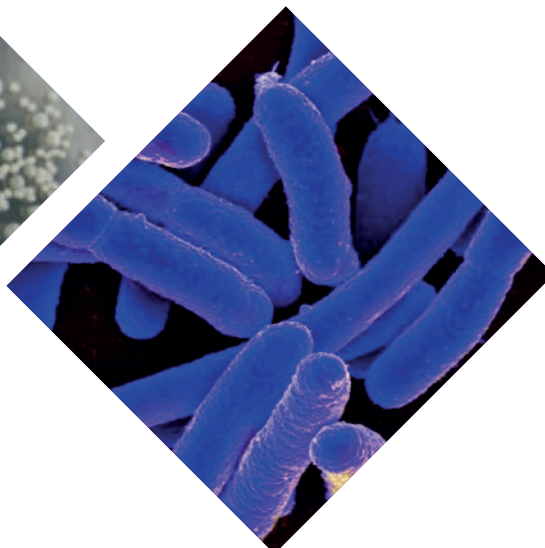
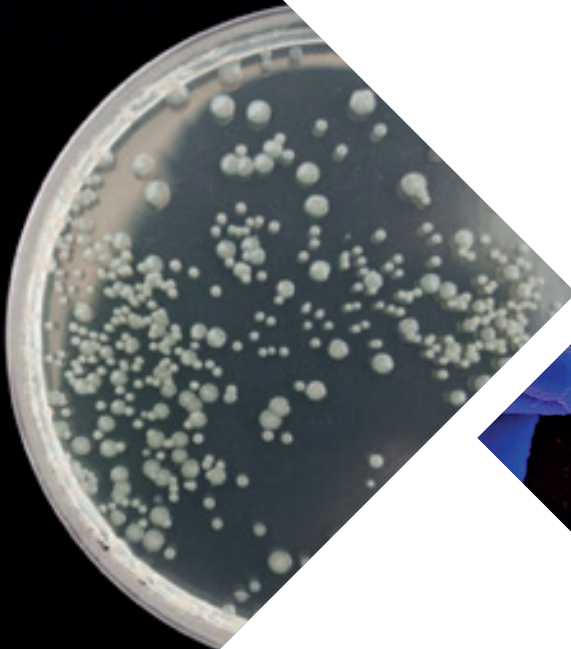


3.7

INFECTIOLOGIE

Réaliser en pratique des examens de qualité

- 3.7** Introduction au dossier infectiologie
- A.** Tests Rapides à Orientation Diagnostique (TROD) - **C. Médaille**
 - B.** Externaliser en confiance ses analyses dans un laboratoire spécialisé - **S. Vélut**
 - C.** Analyse bactériologique en laboratoire : l'existant et le futur - **G. Lequeux**
 - D.** La place de l'ESV dans l'examen bactériologique - **N. Keck- V. Bachy**
 - E.** Analyse bactériologique du lait dans l'espèce bovine - **O. Salat**
 - F.** Antibiogrammes appliqués aux germes isolés de Mammmites en ESV - **O. Salat**
 - G.** Les analyses sérologiques - **V. Bachy**
 - H.** Les analyses PCR - **C. Boucraut**



INTRODUCTION AU DOSSIER INFECTIOLOGIE

L'ensemble de l'ouvrage doit contribuer à la prise de conscience des critères de qualité à respecter dans l'étendue du domaine des analyses de laboratoire, pour le pré-analytique, l'analytique et l'utilisation des résultats (post-analytique).

Compte tenu de son importance et de sa complexité nous avons consacré un dossier spécifique à l'infectiologie virale, bactérienne ou parasitaire.

L'infectiologie et en particulier la bactériologie ont fait l'objet de débats importants ; c'est un domaine dans lequel le partenariat avec les laboratoires de biologie vétérinaire est indispensable et doit être précisé.

Sont exposées en contrepoint les limites des ESV (pour insuffisance de moyens et de capacité technique) ne leur permettant souvent pas de remplir les conditions nécessaires à l'obtention de résultats suffisamment fiables. Il existe également un risque sanitaire de biosécurité lié à la diffusion des germes lors de leur mise en culture.

Les tests rapides sont une aide au clinicien en infectiologie, au chevet de l'animal ; si la proposition commerciale est conséquente, la validation technique et scientifique des tests reste en général très insuffisante (Groupe de travail Tests rapides en infectiologie du RFSA).

L'offre des laboratoires de biologie vétérinaire en biologie moléculaire (analyses PCR) et en sérologie est d'un apport indispensable au clinicien.

En bactériologie, la complexité technique des méthodes conventionnelles, les limites des méthodes analytiques alternatives proposées aux ESV pour l'identification des germes et la connaissance de leur sensibilité aux antibiotiques, le risque de contamination accidentelle de l'environnement, en font, sauf exception, un domaine réservé aux laboratoires de biologie vétérinaire.

