation de Monte-Carlo. Par conséquent, nous concluons que la présence de cellules viables de MAP dans le lait pasteurisé ne se manifeste que rarement, et qu'au Canada, où l'exposition à MAP par le lait pasteurisé peut survenir, mais en faibles concentrations.

Fromage et autres produits laitiers

Jusqu'à présent, la Grèce, la République tchèque, les États-Unis et la Suisse [87]; [88]; [89] ont signalé la tenue d'enquêtes visant à détecter la présence de MAP dans les fromages vendus au détail. À notre connaissance, de telles enquêtes n'ont jamais eu lieu au Canada. Pour assurer la salubrité microbiologique des fromages produits au Canada, trois options y sont offertes : les fromages peuvent y être préparés à partir de i) lait pasteurisé, ii) thermisé ou iii) cru; s'il est produit à partir de lait thermisé ou cru, le fromage doit être conservé à 2°C ou plus pendant 60 jours ou plus à partir de la date à laquelle son processus de fabrication a commencé. Cependant, si MAP est présent dans le lait, ces conditions peuvent se révéler insuffisantes pour l'inactiver.

Sung et Collins (2000) [90] ont étudié l'effet du pH, du sel (pH 6,0, 2% [pds/vol] NaCl) et de la chaleur sur la viabilité de MAP dans le fromage blanc à pâte molle de type hispanique. Selon les résultats, le sel a peu ou aucun effet sur le taux d'inactivation de MAP; une valeur D à la baisse a été associée avec le pH à la baisse, et les cellules de MAP soumises au traitement thermique ont connu une inactivation plus rapide que celles qui ne l'ont pas subi. Dans l'ensemble, la période de maturation de 60 jours a produit une réduction de 2 log par gramme de fromage du nombre des cellules de MAP soumises au traitement thermique (concentration initiale en MAP de 10^6 UFC/ml de lait), ce qui donne à penser que le traitement thermique et la période de maturation obligatoire de 60 jours sont vraisemblablement des éléments importants pour la réduction de l'organisme dans ce produit. En raison de la popularité des fromages de lait cru au Canada, cette question pourrait justifier davantage de recherches et de délibérations.

Donaghy et coll. (2004) [91] ont préparé des cheddars à partir de lait pasteurisé contaminé artificiellement par des inoculats élevés (10^4 - 10^5 UFC/ml) et faibles (10^1 - 10^2 UFC/ml) de trois souches de MAP, soit une souche de référence (NCTC 8578) et deux souches (806PSS et 796PSS) précédemment isolées à partir de lait pasteurisé. Les valeurs D se sont révélées variables selon la souche de MAP. Les valeurs D pour les 806PSS, 796PSS et NCTC 8578 étaient de 107, de 96 de 90 jours respectivement. Seule la souche 806PSS s'est révélée cultivable à partir de fromage de 27 semaines enrichi à l'inoculat de faibles concentrations.

Ikonomopoulos et coll. (2005) [87] se sont penchés sur la présence de MAP dans les fromages vendus au détail (fêta, à pâte dure, demi-ferme et molle) fabriqués à partir de lait de vache, de brebis et de chèvre en Grèce et en République tchèque. Des cellules viables de MAP ont été isolées à partir de 3 des 84 (3,6%) échantillons de fromage tandis que de l'ADN de MAP a été détecté par la PCR dans 26 des 84 (30,9%) échantillons. Deux marques de fêta préparé à partir d'un mélange de lait de brebis et de chèvre comptaient pour la plus grande partie des échantillons positifs pour MAP (10 et 14,3%). Les résultats indiquent que les fromages vendus au détail pourraient constituer une voie d'exposition à MAP importante chez les humains. Une étude semblable, menée au Wisconsin et au Minnesota [88], a signalé la présence d'ADN de MAP dans 5% des échantillons de fromage fabriqué à partir de lait pasteurisé vendu au détail. Aucune cellule viable de MAP n'a été isolée dans le cadre de cette étude, ce qui permet de présumer que le processus de pasteurisation est efficace ou que la méthode de culture est insuffisamment sensible. La procédure de décontamination était beaucoup plus rigoureuse et le temps d'incubation plus court que ceux appliqués dans le

cadre de l'étude d'Ikonomopoulos et coll. (2005) [87]. Les chercheurs se sont aussi interrogés sur l'aptitude de MAP inactivée par traitement thermique à provoquer une réponse immune et ainsi, à jouer un rôle dans l'étiologie de la MC. Plus récemment, des chercheurs suisses [89] ont signalé la présence de MAP dans les fromages suisses fabriqués de lait cru vendus au détail. Bien que l'étude n'ait porté que sur 143 échantillons de fromage, 6 (4,2%) de ceux-ci contenaient de l'ADN de MAP (séquence F57). Aucune cellule viable de MAP n'a été isolée dans les échantillons de fromage analysés dans le cadre de cette étude.

De l'ADN de MAP a été détecté dans des préparations en poudre pour nourrissons de 10 producteurs actifs dans 7 pays de l'Union européenne [92]. Parmi les 51 échantillons analysés, 25 (49%) se sont révélés positifs pour la détection de IS900 par la PCR, mais aucune cellule viable de MAP n'a été détectée. À notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur la présence de MAP dans les produits laitiers tels que le yogourt, le beurre et la crème. Toutefois, si l'on tient compte du fait que l'organisme a été détecté dans le lait pasteurisé dans certains pays, il est possible qu'il se trouve dans d'autres produits laitiers.

Estimation de l'exposition à MAP dans le lait pasteurisé

Les estimations de l'exposition sont déterminées sur la base de la prévalence de l'infection par MAP chez les bovins, du taux d'excrétion chez les animaux infectés, du degré de contamination du lait et des effets de dilution, de l'efficacité de la pasteurisation, de la survie de l'organisme dans le lait et de la quantité de lait consommée.

Nauta et Van der Giessen (1998) [93] ont adopté une démarche de modélisation afin d'estimer l'exposition humaine à MAP par le lait pasteurisé. En se penchant sur une exploitation agricole où la prévalence de la MJ était élevée, la concentration de MAP a été estimée à $5,4 \times 10^{-3}$ UFC/ml de lait pasteurisé. Théoriquement, la grande part de la contamination était attribuable à des animaux cliniquement atteints, et minimalement, à des vaches atteintes d'une infection inapparente. Les auteurs ont déduit que le retrait des bovins atteints d'une infection clinique de la chaîne de production réduirait l'estimation de l'exposition d'environ 99%, et qu'elle passerait de $5,4 \times 10^{-3}$ UFC/ml à $0,06 \times 10^{-3}$ UFC/ml. Cependant, la démarche appliquée dans cet exemple était fondée sur des données limitées et une estimation approximative. Sweeney et coll. (1992) [44] ont signalé de 4×10^{-2} UFC/ml à 16×10^{-2} UFC/ml de lait de vaches asymptomatiques infectées par MAP tandis que les estimations donnent à penser qu'en raison de la contamination fécale du lait, l'exposition pourrait atteindre 10^4 UFC/ml [65]. Les auteurs de l'étude de modélisation ont mentionné l'absence de données adéquates publiées sur la concentration en MAP du lait cru et ils ont soulevé que les

protocoles de pasteurisation utilisés dans les expériences varient grandement dans leur méthode, ce qui rend la comparaison difficile. Les démarches de modélisation demeureront inutiles tant et aussi longtemps que de telles données ne seront pas publiées.

Les données sur la consommation de lait au Canada sont très limitées. Statistique Canada a établi que la consommation moyenne de lait par les Canadiens en 2004 atteignait 85,5 litres par personne par an, ce qui est comparable à la quantité observée en Nouvelle-Zélande (96,7 litres/personne), au sein de l'Union européenne (78,4 kg/par personne) et au Royaume-Uni (112,4 kg/par personne) [94]; [95].

Viandes et produits de viande

Vu la prévalence élevée de MAP chez les bovins destinés à l'abattage pour la consommation humaine, en détourner tous les bovins positifs serait très coûteux. Dans le tractus intestinal des animaux infectés, la présence de MAP serait très importante. Par conséquent, vu le manque de preuve des risques posés par MAP pour les humains, les bovins positifs selon la coproculture ne sont pas détournés. Ainsi, la contamination de la viande crue par des fèces contenant MAP pourrait survenir, et cette situation peut être considérée comme une source d'exposition humaine potentielle à l'organisme.