La norme réglementaire NF U47-107 qui décrit les procédures de la réalisation d'un antibiogramme par la méthode des disques pour l'utilisation des antibiotiques critiques, renforce cette position.

HUIT FICHES DE L'OUVRAGE SONT CONSACRÉES À L'INFECTIOLOGIE ;

TESTS RAPIDES

- Tests Rapides d'Orientation Diagnostique (TROD) **Christine Médaille**

BACTÉRIOLOGIE

- Externaliser en confiance ses analyses dans un laboratoire spécialisé **Serge Velu**
- Analyse bactériologique : l'existant et le futur **Guillaume Lequeux**
- La place de l'ESV dans l'examen bactériologique **Nicolas Keck – Véronique Bachy**
- Analyse bactériologique du lait dans l'espèce bovine **Olivier Salat**
- Antibiogrammes appliqués aux germes isolés de mammites en ESV **Olivier Salat**

SÉROLOGIE

- Les analyses sérologiques **Véronique Bachy**

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

- Les analyses PCR **Corine Boucraut Baralon**

D'autres fiches de ce guide peuvent aussi traiter d'infectiologie : hématologie, coprologie, dermatologie pour la recherche et l'identification des parasites et germes du sang, du tube digestif, de la peau...

OBJECTIF - UTILISATIONS - INDICATIONS PRINCIPALES

Présentation générale des Tests Rapides d'Orientation Diagnostique (TROD) dont le développement est considérable en infectiologie mais aussi pour les autres disciplines chez l'homme et chez l'animal.

Face aux propositions commerciales, une approche critique et raisonnée du choix et de l'utilisation de ces tests au sein de l'établissement de soins vétérinaires (ESV) est indispensable.

- Cette fiche apporte les bases de cette analyse critique.
- Les tests rapides trouvent leur place dans l'ESV même s'ils ne remplacent pas l'analyse de laboratoire de référence.
- Elle décrit les conditions de bonne utilisation :
 - ◇ lecture très attentive de la notice afin d'y trouver les critères d'utilisation indispensables,
 - ◇ respect strict de la conservation et de l'utilisation du produit,
 - ◇ parfaite connaissance de celui-ci,
 - ◇ prise en compte que la responsabilité de l'ESV dans l'exploitation de ces tests est engagée,
 - ◇ recherche du label CE de ces tests comme première approche de qualité (argument positif fiable quant à la qualité de fabrication),
 - ◇ utilisation au chevet du malade, dans une démarche de diagnostic clinique....
Donc une exploitation critique des résultats.

Le nombre de tests rapides utilisés dans un ESV restant relativement limité mais d'une utilisation assez fréquente, la connaissance approfondie de ces tests par le vétérinaire est possible et même indispensable.

1. TERMINOLOGIE

- tests médicaux car utilisés pour le dépistage, le diagnostic ou la prescription en santé animale ou humaine
- tests manuels car réalisables sans ou avec peu de matériel
- tests qualitatifs ou semi-quantitatifs *ie* résultat sous la forme « présence/absence », plus ou moins, avec une graduation, ou résultat chiffré
- tests rapides car obtenus en moins de 10 à 30 minutes (sauf exceptions)
- tests en principe conservables à température ambiante (préférable) au réfrigérateur ou au congélateur
- tests ne requérant pas de réactifs ou matériels autres que ceux commercialisés avec le test
- tests dits bio-technologiques car reposant sur des principes analytiques complexes mais miniaturisés

2. INTÉRÊTS D'UTILISATION EN SANTÉ PUBLIQUE ET EN MÉDECINE VÉTÉRINAIRE

- tests d'urgence au chevet du malade face à une forte probabilité diagnostique individuelle
- tests de dépistage en zones où la maladie est présente avec une forte prévalence
- en médecine tropicale humaine, l'utilisation des tests rapides en bactériologie permet en zones peu médicalisées (sans laboratoires) la surveillance, le dépistage et parfois la confirmation de la présence ou de l'absence de maladies contagieuses comme le choléra, la peste ou la shigellose

- la lutte contre l'antibiorésistance passe par la distinction entre maladie bactérienne ou virale, diminuant ainsi le recours abusif à l'antibiothérapie
- diminution du temps de réponse du laboratoire et mise en œuvre précoce d'un traitement ciblé ou d'une vaccination et de mesures de nettoyage-désinfection
- responsabilisation et prise en charge par le patient ou le détenteur des maladies chroniques (auto-tests diabète)

3. SYNONYMIE ET DIFFÉRENCE EN BIOLOGIE MÉDICALE DES TR OU TDR (TEST RAPIDE)

- I. **TROD OU TORD** : test rapide d'orientation diagnostique appelé aussi « Doctor test » : tests utilisables en officine et médecine pour dépistage OU orientation diagnostique
- II. **AUTO-TESTS** : tests utilisables par le patient ou l'utilisateur
- III. **POCT** : point of care testing : conçus pour être effectués par du personnel non médical formé dans des structures d'urgence