Dans le cadre d'une étude canadienne récente, on a fait état d'une contamination occasionnelle des carcasses de bœuf par MAP [96]. Les tissus lymphatiques des bovins atteints de la MJ à un stade plus avancé, lesquels font habituellement partie des parures utilisées pour la production de bœuf haché, sont lourdement contaminés [97]; [98]. Puisque le bœuf haché (hamburgers) n'est pas toujours bien cuit, il est possible que MAP survive après la cuisson. Une étude a fait état de la résistance de l'organisme au processus de cuisson standard des hamburgers [99]. Les auteurs ont conclu qu'un faible nombre de cellules de MAP peuvent survivre à la cuisson à point de la viande (63°C). Toutefois, les chercheurs ont établi que la probabilité de survie de MAP dans une viande bien cuite est faible (75°C). Peu d'études ont porté sur l'inactivation de MAP dans le boeuf. À notre connaissance, deux études ont calculé les valeurs D et z pour MAP dans la viande [100]; [101]. La valeur z est le nombre de degrés de température requis pour réduire la valeur D d'un cycle logarithmique (1 log₁₀). À partir d'un homogénat liquide de muscles squelettiques d'agneau, les auteurs ont calculé les valeurs D₆₀ de 8 à 11 minutes, D₆₅ de 26 à 35 secondes et D₇₀ de 1,5 à 1,8 seconde. Les valeurs z pour les souches S et C ont été établies à 4,21°C et à 4,51°C, respectivement. Une réduction d'au moins 5 logs dans les dénombrements de cellules viables de MAP a exigé l'exposition à 70°C pendant 15 à 20 secondes ou à 75°C pendant moins de 5 secondes (souche C), pendant

10 à 15 secondes à 70°C ou moins et pendant 5 secondes à 75°C (souche S). De plus, Saucier et Plamondon (2011) [101] ont signalé que dans le bœuf haché, les valeurs D_{70} pour les deux souches étaient de 12 ± 1 et de $13,1 \pm 0,3$. Les valeurs z s'échelonnaient de $5,6 \pm 0,1$ °C à $5,7 \pm 0,1$ °C. D'autres auteurs [102] ont établi qu'une réduction de 12D de *M. avium* a été observée à la suite de la cuisson de saucisses de Francfort pendant 2 minutes à 70°C.

Bien que l'infection par MAP soit fréquemment circonscrite à l'intestin et aux ganglions mésentériques associés, aux stades avancés de la maladie, l'organisme peut se propager à l'échelle du corps des animaux infectés [103]. Chez les bovins, MAP a été isolé dans le foie, les reins, la rate, les poumons, le cœur, les bouts de côtes, le muscle paré des côtes, le filet, les jarrets, les organes reproducteurs, le sperme, le lait et les ganglions associés aux muscles et aux organes autres que l'intestin [97]; [98]; [104]; [105]. Dans le cadre d'une étude dirigée par Rossiter et Henning (2001) [97], la présence de MAP chez les vaches laitières et les vaches de boucherie a été examinée dans trois abattoirs américains. Selon la coproculture et la culture des ganglions iléo-cœcaux, 34,4% des vaches laitières et 2,6% des vaches de boucherie étaient infectées par MAP tandis

que le foie et les autres ganglions étaient infectés chez 7,9% des vaches laitières et chez 0,3% des vaches de boucherie.

Par conséquent, les résultats indiquent que chez les bovins systématiquement infectés, MAP peut être détecté dans les ganglions, lesquels peuvent être incorporés aux produits de bœuf haché. De l'ADN de MAP a été détecté chez 19,8% des vaches laitières saines abattues en Suisse [106]. Au total, 8,9% (9 sur 101) des vaches se sont révélées positives pour l'ADN de MAP dans les échantillons fécaux, 4,9% (5 sur 101) dans les ganglions jujénaux, 0,9% (1 sur 101) dans les tissus de l'iléon, 2,9% (3 sur 101) dans les muscles diaphragmatiques et 3,6% (3 sur 84) dans le lait. De la même façon, des cellules viables de MAP ont été détectées dans le muscle du diaphragme chez 13% (6 sur 47) des bovins atteints tant d'une infection clinique qu'inapparente [107]. Également, une charge bactérienne importante a été observée dans les ganglions mésentériques, la valve iléo-caecale, l'iléon et le jéjunum des animaux infectés. Brady et coll. (2008) [108] ont constaté que MAP était largement disséminée dans les tissus de 17 des 21 vaches examinées, y compris 3 animaux normaux sur le plan clinique. MAP a aussi été décelée dans les tissus mammaires de 7 des vaches, y compris chez deux animaux sains du point de vue clinique.

Matrice	Lieux	Prévalence détectée par la PCR (détectée par culture)	Matrice (détaillée)	Référence
Vaches laitières	Suisse	19,8 %	Variable selon les tissus analysés : fèces (8,9 %), GL jéjunaux (4,9 %), iléon (0,9 %), muscle du diaphragme (2,9 %)	[106]
	États-Unis	34,4 %	Fèces et ganglion lymphatique iléocœcal	[97]
	États-Unis	7,9 %	Foie et autres ganglions lymphatiques	[107]
	Espagne	13 % *	Muscle du diaphragme	[107]
	Canada (Manitoba)	4,5 %	Sang	[68]
Bovins	États-Unis	2,5 %	Fèces et ganglion lymphatique iléocœcal	[97]
	États-Unis	0,3 %	Foie et autres ganglions lymphatiques	[107]
	Espagne	13 % *	Muscle du diaphragme	[107]
	Canada (Manitoba)	1,7 %	Sang	[68]
Bœuf haché	États-Unis (Californie)	0 % (0 %)	Bœuf haché vendu au détail	[109]
	Canada	0 %	Bœuf haché vendu au détail	[110]

*Dans le cadre de cette étude, les vaches ont été catégorisées par leur propriétaire comme montrant des signes cliniques correspondant à ceux de la paratuberculose si les animaux avaient été ou étaient atteints de diarrhée persistante, perdaient du poids, étaient positifs pour la paratuberculose selon un test ELISA et (ou) par la PCR des fèces et (ou) si leur production laitière avait diminuée.

Tableau 3 : La prévalence de MAP dans les produits de bœuf et le bœuf analysés

À notre connaissance seules deux enquêtes ont été réalisées sur la présence de MAP dans le bœuf haché vendu au détail [109]; [110]. La première étude a porté sur 200 échantillons de bœuf haché provenant d'établissements de vente au détail de la Californie aux États-Unis. En recourant à la PCR multiplexe en temps réel et à la culture traditionnelle, les échantillons se sont tous révélés négatifs pour MAP. De plus, dans un laboratoire gouvernemental de la Colombie-Britannique au Canada tous les résultats d'une analyse de plusieurs centaines d'échantillons de bœuf haché provenant d'établissements de vente au détail canadiens se sont révélés négatifs [110]. Le tableau 3 fait état de la prévalence de MAP dans les échantillons de bœuf et de produits de bœuf analysés.

En conclusion, les études actuelles démontrent que dans les viandes et les produits de viandes, la présence de MAP est possible en faibles concentrations. Puisque la viande consommée n'est pas toujours bien cuite, l'organisme pourrait être présent au moment de sa consommation. Toutefois, les résultats permettent de présumer que les méthodes de cuisson traditionnelles devraient suffire pour inactiver MAP en faibles concentrations.

Eau, fruits et légumes et environnement

L'eau constitue une voie de transmission éventuelle de MAP aux bovins, des bovins et d'autres ruminants aux humains ainsi que des humains aux humains.

Si l'eau constitue un vecteur de la présence de MAP dans les sources d'eau traitées en vue de la consommation humaine, l'incidence des eaux de ruissellement des champs contaminés est vraisemblablement importante.

La survie de MAP pendant de longues périodes dans l'environnement [111]; [112]; [113] et sa présence dans les fèces des bovins (les bovins atteints de MJ aiguë peuvent excréter quotidiennement 5×10^{12} UFC de l'organisme) [103] donnent à penser que les eaux souterraines et de surface pourraient constituer un bassin potentiel d'infection par MAP. Jusqu'à présent, les études ont démontré une présence variable de l'organisme dans l'eau potable [114]; [56] ainsi que dans l'eau non traitée entrant dans les installations de traitement des eaux [111]. D'autres études ont montré la capacité de MAP à infecter les protozoaires et à y survivre tout comme aux méthodes traditionnelles de traitement des eaux [115]; [116]. Certaines études ont révélé que l'organisme demeure viable pendant au moins 163 jours dans l'eau de rivière et au moins 270 jours dans l'eau stagnante [1]. Pickup et coll. (2005) [117] ont aussi démontré au moyen de la culture que la souche bovine de MAP demeure détectable pendant au

moins 632 jours dans les lacs modèles étudiés et pendant au moins 841 jours au moyen de la PCR en temps réel.