4. PRINCIPES ANALYTIQUES POSSIBLES

- colorimétrie (bandelettes urinaires, bandelettes mesurant les corps cétoniques dans le lait ...)
- réaction antigène/anticorps : recherche d'Ag ou recherche d'Ac
 - ◇ immunofiltration ou agglutination (premiers tests)
- immunochromatographie sur membrane (ICT) (grippe) ou bandelette (tests diarrhée néonatale bovine) autres exemples : recherche de K88 (F4), K99 (F5), F41, F18 sur fèces, Recherche de *Clostridium perfringens* et toxine; recherche de *Clostridium difficile*
 - ◇ agglutination de particules de latex sensibilisées
 - ◇ immuno-enzymatique (ELISA en puits)
- biologie moléculaire
 - ◇ technologie PCR : extraction ADN puis amplification plus ou moins miniaturisée (ex : PCR automatisée Xpert pour la tuberculose)
 - ◇ bio-puces ; puces à ADN (pathologie cancéreuse, pathogènes environnementaux)
 - ◇ kit LAMP (amplification isotherme) (Loop mediated isothermal amplification) (déttection d'insectes parasites, paludisme) (tests en infectiologie équine (LABEO-ENALEES, MASTISENSOR))
 - ◇ kit RPA (Recombinase Polymerase Amplification) (peste petits ruminants)
 - ◇ test sur buvard recherche ARN (VIH et hépatites virales)

5. CHAMPS D'APPLICATION : EN INFECTIOLOGIE ET EN MALADIE MÉTABOLIQUE

- agents infectieux (maladies virales/bactériennes/parasitaires)
- choix ou non choix d'un traitement (sensibilité aux anti-infectieux)
- suivi des maladies chroniques (bandelette glycémie, urée)
- recherche d'atteintes sub-cliniques (corps cétoniques)
- dépistage précoce de certaines anomalies (dosage acides gras non estérifiés)

6. MATRICES

- spécimens biologiques sans traitement préalable (urines, sang total, sang capillaire, selles, salive, lait)
- échantillons traités (sérum, plasma)
- matrice permettant plusieurs analyses en même temps : tests monoplex, biplex ou multiplex

7. LÉGISLATION ET RESPONSABILITÉS

EN MÉDECINE HUMAINE :

- les TROD : arrêté du 1er août 2016 (liste exhaustive et limitative des TROD et des utilisateurs autorisés – « responsabilité du professionnel de santé autorisé engagée ;... éléments d'orientation diagnostique ne pouvant se substituer au diagnostic réalisé au moyen d'un examen de biologie médicale.. ; marquage C.E et assurance qualité..»)
- les autotests : recueil d'un signal biologique ou d'un test pour le seul usage de l'utilisateur (ex des lecteurs de glycémie, tests de grossesse, bandelettes urinaires, cholestérol, carence en fer...) ; certains sont marqués C.E et sont vendus en pharmacie et d'autres non marqués C.E sur internet. Pas de texte à propos de la responsabilité.
- Règlement européen 2017/746 relatif au DMDIV* (*cf lexique*)

EN SANTÉ ANIMALE :

- pas de réglementation de l'Union Européenne
- pas de réglementation française
- Groupe de Travail RFSA*

ATTENTION !

Les tests Multiplex sont rarement recommandés par l'OMS comme seule méthode de diagnostic ; la confrontation avec la clinique et une confirmation (si elle est disponible) par un test ciblé, sont indispensables.

PCR MULTIPLEX ET MÉDECINE HUMAINE (EXTRAIT DE LA REVUE MÉDICALE SUISSE)

Tests moléculaires Multiplex : les tests Multiplex sont des tests diagnostiques moléculaires rapides suivant une méthode d'amplification isotherme, permettant de détecter simultanément plusieurs agents (souvent infectieux). Il existe une offre de ce type de tests en médecine vétérinaire notamment équine et bovine.

Mais ces avantages ont aussi leurs inconvénients :

- tous les microorganismes détectés par la PCR Multiplex ne correspondent pas à des infections. Ainsi, plusieurs bactéries sont trouvées dans près d'un tiers des prélèvements effectués lors de pneumonie et dans 80 % des cas où un virus est détecté.
- De même, plusieurs agents potentiellement pathogènes peuvent être détectés dans 16 % des selles prélevées lors de diarrhées, notamment des *Escherichia coli* entéro-hémorragiques (EHEC) dont le nombre de déclarations auprès des organismes de Santé publique augmente en parallèle. Cette augmentation est attribuée à un biais de détection lié à l'arrivée de la PCR Multiplex qui détecte des portages asymptomatiques plutôt qu'à une réelle variation épidémiologique.
- Le Multiplex ne recherche que les pathogènes prédéfinis par les amorces incluses, au risque de ne se satisfaire que de ce panel et de réduire le diagnostic différentiel.
- Le prix est à considérer.

Des tests vétérinaires sont déjà sur le marché (Infections respiratoires bovines, infections abortives...) et d'autres sont en développement : le vétérinaire devra s'approprier ce nouvel outil en considérant ses avantages mais aussi ses limites pour une complète et pertinente prise en charge de ses patients.

8. LIMITES ET PRÉCAUTIONS D'UTILISATION

- Qualités intrinsèques des tests : leur sensibilité et leur spécificité sont variables suivant les tests ; on peut craindre un nombre de « faux positifs » ou « faux négatifs » non négligeable.
Ces deux qualités doivent être indiquées clairement dans la notice des tests.
- Qualités extrinsèques des tests : leurs valeurs prédictives dépendent fortement de la prévalence de la maladie recherchée lors de dépistage et de la probabilité pré-test (diagnostic clinique) en médecine individuelle.
- Conditions d'utilisation : fonction de la température extérieure, de l'humidité ambiante, des sources de contaminations croisées.
- Respect scrupuleux du mode opératoire.
- Respect scrupuleux de la matrice.

RECOMMANDATIONS

ÉVALUER LE VÉRITABLE BESOIN :

- Dépistage ou détection dans une population infectée (problématique de santé publique humaine ou vétérinaire).
- Besoin vital d'une réponse rapide au chevet du patient.
- Quantifier précisément le coût économique global et le gain économique/recours au laboratoire.

ÉVITER LE MÉSUSAGE :

- Ne pas utiliser « au hasard » sans diagnostic clinique ou sans connaissance de prévalence.
- Suivre scrupuleusement le mode opératoire de réalisation, les conditions de stockage et déstockage et les contraintes environnementales d'utilisation.
- Vérifier les espèces et les maladies ciblées.

CONNAÎTRE AVANT TOUTE DÉCISION DE MISE EN OEUVRE :

- Les éléments nécessaires pour connaître même approximativement les valeurs prédictives obtenues pour un résultat positif ou négatif (ou à défaut la sensibilité et la spécificité du test).
- Ce qui est recherché : antigène, anticorps, ADN ...
- Les espèces et populations ciblées.
- L'intérêt relatif par rapport au recours aux méthodes classiques (pour la plupart des tests, le diagnostic n'est que présomptif et doit conduire théoriquement à un recours au laboratoire pour confirmation)
- Une liste du matériel fourni et une liste du matériel particulier requis mais non fourni.
- Les indications de toute condition particulière de stockage (température, lumière, humidité, etc.) et/ou de manipulation applicable.
- La stabilité à l'utilisation, qui peut porter sur les conditions de stockage, sur la durée de conservation en stock après la première ouverture du conditionnement primaire, ainsi que sur les conditions de stockage et la stabilité des réactifs de travail, s'il y a lieu.
- S'il y a lieu, une indication de toute exigence particulière concernant les installations requises (par exemple des locaux propres) ou la formation et les qualifications de l'utilisateur prévu.
- Le nom, la raison sociale ou la marque déposée du fabricant, l'adresse de son siège social où il peut être joint et celle de son lieu d'établissement, ainsi qu'un numéro de téléphone et/ou de télécopie et une adresse de site internet permettant d'obtenir une assistance technique.
- Les certifications éventuelles du fournisseur (marquage C.E ; certification ISO...9001).

VÉRIFIER SUR LA NOTICE D'UTILISATION :

- La destination du dispositif : ce qui est mesuré, sa fonction (dépistage, surveillance, aide au diagnostic, prévision de la réponse à un traitement...).
- Automatisé ou non ; qualitatif, semi-quantitatif ou quantitatif.
- Une description des matériaux de contrôle et les réactifs.
- Les indications concernant tout traitement ou manipulation préparatoire requis avant l'utilisation du dispositif (par exemple, stérilisation, assemblage final ou étalonnage) pour que celui-ci soit utilisé comme prévu par le fabricant.
- Les caractéristiques en matière de performances analytiques, comme la sensibilité analytique, la spécificité analytique, la justesse (biais), la fidélité (répétabilité et reproductibilité), l'exactitude (résultant de la justesse et de la fidélité), les limites de détection et de quantification, (informations nécessaires pour la maîtrise des interférences pertinentes connues, réactions croisées et limites de la méthode), la plage de mesure, la linéarité et les informations sur l'utilisation des procédures de mesure et matériaux de référence par l'utilisateur.
- Les caractéristiques en matière de performances cliniques (comme le seuil, la sensibilité diagnostique et la spécificité diagnostique, la valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative).
- Les informations relatives aux substances interférentes ou aux caractéristiques (par exemple, signes visuels d'hyperlipidémie ou d'hémolyse, âge de l'échantillon) susceptibles d'avoir une incidence sur les performances du dispositif ; les réactions croisées possibles.
- Les qualités intrinsèques du test (sensibilité et spécificité) –pour chaque maladie si test multiplex- Si possible, son évaluation par rapport à un test de référence.
- Les conditions de réalisation et le matériel nécessaire (tests basés sur la PCR).