MAP et les autres mycobactéries du complexe *M. avium*, lesquelles sont abondamment disséminées dans l'environnement, ont été cultivées à partir de sources d'eau potable, et leur capacité d'infecter (mycobactériose) des hôtes immunodéprimés [118]; [119] a été démontrée. D'autres mycobactéries environnementales ont aussi été détectées dans les réseaux de distribution d'eau [120]. Dans le seul cas notoire de détection de MAP dans l'eau potable [114], la *Mycobacterium* (initialement appelée *M. avium*), isolée dans l'approvisionnement en eau d'un important centre urbain aux États-Unis était, de fait, MAP. Plus récemment, MAP a été détectée dans un pourcentage élevé d'échantillons (81 et 88%) au cours d'une étude réalisée dans le Midwest américain, mais un pourcentage plus faible a été observé dans une enquête nationale postérieure [56]. Le potentiel de variation temporelle et spatiale dans la présence de MAP dans l'eau potable soulève des questions intéressantes dans la perspective du potentiel d'exposition. De toute évidence, cette question doit être approfondie. Lorsque *M. avium* est détectée dans l'eau potable, il est rare que le type soit déterminé afin d'établir s'il peut s'agir de MAP. Le Public Health Laboratory Service du Royaume-Uni n'a pas détecté de cellules viables de MAP dans les échantillons d'eau potable traitée et non traitée [16]. Cependant, une enquête sur l'eau de surface non traitée alimentant 9 centres de traitement des eaux en Irlande du Nord a montré que parmi les 192 échantillons d'un litre d'eau analysés, 9 se sont révélés positifs par la SIM-PCR et 8 par la culture pour la détection de MAP. Dans le cadre d'une étude récente [121], des cellules viables de MAP ont été détectées dans l'eau traitée pour la production d'eau potable. Ces observations indiquent que MAP peut survivre dans l'environnement de telle sorte que l'eau recevant l'écoulement de surface agricole puisse constituer une voie d'exposition humaine. Puisque des preuves donnent à penser que MAP peut survivre à la désinfection au chlore [122], la possibilité de l'exposition humaine à l'organisme par la consommation d'eau est réelle. Cette possibilité peut aussi avoir des incidences sur les personnes qui, au cours d'activités récréatives, sont en contact avec de l'eau contaminée (écoulement de surface agricole).

Récemment, la Food Standards Agency du Royaume-Uni a entrepris une étude cas-témoin sans pouvoir établir de lien entre la consommation d'eau et de produits laitiers potentiellement contaminés par MAP et l'apparition postérieure de MC [123]; [124]. Toutefois, dans la même étude, un lien a été établi entre la

consommation de lait pasteurisé et de fruits et la diminution du risque de maladie, tandis que l'apport en viande a été mis en cause dans un risque accru d'être atteint de la MC.

Plusieurs mycobactéries environnementales opportunistes se sont révélées relativement résistantes aux concentrations en chlore ou en chloramine utilisées pour le traitement des eaux municipales [125]. La plupart des souches de *M. avium* soumises aux essais se sont montrées très résistantes au chlore, à la chloramine, au dioxyde de chlore et à l'ozone [125]. On a aussi souligné que les cellules de souches à croissance lente résistaient mieux au chlore que les cellules à croissance rapide et que les cellules cultivées dans l'eau étaient 10 fois plus résistantes que les cellules cultivées dans le milieu. Les valeurs de la durée du contact requise afin que le chlore produise des effets sur MAP ont été estimées de 580 à 2 300 fois supérieures à celles établies pour *E. coli* [126]. À ce jour, l'efficacité des installations de traitement des eaux pour l'élimination ou l'inactivation de MAP dans l'eau destinée à la consommation humaine n'a pas été étudiée exhaustivement. Une seule étude au sujet des effets du chlore sur MAP a été recensée [122]. Avec une concentration de l'inoculum qui atteignait environ 10⁶ UFC/ml, en contact avec 2,0 µg de chlore/ml pendant 30 minutes, l'inactivation complète de MAP ne s'est pas produite. Cette concentration équivaut à 2 ppm ou à 2 mg/l; malgré le désinfectant initial (chloramine, chlore, ozone, etc.), les gestionnaires d'un système de traitement des eaux en Ontario doivent maintenir une concentration de chlore résiduel de 0,2 ppm (*Technical Support Document for Ontario Drinking Water Standards – Objectives and Guidelines* (en anglais seulement); au Canada, les provinces sont soumises à des normes particulières). Si MAP supporte le traitement, l'organisme peut demeurer viable dans le biofilm des systèmes de distribution d'eau.

Plusieurs rapports de recherche ont aussi porté sur les mycobactéries environnementales survivant dans les amibes. L'hôte protozoaire peut protéger les bacilles de MAP des conditions environnementales défavorables et par ricochet, prolonger sa survie dans eaux des lacs et des rivières [115]; [116]. On a démontré que *M. avium* prolifère de manière saprozoïque (en d'autres mots, qu'elle vit dans des matières organiques en décomposition; en désignant certains protozoaires) sur les produits sécrétés par l'amibe *Acanthamoeba polyphaga* et survit à l'intérieur des parois extérieures des kystes à double paroi d'*A. polyphaga*; mais la question de savoir si sa prolifération dans les kystes a eu lieu n'a pas été tranchée [115]. La facilité de prolifération de *M. avium*, de *M. fortuitum* et de *M. marinum* dans l'amibe a été démontrée [116]. Bull et coll. (2002) [127] ont indiqué que

MAP peut survivre jusqu'à un an dans *A. polyphaga*; mais la question de sa prolifération n'a pas été tranchée. Ils se sont aussi penchés sur l'expression génétique de MAP dans *A. polyphaga* en recourant à l'analyse par microréseau et ont identifié l'expression spécifique à localisation intracellulaire de MAP, laquelle pourrait se révéler importante dans la pathogenèse de MAP. Une publication récente sur la répllication et la persistance à long terme des souches de MAP humaines et bovines dans *A. polyphaga*, a montré la capacité de MAP à survivre et à se répliquer dans *A. polyphaga* pendant une période pouvant atteindre 24 semaines [63]. Ils ont aussi découvert que des isolats de MAP, obtenus directement de tissus intestinaux humains infectés, ont survécu pendant près de quatre ans dans des cultures d'amibes. À la fin de l'étude, les organismes étaient toujours intacts. Par conséquent, aucune limite de persistance n'a été établie à leur endroit.

En conclusion, MAP peut survivre pendant de longues périodes dans les réseaux d'alimentation en eau, et sa survie à la chloration a été démontrée. Alors que plus de preuves sur la survie de MAP dans l'eau seront accessibles, l'efficacité du traitement des eaux et des ressources utilisées pour la consommation domestique d'eau devra être réévaluée. Ainsi, les recherches devront se poursuivre afin de déterminer la capacité de survie de l'organisme au cours du processus du traitement des eaux et de sa présence dans l'eau destinée à l'approvisionnement domestique. À notre connaissance, il n'existe actuellement aucune donnée sur la présence de MAP dans les eaux canadiennes ni d'études sur MAP dans l'approvisionnement en eau des municipalités.

D'autres sources potentielles d'exposition humaine à MAP sont les aérosols, l'environnement et les fruits et légumes contaminés. Des mycobactéries sont détectées dans des aérosols, des piscines intérieures et des cuves thermales [128]; [129]. L'exposition à MAP par les aérosols a été mise en cause dans le cadre d'une étude sur la présence de MAP dans les eaux de la rivière Taff qui coule dans le sud du pays de Galles et de sa relation avec les grappes de cas de MC dans la ville de Cardiff [117]. La rivière serpente entre des pâturages vallonnés où broute du bétail chez lequel la maladie de Johne est endémique. Des 96 échantillons quotidiens analysés, 31 (32,3%) se sont révélés positifs par la PCR et 12 de ceux-ci (66%) ont produit des souches bovines de MAP après de 8 à 11 mois d'incubation. Une recherche épidémiologique menée dans la ville de Cardiff a montré une augmentation importante de MC dans la plupart des secteurs longeant la rivière Taff [117]. Les chercheurs [117] ont pensé qu'une fois que la pluie fait pénétrer MAP dans les eaux souterraines et les rivières, la rivière contaminée traverse la ville où des aérosols

des eaux de surface exposent les résidents à inhaler MAP, soit à un risque bien caractérisé pour d'autres mycobactéries environnementales [128]. On a fait état de l'atteinte pulmonaire en présence de MC [130], et récemment, certains ont avancé qu'il s'agit d'une voie potentielle d'infection des bovins par MAP [131]. Toutefois, compte tenu du tropisme tissulaire de MAP, l'entérite chronique est le premier signe clinique à se manifester éventuellement [132].

La persistance de MAP dans les systèmes de traitement du fumier des cheptels laitiers (compostage thermophile à 55°C, compostage à basse température à 25°C et stockage dans les réservoirs à fumier liquide à la température ambiante) a été étudiée récemment [133]. Les composts sont fréquemment utilisés sur le marché du jardinage résidentiel et de la culture biologique (pour la production de légumes) et sont appliqués sur des terres agricoles comme fertilisant; par conséquent, ils peuvent devenir une source potentielle d'exposition humaine à MAP. L'étude a montré qu'après l'inoculation initiale de 10⁶ UFC/g, les cellules de MAP étaient viables au jour 0 dans tous les traitements et par la suite, qu'elles ne demeuraient cultivables jusqu'au jour 56 que dans le traitement du stockage liquide. De l'ADN de MAP était détectable par la PCR jusqu'au jour 56 dans tous les traitements et jusqu'à 175 jours dans les traitements de stockage liquide. Dans l'ensemble, les résultats indiquent que MAP peut persister pendant plus de 2 mois à des niveaux non cultivables (détectable par la PCR), peu importe si le fumier est composté à 55 °C, à 25°C ou s'il est stocké sous forme liquide en conditions anaérobies. Pavlik et coll. (2002) [134] ont indiqué que MAP peut survivre pendant un an dans le fumier, qu'elle peut être détectée dans les larves et par la suite, chez les mouches qui se nourrissent de fumier contaminé et qu'elle peut être excrétée par les invertébrés vivant dans le fumier ou les sols contaminés par MAP. Récemment, une recherche sur la persistance à long terme de MAP dans les eaux et les sédiments des fosses des exploitations agricoles a donné à penser que l'environnement pose un risque plus grand que le pâturage et le sol en matière de persistance à long terme de l'organisme [112]. MAP a survécu jusqu'à 48 semaines dans l'eau et les sédiments des fosses ombragées et 36 semaines dans les fosses partiellement exposées aux rayons UV. Sa survie dans le sol et les fèces en milieu terrestre ombragé n'a pas excédé 12 semaines. De façon semblable, on a observé qu'un sol chaud (30°C) et sec constitue le facteur le plus important dans la réduction de la quantité de MAP dans le sol [135]. Dans les conditions cycliques de sécheresse et d'humidité fréquentes au Canada, une récupération moyenne de MAP a été observée; l'exposition aux rayons UV (sauf l'effet de réchauffement du sol) n'a pas eu d'effets

observables sur la survie de MAP. La preuve actuelle donne à penser que dans le cadre de l'évaluation des sources de MAP à l'échelle canadienne, à la prévalence actuelle dans les cheptels laitiers au Canada, la contamination environnementale doit aussi être prise en compte.

Un bassin à boues d'épuration a été mis en cause comme source d'infection pulmonaire épidémique par *Mycobacterium xenopi* à Pécs, en Hongrie [136]. Tous les patients et les personnes asymptomatiques positifs pour *M. xenopi* vivaient à proximité d'un bassin à boues d'épuration ou avaient été exposés à la boue par l'épandage de fumier comme fertilisant dans les parcs et les jardins résidentiels environnants. En ce qui concerne les personnes vivant à proximité des bassins de boue, l'exposition à la poussière pendant l'été alors que le bassin est complètement asséché a été mise en cause, ce qui se révèle cohérent avec la capacité de *M. xenopi* de proliférer à une température avoisinant les 42°C [137]. *M. xenopi* a été isolé dans l'affluent d'eaux d'égout, de même qu'en divers endroits et profondeurs du bassin de boues, lequel s'assèche chaque été. Bien que le traitement des eaux usées n'ait pas été abordé dans ce document, on y a soulevé que, par mesure de précaution sanitaire, ces eaux usées devraient être exposées à la chaleur avant d'être utilisées comme fertilisants. Au Royaume-Uni, pour le traitement de l'eau extraite des eaux superficielles destinée à la consommation humaine, on recourt fréquemment à la filtration à contre-courant combinée à la flottation à air dissous à contre-courant (COCODAFF) pour éliminer les solides en suspension [138]. Le produit ainsi extrait est une boue brune déversée dans des fosses à lisier dans lesquelles elle s'assèche. Comme dans l'exemple de Pécs en Hongrie présenté ci-dessus, la matière s'est révélée fortement positive pour MAP. L'épandage fréquent de cette matière sur les terres agricoles est à la source d'un cycle de contamination environnementale. La question de l'utilisation de déchets agricoles et humains comme fertilisants devrait être approfondie, car il pourrait s'agir d'une source potentielle de MAP, particulièrement s'ils ne sont pas traités adéquatement.

L'épandage de lisier infecté par MAP comme fertilisant dans les jardins ou sur les terres agricoles fait en sorte que les fruits et les légumes peuvent constituer une autre source potentielle d'exposition humaine à MAP. Pavlik et coll. (2002) [134] ont détecté MAP dans les tiges, les feuilles, les fruits et les légumes (tomates, radis, laitues) cultivés dans une terre contaminée artificiellement en raison de la présence de MAP dans le fumier. À ce jour, aucune autre étude n'a traité de la contamination par MAP des fruits et des légumes. Toutefois, si l'on tient compte de la persistance de l'organisme à long terme dans l'environnement, de sa

survie aux traitements du fumier et de l'utilisation généralisée de celui-ci comme fertilisant, d'autres études doivent être consacrées à la détermination des risques d'exposition humaine à MAP par la contamination des fruits et légumes.

Puisque MAP contamine les eaux, les poissons, les mollusques et les crustacés constituent des sources d'exposition potentielles à l'organisme. Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a été publiée au sujet de la présence de MAP dans ceux-ci.

4. Conclusion

MAP est probablement présente dans le lait cru et les autres produits laitiers au Canada, de même qu'en faible concentration dans les produits de bœuf et le bœuf haché crus. Cependant, aucune détection de MAP dans des produits laitiers ou des produits de bœuf n'a encore été signalée au Canada. Compte tenu des observations selon lesquelles l'organisme peut parfois survivre à la pasteurisation industrielle du lait et que les pratiques de cuisson courante peuvent se révéler insuffisantes pour éliminer MAP du bœuf, du mouton, de la chèvre et des ruminants sauvages, pour les Canadiens, un risque d'exposition à MAP par ces aliments subsiste. D'autres vecteurs tels que les légumes et les fruits, l'eau et l'environnement avoisinant les exploitations agricoles hébergeant du bétail positif pour MAP peuvent aussi être en cause dans la transmission de l'organisme. Plus d'études doivent être réalisées sur la prévalence de MAP dans l'environnement, les aliments et l'approvisionnement en eau canadiens. Par conséquent, nous concluons qu'actuellement, en matière de santé publique, l'importance de MAP demeure inconnue.

5. Autres recherches

Dans l'optique de la maîtrise de MAP dans l'approvisionnement alimentaire (exploitation agricole, transformation, consommateurs), les besoins suivants ont été déterminés :

Chaque lacune de recherche et de données a été classée selon importance : faible, moyenne ou haute.

Importance haute (H)

Importance moyenne (M)

Importance faible (F)

1) Prévalence des cellules viables de MAP dans l'approvisionnement alimentaire :

i) Prévalence de MAP dans la viande

- Prévalence des cellules viables de MAP dans le bœuf haché et dans des pièces sélectionnées (H)
- Prévalence de MAP sur les carcasses (H)

- Prévalence de cellules viables de MAP de l'exploitation agricole jusqu'à l'établissement de vente au détail chez tous les animaux et les produits d'origine animale (enquête nationale canadienne) (F)

ii) Prévalence de MAP dans les produits laitiers

- Prévalence de MAP dans les produits laitiers en poudre (p. ex., préparations en poudre pour nourrissons) (H)
- Prévalence de MAP dans les produits laitiers au Canada (enquête nationale) (H)

iii) Prévalence de MAP dans l'eau et les fruits et légumes

- Prévalence de MAP dans les fruits et légumes (H)
- Prévalence de MAP dans l'eau d'irrigation (H)
- Prévalence de MAP dans l'eau de lavage des fruits et légumes (H)
- Prévalence des cellules viables de MAP dans l'eau potable au Canada (enquête nationale) (H)

2) Prévalence de MAP dans l'environnement :

- Prévalence et survie de MAP dans des échantillons environnementaux (H)
- Prévalence des cellules viables de MAP dans les cours d'eau canadiens (F)

3) Les voies de contamination du bœuf :

- Mesure dans laquelle la contamination contribue au degré de concentration en MAP du bœuf (haché) (H)
- Contamination par MAP du bœuf haché par les ganglions lymphatiques (H)
- Organismes transmissibles par le sang dans la viande de bovins atteints de la maladie de Johne (M)

4) Amélioration des méthodes :

- Amélioration des méthodes de détection des cellules viables de MAP, y compris de leurs formes dépourvues de parois, dans les aliments et dans l'eau (H)

5) Caractérisation moléculaire et virulence :

- Caractérisation moléculaire et comparaison des souches de MAP (clinique) de source humaine, animale, alimentaire et environnementale au Canada (certaines souches de MAP sont-elles plus pathogènes que d'autres?) (M)

6) Prévalence de la maladie de Crohn :

- Prévalence de la maladie de Crohn chez les gens exposés à des troupeaux atteints et exempts de MJ (étude longitudinale) (M)

7) Efficacité et validation des interventions de transformation :

- Quelles sont les combinaisons durée-température éliminant MAP dans les matrices alimentaires pertinentes? (H)
- Survie de MAP dans les produits de bœuf à la suite de leur cuisson à la température recommandée (H)
- Effet de la modification des paramètres de pasteurisation (température-durée) sur les cellules viables de MAP dans le lait et les produits laitiers (H)

- Réactions de MAP au stress subléta (M)
- Températures de pasteurisation efficaces pour l'éradication de cellules viables de MAP dans les produits alimentaires à l'étape du vrac et dans les établissements commerciaux (M)
- Effet des diverses conditions de transformation et interventions en usine (p. ex., acide lactique; pasteurisation vapeur/eau, UHP, irradiation des carcasses) sur la survie de MAP (M)
- Associations spécifiques de MAP avec des protozoaires (M)
- Phosphatase alcaline comme indicateur de la présence de MAP dans le lait pasteurisé (F)
- Survie de MAP dans le fromage au lait cru (L)
- Effet des traitements chimiques appliqués aux fruits et légumes frais (ppm de chlore) sur la survie de MAP (F)
- Traitement des eaux efficace ciblant les cellules viables de MAP (F)

6. Remerciements

Nous remercions Angela Catford, Tomas Gleason, Kirsten Mattison, Heather Lim, Stacey Mantha, Annie Locas, Christine Power*, Wassim El-Khoury*, Andrijana Rajic*, Bill Slater*, Marcel Behr*, Kevin Rioux*, Joseph Odumeru* et John VanLeeuwen* pour leur contribution de premier plan à divers aspects de ces travaux.