NE PAS OUBLIER QUE LES TESTS PERFORMANTS EN LABORATOIRE LE SONT SOUVENT MOINS EN CONDITIONS DE TERRAIN :

La mise au point de tests rapides a été réalisée dans des conditions optimales par l'industriel.

Ne jamais exclure la possibilité que les conditions du terrain (humidité, sécheresse excessives, etc.) puissent agir sur la performance du test.

INTERET D'UN MARQUAGE CE

	MARQUAGE CE	NON MARQUAGE
DOCUMENTATION DES LOTS	Obligation de contrôle de conformité avant libération des lots	Si problème de non conformité : qui conserve le certificat de libération du lot ?
STABILITÉ	Etudes de stabilité obligatoires suivant les exigences d'une norme	Vérifications à la discrétion du fabricant des conditions de stockage, de transport et stabilité dans le temps, limites et prescriptions.
INFORMATION DES UTILISATEURS	Notice disponible, mises à jour transmises en temps réel Contact gratuit	Transmission des mises à jour si modification sensible des performances du test ?
RÉFÉRENCES	Références bibliographiques pertinentes obligatoires	Non obligatoire
VALIDATION	Si critères d'utilisation de la méthode préconisée suivis par l'utilisateur : pas de revalidation nécessaire	Les DMDIV non marqués CE ou marqués CE et modifiés ou développés au sein des laboratoires doivent être entièrement validés par l'utilisateur.

PETIT LEXIQUE

* Label CE : Le marquage « CE » est obligatoire pour tous les produits couverts par un ou plusieurs textes réglementaires européens (directives ou règlements) qui le prévoient explicitement. Il est interdit pour les produits qui ne sont pas couverts par une de ces législations.

Pour permettre la circulation d'un produit sur le territoire de l'Union européenne, le fabricant doit évaluer sa conformité aux exigences essentielles définies par les législations européennes dont il relève, en fonction de ses caractéristiques techniques.

Marquage « CE » n'est pas une marque de certification ni une indication de l'origine géographique du produit.

* DMDIV : Dispositifs médicaux de diagnostic in vitro, Règlement (UE) 2017/746 du Parlement européen et du Conseil du 5 avril 2017 relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. Obligation d'un marquage C.E.

* RFSA : Réseau Français de Sécurité Animale

UTILISATION DES TESTS RAPIDES EN INFECTIOLOGIE

TESTS EN INFECTIOLOGIE	INCONVÉNIENTS	RÉSOLUTION DU PROBLÈME
RÉSULTAT D'UN TEST DE RECHERCHE D'AGENT INFECTIEUX	Souvent à confirmer par une autre méthode	Augmenter la valeur prédictive en ciblant le sujet et en hiérarchisant le diagnostic différentiel
SI POSITIF	N'exclut pas la présence d'un autre pathogène	Faire un diagnostic différentiel complet
SI NÉGATIF	Faux négatif toujours possible	Phase trop précoce Variabilité interindividuelle Erreurs de manipulation, de conservation
APPLICABILITÉ	Limité souvent à un type précis de spécimen (ex urines...)	NE JAMAIS DEROGER
PONCTUEL	Infection en cours ou passée ?	Associer à d'autres évaluations biologiques (hémato-biochimiques)
COÛT	Non négligeable	A confronter au besoin réel
CADRE JURIDIQUE	Absence de cadre spécifique : responsabilité engagée sur le résultat	S'assurer de l'assurance qualité du fabricant
RÉSULTAT DES TR DE SENSIBILITÉ OU RÉSISTANCE À DIFFÉRENTS ANTI-INFECTIEUX	Interrogations scientifique et morale sur la pertinence de l'utilisation	
RÉSULTATS	Non accrédité, non standardisé pour la plupart, ne peut être qu'indicatif et parfois trompeur Valeur thérapeutique prédictive mal documentée	Traitement probabiliste Recours aux laboratoires
CADRE JURIDIQUE	Absence de cadre spécifique : responsabilité engagée sur le résultat	Utilisation prudente, raisonnée et contrôle si doute

QUELLES SONT LES MODALITÉS RÉGLEMENTAIRES DE MISE SUR LE MARCHÉ DES TRODS ?

Madame Sandra DEJEAN-TCHAPO propose dans sa thèse une définition du Dispositif Médical Vétérinaire (DMV), adaptée de la définition du dispositif médical en humaine. Les TRODS pourraient s'inscrire dans cette définition.

Tout instrument, appareil, équipement, logiciel, implant, réactif, matière ou autre article, destiné par le fabricant à être utilisé, seul ou en association, chez l'animal pour l'une ou plusieurs des fins médicales suivantes :

- diagnostic, prévention, contrôle, traitement ou atténuation d'une maladie,
- diagnostic, contrôle, traitement, atténuation ou compensation d'une blessure ou d'un handicap,
- étude, remplacement ou modification d'une structure ou fonction anatomique ou d'un processus ou état physiologique ou pathologique,
- maîtrise de la conception ou assistance à celle-ci,
- désinfection ou stérilisation de tout produit susmentionné,
- communication d'informations au moyen d'un examen *in vitro* d'échantillons provenant du corps de l'animal, y compris les dons d'organes, de sang et de tissus, et dont l'action principale voulue dans ou sur le corps de l'animal n'est pas obtenue par des moyens pharmacologiques ou immunologiques ni par métabolisme, mais dont la fonction peut être assistée par de tels moyens.

Les dispositifs médicaux vétérinaires ne sont pas soumis à des modalités de mise sur le marché spécifiques définies au niveau communautaire. Il n'existe pas plus de réglementation au niveau national.

POUR EN SAVOIR PLUS

IMPLEMENTATION D'UN CADRE RÉGLEMENTAIRE POUR LES DISPOSITIFS MÉDICAUX VÉTÉRINAIRES : ANALYSE D'IMPACT
THÈSE pour le DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE soutenue le 1er juillet 2016 par Mme DEJEAN-TCHAPO Sandra

B. EXTERNALISER EN CONFIANCE SES ANALYSES DANS UN LABORATOIRE SPÉCIALISÉ

Serge Vélou

OBJECTIFS

- apporter les bases d'une réflexion pour le choix et la relation avec des laboratoires de biologie vétérinaires prestataires de l'ESV.
- établir ses limites dans la réalisation des analyses de laboratoire dans l'ESV : pour des raisons de qualité des résultats (et des conséquences de la non qualité) mais aussi pour des motifs simplement économiques de coût de revient.

1. EXAMENS RÉALISABLES DANS UN ESV : PERTINENCES ET LIMITES

Les ESV sont susceptibles de réaliser une palette plus ou moins importante de tests. Pour un ESV, choisir dans cette palette les examens qu'il pourra réaliser dans de bonnes conditions est essentiel. Il est donc important d'aborder quelques points fondamentaux qui facilitent ce choix. L'ESV facturant ses analyses, le client est en droit d'exiger une fiabilité comparable à celle qui serait obtenue en laboratoire spécialisé.

S'il est important que la réalisation des analyses réponde à des critères de qualité - au moins le respect des protocoles et l'inclusion régulière de contrôles - il est aussi, sinon plus important d'en connaître la fiabilité (limite de détection, précision, exactitude, sensibilité, spécificité) qui permet d'évaluer les valeurs prédictives et donc d'éviter de mauvaises interprétations.

Dès que les techniques internes atteignent leurs limites – qu'il faut donc connaître - et sont insuffisantes par rapport au besoin diagnostique, le praticien devra externaliser dans une structure qui en a fait son métier : un laboratoire de biologie vétérinaire.

Quelques exemples :

- Un examen tel que la coprologie parasitaire n'est simple que dans sa réalisation.... (voir encadré placé dans la fiche Coprologie des ruminants et équidés)
- Si les automates d'hématologie et de biochimie sont fiables – beaucoup d'erreurs sont faites en utilisant sans examen critique ni validation les valeurs « sorties de l'appareil ».
- Les unités de bactériologie des laboratoires externes disposent d'une diversité de milieux, réactifs, antisérums et techniques - normées ou non - leur permettant de cultiver puis d'identifier au moins partiellement la grande majorité des souches bactériennes isolables des prélèvements – multi espèces - qui leur sont envoyés. Ceci n'est accessible qu'aux ESV ayant une réelle volonté de se hisser à ce niveau.
- Les techniques phénotypiques, malgré leur performance, ont parfois leurs limites. Quand c'est nécessaire, les techniques moléculaires d'identification (PCR ou spectrométrie de masse) permettent de pallier leurs insuffisances : elles doivent alors être privilégiées.

Chacun se doit donc de connaître les limites des techniques qu'il souhaite utiliser.

L'utilisation de contrôles internes et la participation volontaire à des campagnes de comparaisons

interlaboratoires – désormais accessibles aux ESV – sont de bons moyens de se connaître et de s'améliorer.

A partir de ces constats : comment choisir un prestataire ?

2. «SÉCURISATION» DES RÉSULTATS OBTENUS EN MATIÈRE DE DÉMARCHE QUALITÉ

2.1. PRÉREQUIS

La qualité des résultats obtenus dépend en grande partie du « pré-analytique » et de la précision de la demande d'analyse :

- réflexion sur le but à atteindre : éliminer une hypothèse (nécessite un test sensible) ou confirmer une hypothèse (besoin d'un test spécifique). Préciser le besoin permet de vérifier le bon choix de la technique, lieu, nombre et qualité des spécimens,
- informations fournies au laboratoire : est-ce une analyse de « routine » ou faut-il mettre tout ce qui est possible en oeuvre ? A quel coût ? Le spécimen est-il unique donc précieux ? Quelle est la suspicion ? etc... Ces informations permettront des conseils pertinents et un choix de technique(s) en adéquation avec les attentes cliniques et le budget consenti.