*Membres du Comité consultatif d'experts sur MAP de Santé Canada.

7. Références

- [1] R. J. Chiodini, H. J. Van Kruiningen et R. S. Merkal, "Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects," *Cornell Vet.*, vol. 74, pp. 218.-262, 1984c.
- [2] E. J. B. Manning, "Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis: A review of current knowledge," *J Zoo Wildl Med.*, vol. 32, pp. 293.-304, 2001.
- [3] R. N. Streeter, G.F. Hoffsis, S. Bech-Nielsen, W. P. Shulaw et D. M. Rings, "Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows," *Am J Vet Res.*, vol. 56(10), pp. 1322.-1424, 1995.
- [4] E. B. Rohonczy, A. V. Balachandran, T. W. Dukes, J. B. Payeur, J. C. Rhyan, D. A. Saari, T. L. Whiting, S. H. Wilson et J. L. Jarnagin, "A comparison of gross pathology, histopathology, and mycobacterial culture for the diagnosis of tuberculosis in elk (*Cervus elaphus*)." *Can J Vet Res.*, vol. 60, pp. 108.-114, 1996.
- [5] C. D. Buergelt et P. E. Ginn, "The histopathologic diagnosis of subclinical Johne's disease in North American bison (*Bison bison*)," *Vet Microbiol.*, vol. 77, pp. 325.-331, 2000.
- [6] E. J. B. Manning, H. Steinberg, K. Rossow, G. R. Rut et M. T. Collins, "Epizootic of paratuberculosis in farmed elk," *J Am Vet Med Assoc.* vol. 213, pp. 1320.-1322, 1998.
- [7] E. J. B. Manning, T. E. Kucera, N. B. Gates, L. M. Woods et M. Fallon-McKnight, "Testing for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in asymptomatic free-ranging tule elk from an infected herd," *J Wildl Dis.*, vol. 39, pp. 323.-328, 2003.
- [8] M. R. Woodbury, M. Chirino-Trejo and B. Mihajlovic, "Diagnostic detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in white-tailed deer," *Can Vet J.*, vol. 49, pp. 683.-688, 2008.
- [9] A. R. Fawcett, P. J. Goddard, W. A. C. McKelvey, D. Buxton, H. W. Reid, A. Greig et A. J. Macdonald, "Johne's disease in a herd of farmed red deer," *Vet Rec.*, vol. 136, pp. 165.-169, 1995.
- [10] C. F. Quist, V. F. Nettles, E. J. B. Manning, D. G. Hall, D. G. Gaydos, J. K. Wilmers et R. R Lopez, "Paratuberculosis in Key deer (*Odocoileus virginianum clavum*)," *J Wildlife Dis.*, vol. 38, pp. 729.-737, 2002.
- [11] E. S. Williams, S. P. Snyder et K. L. Martin, "Pathology of spontaneous and experimental infection of North America wild ruminants with *Mycobacterium paratuberculosis*," *Vet Pathol.*, vol. 20, pp. 274.-290, 1983.
- [12] T. W. Dukes, G. J. Glover, B. W. Brooks, J.R. Duncan et M. Swendrowski, "Paratuberculosis in saiga antelope (*Saiga tatarica*) and experimental transmission to domestic sheep," *J Wildlife Dis.*, vol. 28, pp. 161.-170, 1992.
- [13] P. M. Beard, M. J. Daniels, D. Henderson, A. Pirie, K. Rudge, D. Buxton, S. Rhind, A. Greig, M. R. Hutchings, I. McKendrick, K. Stevenson et J. M. Sharp, "Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland," *J Clin Microbiol.*, vol. 39, pp. 1517.-1521, 2001c.
- [14] M. Feller, K. Huwiler, R. Stephan, E. Altpeter, A. Shang, H. Furrer, G. E. Pfyffer, T. Jemmi, A. Baumgartner et M. Egger, "Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis," *Lancet Infect Dis.*, vol. 7, no. 9, pp. 607.-613, 2007.

- [15] J. L. Mendoza, A. San-Pedro, E. Culebras, R. Cies, C. Taxonera, R. Lana, E. Urcelay, F. de la Torre, J. J. Picazo and M. Díaz-Rubio, "High prevalence of viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Crohn's disease," *World J Gastroenterol.*, vol. 16, no. 36, pp. 4558.-4563, 2010.
- [16] I. R. Grant, "Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: The current position," *J Appl Microbiol.*, vol. 98, pp. 1282.-1293, 2005.
- [17] S. L. B. McKenna, G. P. Keefe, H. W. Barkema et D. C. Sockett, "Evaluation of three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using tissue and fecal culture as comparison standards," *Vet Microbiol.*, vol. 110, pp. 105.-111, 2005.
- [18] M. T. Collins, "Interpretation of a commercial bovine *paratuberculosis* enzyme-linked immunosorbent assay by using likelihood ratios," *Clin Diagn Lab Immunol.*, vol. 9, pp. 1367.-1371, 2002.
- [19] W. B. McNab, A. H. Meek, J. R. Duncan, B. W. Brooks, A.A. Van Dreumel, S. W. Martin, K. H. Nielsen, E. A. Sugden et C. Turcotte, "An evaluation of selected screening tests for bovine *paratuberculosis*," *Can J Vet Res.*, vol. 55, pp. 252.-259, 1991.
- [20] S. E. Ridge, I. R. Morgan, D. C. Sockett, M. T. Collins, R. J. Condron, N. W. Skilbeck and J. J. Webber, "Comparison of the Johne's disease absorbed EIA and the complement-fixation test for the diagnosis of Johne's disease in cattle," *Aust Vet J.*, vol. 68, pp. 399, 1991.
- [21] M. T. Collins, D. C. Sockett, S. Ridge et J. C. Cox, "Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for Johne's disease," *J Clin Microbiol.*, vol. 29, pp. 272.-276, 1991.
- [22] R. W. Sweeney, R. H. Whitlock, C. L. Buckley et P. A. Spencer, "Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *paratuberculosis* in dairy cattle," *J Vet Diagn Invest.*, vol. 7, pp. 488.-93, 1995.
- [23] E. J. B. Manning, "*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: A review of current knowledge," *J Zoo Wildl Med.*, vol. 32, pp. 293.-304, 2001.
- [24] M. T. Collins et D. C. Sockett, "Accuracy and economics of the USDA-licensed enzyme-linked immunosorbent assay for bovine *paratuberculosis*," *JAVMA*, vol. 10, pp. 1456.-1463, 1993.
- [25] A. Huda, G. Jungersen et P. Lind, "Longitudinal study of interferon-gamma, serum antibody and milk antibody responses in cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*," *Vet Microbiol.*, vol.104, pp. 43.-53, 2004.
- [26] G. Jungersen, A. Huda, J. J. Hansen et P. Lind, "Interpretation of the gamma interferon test for diagnosis of subclinical *paratuberculosis* in cattle," *Clin Diagn Lab Immunol.*, vol. 9, pp. 453.-460, 2002.
- [27] K. Hulten, T. J. Karttunen, H. M. T. El-Zimaity, S. A. Naser, A. Almashhrawi, D. Y. Graham et F. A. K. El-Zaatari, "In situ hybridization method for studies of cell wall deficient *M. paratuberculosis* in tissue samples." *Vet Microbiol.*, vol. 77, pp. 513.-518, 2000a.
- [28] S. A. Naser, I. Shafran, D. Schwartz, F. El-Zaatari et J. Biggerstaff, "In situ identification of mycobacteria in Crohn's disease patient tissue using confocal scanning laser microscopy," *Mol Cell Probes.*, vol. 16, pp. 41.-48, 2002.
- [29] I. R. Grant, R. B. Kirk, E. Hitchings et M. T. Rowe, "Comparative evaluation of the MGIT and BACTEC culture systems for recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk," *J Appl Microbiol.*, vol. 95, pp. 196.-201, 2003.
- [30] C. G. Thornton, K. M. MacLellan, T. L. Brink et S. Passen, "In vitro comparison of NAACL-NAOH, tween 80, and C18-carboxypropylbetaine for processing of specimens for recovery of mycobacteria," *J Clin Microbiol.*, vol. 36, pp. 3558.-3566, 1998.
- [31] L. Dundee, I. R. Grant, H. J. Ball et M. T. Rowe, "Comparative evaluation of four decontamination protocols for the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk," *Lett Appl Microbiol.*, vol. 33, pp. 173.-177, 2001.
- [32] D. M. Collins, D. M. Gabric et G. W. de Lisle, "Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization," *J Clin Microbiol.*, vol. 28, pp. 1591.-1596, 1990.
- [33] R. J. Whittington, I. B. Marsh et R. H. Whitlock, "Typing of IS1311 polymorphisms confirms that bison (*Bison bison*) with *paratuberculosis* in Montana are infected with a strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinct from that occurring in cattle and other domestic livestock," *Mol Cell Probes.*, vol. 15, pp. 139.-145, 2001.
- [34] R. J. Whittington, A. F. Hope, D. J. Marshall, C. A. Taragel et I. Marsh, "Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia," *J Clin Microbiol.*, vol. 38, pp. 3240.-3248, 2000a.
- [35] R. J. Whittington, I. Marsh, S. McAllister, M. J. Turner, D. J. Marshall et C. A. Fraser, "Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep," *J Clin Microbiol.*, vol. 37, pp. 1077.-1083, 1999.
- [36] J. A. Donaghy, N. L. Totton et M. T. Rowe, "Evaluation of culture media for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from