NB : Sans précisions autres que : espèce, nature du spécimen et analyse à réaliser,

- le laboratoire **ne sera qu'un sous-traitant technique** du prescripteur qui, dans ce cas, se doit de connaître lui-même précisément les caractéristiques de fiabilité du test demandé ainsi que les conditions analytiques du laboratoire mandaté pour sa réalisation – exactement comme si le test avait été réalisé en interne.
- le responsable du laboratoire ne pourra pas interpréter le résultat – il ne pourra même pas juger de la vraisemblance du résultat vis-à-vis de la demande ou du cas clinique. Il lui manquera un élément essentiel dans son contrôle de la qualité.

2.2. INTERPRÉTATION DES RESULTATS

La qualité des résultats obtenus dépend aussi du « post-analytique », donc de l'interprétation qui en est faite par le clinicien qui est le seul à même d'établir un diagnostic, en concertation avec le laboratoire.

3. CHOIX DU LABORATOIRE

Remarques préliminaires :

- Le toujours plus vite et le toujours moins cher n'est pas compatible avec la sécurité analytique.
- Un choix orienté uniquement sur des avantages commerciaux qui associent la fourniture de vaccins ou de réactifs pour l'ESV à une offre en analyses complémentaires externalisées est fondé sur de mauvaises raisons. Il convient de garder un esprit critique.

LORS DU PREMIER CHOIX D'UN LABORATOIRE – IL EST NATUREL DE SE FONDER SUR :

3.1. LA NOTORIÉTÉ : COMMENT EN JUGER ?

- Par les publicités réalisées et/ou la présence dans les congrès ? Une des difficultés des laboratoires est le « faire-savoir », certains y sont passés maîtres, d'autres ont des possibilités commerciales et financières plus réduites mais ce qui ne signifie pas une moindre compétence. Les publi-informations permettent au moins de connaître les axes de développement du laboratoire et la formation des responsables.

- Par le bouche à oreille? Toujours efficace.
- Par les interventions en congrès ou les publications scientifiques réalisées par les responsables ?
- Par l'investissement du laboratoire à travailler en concertation avec les praticiens pour faire avancer les connaissances sur des sujets précis?
- Par la mise à disposition des praticiens des outils diagnostiques les plus performants (ie : Maldi -Tof pour les examens bactériologiques)?
- Par la participation à des études cliniques ? Un laboratoire choisi pour la réalisation d'études dans le cadre d'une investigation clinique pour un dossier d'AMM instruit par l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire (ANMV) a dû démontrer des critères de compétence suffisants.

En tous cas, garder un œil critique sur les publications commerciales parfois partielles et orientées, fondées sur des populations discutables en matière de choix ou d'effectif est essentiel.

3.2. LA COMPETENCE REELLE OU SUPPOSEE DES RESPONSABLES

Elle peut évidemment être jugée à partir des diplômes obtenus ; le premier d'entre eux étant le titre de docteur en médecine vétérinaire. Un diplôme n'est malheureusement pas un gage absolu de compétence. Il existe aussi des personnalités non vétérinaires très compétentes en laboratoires spécialisés pour élevages industriels. Ce sujet reste donc très polémique.

Il est, en revanche, important que les signataires soient présents au niveau des plateaux techniques afin d'avoir accès à tous les rouages du processus analytique.

Pour un état des lieux de la formation à la biologie vétérinaire, on lira le rapport de l'Académie Vétérinaire de France adopté le 23 novembre 2017.

3.3. LA PROXIMITE

Un critère parfois oublié ! Bien que les laboratoires vétérinaires soient rares dans certaines régions et les transports de prélèvements rapides, la proximité est importante lorsqu'il s'agit de faire des analyses de grande urgence ou faire transporter des cadavres ou des animaux vivants. Mais aucun laboratoire ne peut survivre qu'avec les urgences ou les autopsies.

3.4. LA SPECIALISATION

Un laboratoire spécialisé a plus de chance d'être compétent dans sa spécialité qu'un laboratoire multitâches.

Il est important que le laboratoire connaisse les limites de ses compétences et sache choisir ses sous-traitants quand le besoin s'en fait sentir. Aucun laboratoire ne sera compétent en tout !

Le clinicien peut donc s'appuyer sur un laboratoire généraliste dans la mesure où celui-ci sait sous-traiter dans des laboratoires plus spécialisés et maîtriser les délais de réponse. Il peut aussi s'adresser directement à des laboratoires spécialisés quand il les connaît.

Un laboratoire multi-espèces doit développer plus de techniques différentes ou des techniques plus adaptables ; il peut être d'une grande utilité lors de cas sortant de l'ordinaire, d'autant que la biologie vétérinaire est moins automatisée que sa sœur humaine. En revanche, un laboratoire spécialisé dans une discipline ou une espèce permet un dialogue plus précis entre spécialistes.