Cheddar cheese," *Lett Appl Microbiol.*, vol. 37, pp. 285.-291, 2003.

- [37] D. Schwartz, I. Shafran, C. Romero, C. Piromalli, J. Biggerstaff, N. Naser, W. Chamberlin et S. A. Naser, "Use of short-term culture for identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue from Crohn's disease patients," *Clin Microbiol Infect.*, vol. 6, no 6, pp. 303.-307, 2000.
- [38] G. W. De Lisle, G. F. Yates, S. Cavaignac et D. M. Collins, "Evaluation of the MGIT system for culturing *Mycobacterium paratuberculosis* and characterisation of strains by polymerase chain reaction tests," presented at the 6th International Colloquium on Paratuberculosis, Melbourne, Australia, 1999.
- [39] S. A. Naser, K. Hulten, I. Shafran, D. Y. Graham et F. A. K. El-Zaatari, "Specific seroreactivity of Crohn's disease patients against p35 and p36 antigens of *M. avium* subsp. *paratuberculosis*," *Vet Microbiol.*, vol. 77, pp. 497.-504, 2000.
- [40] S. A. Naser, G. Ghobrial, C. Romero et J. F. Valentine, "Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease," *Lancet*, vol. 364, pp. 1039-1044, 2004.
- [41] G. Thomas, E. J. B. Manning et M. T. Collins, "Comparison of BACTEC and MGIT systems for detection of *M. paratuberculosis*," presented at the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen, Denmark, 2005.
- [42] I. R. Grant, R. B. Kirk, E. I. J. Hitchings et M. T. Rowe, "Comparative evaluation of the MGIT and BACTEC systems for the culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk," presented at the 7th International Colloquium on Paratuberculosis, Spain, 2002c.
- [43] S. B. Giese et P. Ahrens, "Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture," *Vet Microbiol.*, vol. 77, pp. 291.-297, 2000.
- [44] R. W. Sweeney, R. H. Whitlock, et A. E. Rosenbr, "*Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows," *J Clin Microbiol.*, vol. 30, pp. 166.-171, 1992.
- [45] E. D'Haese, I. Dumon, H. Werbrouck, A. Wiszniewska, L. Herman et H. J. Nelis, "Rapid enumeration of viable *Mycobacterium paratuberculosis* in milk," presented at the 7th International Colloquium on Paratuberculosis, Spain, 2002.
- [46] E. D'Haese, I. Dumon, H. Werbrouck, V. De Jonghe et L. Herman, "Improved detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk," *J Dairy Res.*, vol. 72, pp. 1.-4, 2005.
- [47] E. C. Stanley, R. J. Mole et C. E. D. Rees, "Rapid detection of viable *Mycobacterium paratuberculosis* in milk using phage amplification," presented at the 7th International Colloquium on Paratuberculosis, Spain, 2002.
- [48] I. R. Grant, C. M. Pope, L. M. O'Riordan, H. J. Ball et M. T. Rowe, "Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR," *Vet Microbiol.*, vol. 77, pp. 369.-378, 2000.
- [49] S. Khare, T. A. Ficht, R. L. Santos, J. Romano, A. R. Ficht, S. Zhang, I. R. Grant, M. Libal, D. Hunter et L. G. Adams, "Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and real-time PCR," *J Clin Microbiol.*, vol. 42, pp. 1075.-1081, 2004.
- [50] J. O'Mahony et C. Hill, "Rapid real-time PCR assay for detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in artificially contaminated milk," *Appl Environ Microbiol.*, vol. 70, pp. 4561.-4568, 2004.
- [51] D. Rodriguez-Lazaro, M. D'Agostino, A. Herrewegh, M. Pla, N. Cook et J. Ikonopoulou, "Real-time PCR-based methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in water and milk," *Int J Food Microbiol.*, vol. 101, pp. 93.-104, 2005.
- [52] C. D. Buergelt et J. E. Williams, "Nested PCR on blood and milk for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in clinical and subclinical bovine paratuberculosis," *Aust Vet J.*, vol. 82, pp. 497.-503, 2004.
- [53] D. V. Cousins, R. Whittington, I. Marsh, A. Masters, R. J. Evans et P. Kluver, "Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable IS900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis," *Mol Cell Probes.*, vol. 13, 431.-442, 1999.
- [54] S. Englund, G. Bolske et K. E. Johansson, "An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*," *FEMS Microbiol Lett.*, vol. 209, pp. 267.-271, 2002.
- [55] T. J. Bull, E. J. McMinn, K. Sidi-Boumedine, A. Skull, D. Durkin, P. Neild, G. Rhodes, R. Pickup, et J. Hermon-Taylor, "Detection and Verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease," *J Clin Microbiol.*, vol. 41, pp. 2915.-2923, 2003.
- [56] A. Beumer, D. King, M. Donohue, J. Mistry, T. Covert et S. Pfaller, "Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in drinking water and biofilms by quantitative PCR" *Appl Environ Microbiol.*, vol. 76, no. 21, pp. 7367.-7370, 2010.

- [57] R. J. Chiodini et W. M. Chamberlin, "What is *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*," *Appl Environ Microbiol.*, vol. 77, no. 5, 1923-1924, 2011.
- [58] J. L. Ellingson, C. A. Bolin et J. R. Stabel, "Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis," *Mol Cell Probes.*, vol. 12, pp. 133-142, 1998.
- [59] B. Strommenger, K. Stvenson et G-F. Gerlach, "Isolation and diagnostic potential of IS*Mav2*, a novel sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*," *FEMS Microbiol Lett.*, vol. 196, pp. 31-37, 2001.
- [60] T. Tasara et R. Stephan, "Development of an F57 sequence-based real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk," *Appl Environ Microbiol.*, vol. 71, pp. 5957-5968, 2005.
- [61] D. C. Alexander, C. Y. Turenne et M. A. Behr, "Insertion and deletion events that define the pathogen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*," *J Bacteriol.*, vol. 191, no. 3, pp. 1018-1025, 2009.
- [62] L. Whan, I. R. Grant et M. T. Rowe, "Interaction between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and environmental protozoa," *BMC Microbiol.*, vol. 6, pp. 63, 2006.
- [63] M. Mura, T. J. Bull, H. Evans, K. Sidi-Boumedine, L. McMinn, G. Rhodes, R. Pickup and J. Hermon-Taylor, "Replication and long-term persistence of bovine and human strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* within *Acanthamoeba polyphaga*," *Appl Environ Microbiol.*, vol. 72, pp. 854-859, 2006.
- [64] T. K. Taylor, C. R. Wilks et D. S. McQueen, "Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne's disease," *Vet Rec.*, vol. 109, pp. 532-533, 1981.
- [65] I. R. Grant IR, H. J. Ball, S. D. Neill et M. T. Rowe, "Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cow's milk at pasteurization temperatures," *Appl Environ Microbiol.*, vol. 62, pp. 631-636, 1996.
- [66] R. J. Whittington, L. A. Reddacliff, I. Marsh, S. McAllister and V. Saunders, "Temporal patterns and quantification of excretion of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep with Johne's disease," *Aust Vet J.*, vol. 78, pp. 34-37, 2000.
- [67] C. Cocito, P. Gilot, M. Coene, M. de Kesel, P. Poupart et P. Vannuffel, "Paratuberculosis," *Clin Microbiol Rev.*, vol. 7, pp. 328-345, 1994.
- [68] J. A. VanLeeuwen, A. Tiwari, J. C. Plaizier et T. L. Whiting, "Seroprevalence of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhea virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* in beef and dairy cattle in Manitoba," *Can Vet J.*, vol. 47, no. 8, pp. 783-786, 2006.
- [69] I. R. Grant, E. I. J. Hitchings, A. McCartney, F. Ferguson et M. T. Rowe, "Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurization on the viability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in naturally infected cow's milk," *Appl Environ Microbiol.*, vol. 68, no. 2, pp. 602-607, 2002a.
- [70] R. J. Chiodini, et J. Hermon-Taylor, "The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization," *J Vet Diag Invest.*, vol. 5, pp. 629-631, 1993.
- [71] L. E. Pearce, H. T. Truong, R. A. Crawford, G. F. Yates, S. Cavaignac et G.W. De Lisle, "Effect of turbulent-flow pasteurization on survival of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* added to raw milk," *Appl Environ Microbiol.*, vol. 67, pp. 3964-3969, 2001.
- [72] P. Hammer, C. Kiesner, H-G. Walte et P. Teufel, "Inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in whole milk, skim milk and cream in a pilot plant pasteurizer," *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, vol. 58, pp. 17-40, 2006.
- [73] W. Y. Ayele, P. Svastova, P. Roubal, M. Bartos et I. Pavlik, "*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic," *Appl Envir Microbiol.*, vol. 71, pp. 1210-1214, 2005.
- [74] I. R. Grant, H. J. Ball et M. T. Rowe, "Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom," *App Environ Microbiol.*, vol. 68, pp. 2428-2435, 2002b.
- [75] J. L. Ellingson, J. L. Anderson, J. J. Koziczkowski, R. P. Radcliff, S. J. Sloan, S. E. Allen et N. M. Sullivan, "Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR," *J Food Prot.*, vol. 68, pp. 966-972, 2005.
- [76] H. Shankar, S. V. Singh, P. K. Singh, A. V. Singh, J. S. Sohal et R. J. Greenstein, "Presence, characterization, and genotype profiles of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from unpasteurized individual and pooled milk, commercial pasteurized, and milk products in India by culture, PCR, and PCR-REA methods," *Int J Infect Dis.*, 2009.
- [77] I. R. Grant, H. J. Ball, et M. T. Rowe, "Effect of higher pasteurization temperatures, and longer holding times at 72 degrees C, on the inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk," *Lett Appl Microbiol.*, vol. 28, pp. 461-465, 1999.

- [78] European Commission Report, "Possible links between Crohn's disease and paratuberculosis," Report of the Scientific committee on Animal Health and Animal Welfare, Mar. 21, 2000. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scah/out38_en.pdf
- [79] W. L. McDonald, K. O'Riley, C. J. Schroen et R. J. Condon, "Heat inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk," presented at the 7th International Colloquium on Paratuberculosis, Spain, 2002.
- [80] J. R. Stabel et A. Lambertz, "Efficacy of pasteurization conditions for the inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk," *J Food Prot.*, vol. 67, pp. 2719.-2726, 2004.
- [81] C. E. O'Reilly, L. O'Connor, W. Anderson, P. Harvey, I. R. Grant, J. Donaghy, M. Rowe et P. O'Mahony, "Surveillance of bulk tank and commercially pasteurized cow's milk from approved Irish liquid-milk pasteurization plants to determine the incidence of *Mycobacterium paratuberculosis*," *Appl Environ Microbiol.*, vol. 70, pp. 5138.-5144, 2004.
- [82] D. Millar, J. Ford, J. Sanderson, S. Withney, M. Tizard, T. Doran et J Hermon-Taylor, "IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows milk in England and Wales," *Appl Environ Microbiol.*, vol. 62, no. 9, pp. 3446.-3452, 1996.
- [83] S. Corti et R. Stephan, "Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* specific IS900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland," *BMC Microbiol.*, vol. 2, pp. 15.-21, 2002.
- [84] F. Paolicchi, K. Cirone, C. Morsella, A. Gioffre, A. Cataldi et M. Roma, "Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) from commercial pasteurized milk," An abstract presented at the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen, Denmark, 2005.
- [85] A. Gao, L. Mutharia, S. Chen, K. Rahn et J. Odumeru, "Effect of pasteurization on survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk," *J Dairy Sci.*, vol. 85, pp. 3198.-3205, 2002.
- [86] O. Cerf, M. Griffiths et F. Aziza, "Assessment of the prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in commercially pasteurized milk," *Foodborne Pathog Dis.*, vol. 4, no. 4, pp. 433.-447, 2007.
- [87] J. Ikonomopoulos, I. Pavlik, M. Bartos, P. Svastova, W. Y. Ayele, P. Roubal, J. Lukas, N. Cook et M. Gazouli, "Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail cheeses from Greece and the Czech Republic," *Appl Envir Microbiol.*, vol. 71, pp. 8934.-8936, 2005.
- [88] D. L. Clark, J. L. Anderson, J. J. Koziczowski et J. L. E. Ellingson, "Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* genetic components in retail cheese curds purchased in Wisconsin and Minnesota by PCR," *Moll Cell Probes.*, vol. 20, no. 3-4, pp. 197.-202, 2006a.
- [89] R. Stephan, S. Schumacher, T. Tasara et I. R. Grant, "Prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss raw milk cheeses collected at the retail level," *J Dairy Sci.*, vol. 90, pp. 3590.-3595, 2007.
- [90] N. Sung et M. T. Collins, "Effect of three factors in cheese production (pH, salt, and heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability," *Appl Environ Microbiol.*, vol. 66, pp. 1334.-1339, 2000.
- [91] J. A. Donaghy, N. L. Totton et M. T. Rowe, "Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during manufacture and ripening of cheddar cheese," *Appl Environ Microbiol.*, vol. 70, pp. 4899.-4905, 2004.
- [92] K. Hruska, M. Bartos, P. Krali et I. Pavlik, "*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in powdered infant milk: Paratuberculosis in cattle-the public health problem to be solved," *Vet Med - Czech.*, vol. 50, pp. 327.-335, 2005.
- [93] M. J. Nauta and J. W. B. van der Giessen, "Human exposure to *Mycobacterium paratuberculosis* via pasteurized milk: A modeling approach," *Vet Rec.*, vol. 143, pp. 293.-296, 1998.
- [94] R. Lake, A. Hudson et P. Cressey, "Risk Profile: *Mycobacterium bovis* in milk," Institute of Environmental Science & Research Limited, New Zealand, 2002. Available at: <http://www.nzfsa.govt.nz/science/risk-profiles/mycobacterium-bovis-in-milk.pdf>
- [95] DEFRA (Department for Environment Food and Rural Affairs), Desktop study into demand for dairy products by Agra CEAS consulting, 2004. Available at: <http://www.defra.gov.uk/foodrin/milk/supplychainforum/agraceasreport.htm>
- [96] W. J. Meadus, C. O. Gill, P. Duff, M. Badoni et L. Saucier, "Prevalence on beef carcasses of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA," *Int J Food Microbiol.*, vol. 124, pp. 291.-294, 2008. <http://www.defra.gov.uk/foodrin/milk/supplychainforum/agraceasreport.htm>
- [97] C. A. Rossiter and W. R. Henning, "Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* (*M.ptb*) from thin market cows at slaughter," *J Anim Sci.*, vol. 79, Suppl. 1, pp. 113.-114, 2001.
- [98] D. L. Clark, J. J. Koziczowski et J. L. E. Ellingson, "Examination of bovine tissues for the presence of viable *Mycobacterium avium* subspecies

- paratuberculosis*," The International Association for Food Protection 93rd Annual Meeting. Calgary, Canada. 2006, 2006b.
- [99] L. M. Mutharia, M. D. Klassen, J. Fairles, S. Barbut et C. O. Gill, "Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in muscle, lymphatic and organ tissues from cows with advanced Johne's disease," *Int J Food Microbiol.*, vol. 136, no. 3, pp. 340.-344, 2010.
- [100] R. J. Whittington, A. Waldron et D. Warne, "Thermal inactivation profiles of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in lamb skeletal muscle homogenate fluid," *Int J Food Microbiol.*, vol. 137, no. 1, pp. 32.-39, 2010.
- [101] L. Saucier et É. Plamondon, "Heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in aseptically prepared ground beef," *Int J Food Engin.*, vol. 7, no 2, 2011.
- [102] R. S. Merkal, J. A. Crawford et D. L. Whipple, "Heat inactivation of *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex organisms in meat products," *Appl Environ Microbiol.*, vol. 38, no. 5, pp. 831.-835, 1979.
- [103] E. Rubery, "A review of the evidence for a link between exposure to *Mycobacterium paratuberculosis* (MAP) and Crohn's disease in humans," A report for the Food Standards Agency, June 2001.
- [104] M. C. Antognoli, F. B. Garry, H. L. Hirst, J. E. Lombard, M. M. Dennis, D. H. Gould et M. D. Salman, "Characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* disseminated infection in dairy cattle and its association with antemortem test results," *Vet Microbiol.*, vol. 127, no. 3-4, pp. 300.-308, 2008.
- [105] W. Y. Ayele, M. Bartos, P. Svastova et I. Pavlik, "Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls," *Vet Microbiol.*, vol. 103, pp. 209.-217, 2004.
- [106] C. Bosshard, R. Stephan et T. Tasara, "Application of an F57 sequence-based real-time PCR assay for *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bulk tank raw milk and slaughtered healthy dairy cows," *J Food Prot.*, vol. 68, pp. 1662.-1667, 2006.
- [107] M. Alonso-Hearn, E. Molina, M. Geijo, P. Vazquez, I. Sevilla, J. M. Garrido et R. A. Juste, "Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from muscle tissue of naturally infected cattle," *Foodborne Pathog Dis.*, vol. 6, no 4, pp. 513.-518, 2009.
- [108] C. Brady, D. O'Grady, F. O'Meara, J. Egan et H. Bassett, "Relationship between clinical signs, pathological changes and tissue distribution of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in 21 cows from herds affected by Johne's disease," *Vet Rec.*, vol. 162, pp. 147.-152, 2008.
- [109] C. V. Jaravata, W. L. Smith, G. J. Rensen, J. Ruzante et J. S. Cullor, "Survey of ground beef for the detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis*," *Foodborne Pathog Dis.*, vol. 4, no. 1, pp. 103.-106, 2007.
- [110] M. Klassen, *Personal communication*, 2011.
- [111] L. Whan, H. J. Ball, I. R. Grant et M. T. Rowe, "Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in untreated water in Northern Ireland," *Appl Environ Microbiol.*, vol. 71, pp. 7107-7112, 2005.
- [112] R. J. Whittington, I. B. Marsh et L. A. Reddacliff, "Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment," *Appl Environ Microbiol.* vol. 71, pp. 5304.-5308, 2005.
- [113] R. J. Whittington, D. J. Marshall, P. J. Nicholls, I. B. Marsh et L. A. Reddacliff, "Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment," *Appl Environ Microbiol.*, pp. 70, pp. 2989.-3004, 2004.
- [114] D. Mishina, P. Katsel, S. T. Brown, E. C. A. M. Gilberts et R. J. Greenstein, "On the etiology of Crohn's disease," *Proc Natl Acad Sci USA.*, vol. 93, pp. 9816.-9820, 1996.
- [115] M. Steinert, K. Birkness, E. White, B. Fields et F. Quinn, "*Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls," *Appl Environ Microbiol.*, vol. 64, pp. 2256.-2261, 1998.
- [116] J. D. Cirillo, S. Falkow, L. S. Tompkins et L. E. Bermudez, "Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence," *Infection and Immunity.*, vol. 65, pp. 3759.-3767, 1997.
- [117] R. W. Pickup, G. Rhodes, S. Arnott, K. Sidi-Boumedine, T. J. Bull, A. Weightman, M. Hurley et J. Hermon-Taylor, "*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the catchment area and water of the river Taff in South Wales, United Kingdom, and its potential relationship to clustering of Crohn's disease cases in the city of Cardiff," *Appl Environ Microbiol.*, vol. 71, pp. 2130.-2139, 2005.
- [118] E. Richter, J. Wessling, N. Lugerling, W. Domschke, et S. Rusch-Gerdes, "*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in a patient with HIV, Germany," *Emerg Infect Dis.*, vol. 8, no. 7, pp. 729.-31, 2002.
- [119] C. F. von Reyn, J. N. Maslow, T. W. Barber, J. O. Falkinham, et R. D. Arbeit, "Persistent colonisation of potable water as a source of *Mycobacterium avium* infections in AIDS," *Lancet*, vol. 343, pp. 1137.-1141, 1994.
- [120] C. Le Dantec, J-P. Duguet, A. Montiel, N. Dumoutier, S. Dubrou et V. Vincent, "Occurrence of *Mycobacteria* in water treatments lines and

- distribution systems," *Appl Environ Microbiol.*, vol. 68, no. 11, pp. 5318.-5325, 2002.
- [121] G. Aboagye et M. T. Rowe, "Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw water and water treatment operations for the production of potable water," *Water Res.*, vol. 45, pp. 3271.-3278, 2011.
- [122] L. B. Whan, I. R. Grant, H. J. Ball, R. Scott et M. T. Rowe, "Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water," *Lett Appl Microbiol.*, vol. 33, pp. 227.-231, 2001.
- [123] I. Abubakar, D. J. Myhill, I. Lake, I. Harvey et P. R. Hunter, "A case control study investigating water & dairy products in the aetiology of Crohn's disease-A possible role for *Mycobacterium avium paratuberculosis*-The CMAW study", 2005.
http://www.dwi.gov.uk/research/crohns_report.pdf
- [124] I. Abubakar, D. J. Myhill, A. R. Hart, I. R. Lake, I. Harvey, J. M. Rhodes, R. Robinson, A. J. Lobo, C. S. J. Probert et P. R. Hunter, "A case-control study of drinking water and dairy products in Crohn's disease - Further investigation of the possible role of *Mycobacterium avium paratuberculosis*," *Am J Epidemiol.*, vol. 165, no. 7, pp. 776.-783, 2007.
- [125] R. H. Taylor, J. O. Falkinham, C. D. Norton et M. W. LeChevallier, "Chlorine, chloramines, chlorine dioxide and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*," "*Appl Environ Microbiol.*," vol. 66, pp. 1702.-1705, 2000.
- [126] A. V. Singh, S. V. Singh, P. K. Singh et J. S. Sohal, "Is *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, the cause of Johne's disease in animals, a good candidate for Crohn's disease in man?" *Indian J Gastroenterol.*, vol. 29, no. 2, pp. 53.-58, 2010.
- [127] T. J. Bull, J. Hinds, P. Butcher, K. Sidi-Boumedine, E. J. McMinn, A. Skull et J. Hermon-Taylor, "Differential expression analysis by microarray of MAP resident within protozoa," presented at the 7th International Colloquium on Paratuberculosis, Spain, 2002.
- [128] J. O. Falkinham, "Mycobacterial aerosols and respiratory disease," *Emerg Infect Dis.*, vol. 9, pp. 763.-767, 2003.
- [129] J. Hermon-Taylor et F. A. K. El-Zaatari, "The *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* problem and its relation to the causation of Crohn disease," In *Pathogenic Mycobacteria in Water: A Guide to Public Health Consequences, Monitoring and Management*. World Health Organization, IWA Publishing, London, UK, S. Pedley, et al., Ed. 2004, pp. 74.-94.
- [130] A. Mansi, S. Cucchiara, L. Greco, P. Sarnelli, C. Pisanti, M. T. Franco et F. Santamaria, "Bronchial hyperresponsiveness in children and adolescents with Crohn's disease," *Am J Respir Crit Care Med.*, vol. 161, pp. 1051.-1054, 2000.
- [131] L. A. Corner, D. U. Pfeiffer et K. A. Abbott, "The respiratory tract as a hypothetical route of infection of cattle with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*," *Aust Vet J.*, vol. 82, pp. 170.-173, 2004.
- [132] J. Hermon-Taylor, T. J. Bull, J. M. Sheridan, J. Cheng, M. L. Stellakis et N. Sumar, "Causation of Crohn disease by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*," *Can J Gastroenterol.*, vol. 14, pp. 521.-539, 2000.
- [133] S. K. Grewal, S. Rajeev, S. Sreevatsan et F. C. Michel, "Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and other zoonotic pathogens during simulated composting, manure packing, and liquid storage of dairy manure," *Appl Environ Microbiol.*, vol. 72, pp. 565.-574, 2006.
- [134] I. Pavlik, W. Yayo Ayele, O. Fischer, L. Matlova, P. Svastova, M. Bartos, M. Machackova, M. Alexa et J. Lamka, "Role of the external environment, plants and non-vertebrates for the spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*," presented at the 7th International Colloquium on Paratuberculosis, Spain, 2002.
- [135] C. J. Schroen, P. F. Kluver, K. Butler, W. L. McDonald, A. F. Hope et R. J. Condron, "Factors affecting the survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in soil," presented at the 7th International Colloquium on Paratuberculosis, Spain, 2002.
- [136] I. Szabo, K. K. Kiss et I. Varnai, "Epidemic pulmonary infection associated with *Mycobacterium xenopi* indigenous in sewage-sludge," *Acta Microbiol Acad Sci Hung.*, vol. 29, pp. 263.-266, 1982.
- [137] J. O. Falkinham, "Epidemiology of infection by non-tuberculous mycobacteria," *Clin Microbiol Rev.*, vol. 9, pp. 177.-215, 1996.
- [138] J. Officer, J. A. Ostrowski et P. J. Woollard, "The design and operation of conventional and novel flotation systems on a number of impounded water types," *Water Science and Technology: Water Supply* vol. 1, no 1, pp. 63.-69, 2001.