Notons que les laboratoires ont en majorité un domaine de prédilection (par exemples la bactériologie, les analyses PCR ...) mais sont aussi des laboratoires de première intention qui peuvent s'appuyer sur des sous-traitants dans les autres domaines.

3.5. LES SIGNES EXTERIEURS DE QUALITE :

Voir l'encadré

4. UNE FOIS LE LABORATOIRE CHOISI ET TESTÉ – ON S'AIME OU ON SE QUITTE ?

4.1. LES RAPPORTS D'ANALYSE

Les rapports d'analyse se doivent d'être précis mais sans excès et rester compréhensibles.

Un laboratoire sous assurance qualité ne peut pas s'exonérer d'un certain nombre de précisions sur le rapport (numérotation unique, pagination, dates de prélèvement, de réception, de mise en analyse, informations relevant de sa responsabilité ou non, méthode si elle est normée ...). En revanche les avis et interprétations peuvent ne pas être autorisés sur les rapports accrédités.

4.2. L'HUMILITE !

Un laboratoire qui ne prend pas en compte un doute raisonnable du clinicien sur ses résultats d'analyse doit être considéré comme « suspect ».

Tout biologiste connaît les risques d'erreur et les incertitudes analytiques. Il se doit de contrôler à nouveau son processus et, si possible, de ré-analyser le spécimen en cas de doute justifié du clinicien.

4.3. L'HISTORIQUE

Au fur et à mesure des mois, ce sont les rapports de confiance qui s'installent entre l'ESV et le laboratoire qui sont sans doute plus importants que les signes extérieurs de qualité.

On juge de l'efficacité, la rapidité, les conseils... Un des critères de réussite de la collaboration clinicien- biologiste est le dialogue.

SIGNES EXTÉRIEURS DE QUALITÉ... PLAÎT IL ?

Le jargon utilisé par les laboratoires et les instances satellites, administration comprise peut paraître difficile à saisir. Tous ces termes rendent compte de réalités différentes.

Notons que, en dehors des cas pour lesquels l'accréditation est obligatoire, la réglementation n'exige aucune mise sous assurance qualité pour réaliser des analyses vétérinaires.

L'AGREMENT est donné par le ministère à des laboratoires pour effectuer des analyses pour son compte (analyses officielles dites « analyses autorité »). Ces analyses ne sont pas toujours prises en charge par l'Etat. (Attention ! ne pas confondre analyses officielles, analyses réglementées, autocontrôles obligatoires, autocontrôles). Pour être agréé, il faut être accrédité et qualifié mais surtout, sauf exception, être laboratoire public ou ancien laboratoire public.

L'ACCREDITATION est attribuée par le Comité Français d'Accréditation (COFRAC) après évaluations sur place pour vérifier l'ensemble du système de management de la qualité du laboratoire ainsi que les compétences techniques dans le domaine d'accréditation demandé (ex : bactériologie animale, immuno-sérologie). L'annexe technique précise les domaines et les analyses pour lesquelles le laboratoire est accrédité. Elle est disponible sur demande auprès du laboratoire et sur le site du Cofrac www.cofrac.fr.

Obtenir et conserver l'accréditation est lourd et onéreux. Elle est obligatoire pour nombre d'analyses touchant à la Santé publique. Il est compréhensible que les laboratoires vétérinaires ne pratiquant pas ces analyses n'entreprennent pas la démarche.

Il faut comprendre que l'accréditation d'un laboratoire pour une ou des analyses signifie qu'il respecte un très haut niveau de qualité sur celles-ci mais aussi que son système qualité global est conforme à la très exigeante norme internationale ISO/CEI 17025. En revanche, l'application de la totalité du système qualité aux analyses non accréditées relève de la volonté du laboratoire.

LA CERTIFICATION est attribuée par un organisme certificateur, lui-même accrédité par le Cofrac. L'organisme vérifie lors d'audits que l'entreprise respecte un cahier des charges (norme). La certification BPL pour bonnes pratiques de laboratoire reconnaît la conformité du système qualité du laboratoire. Elle est souvent exigée pour participer à des études cliniques. A noter que l'accréditation vaut certification du système qualité du laboratoire.

LA QUALIFICATION, quand il s'agit des laboratoires vétérinaires, signifie « Qualification pour les échanges de données informatisées (EDI) avec le ministère. Il s'agit de la « Qualification Sigal » qui impose un travail important des informaticiens du laboratoire pour « caler » les échanges d'emails sécurisés et du personnel pour comprendre ce que diable il faut mettre dans les cases pour que cela ne plante pas !

LA RECONNAISSANCE : est accordée par le ministère à des laboratoires qu'il ne veut pas agréer pour les analyses officielles mais qu'il reconnaît suffisamment indépendants et compétents (accrédités et qualifiés) pour réaliser les analyses réglementées qui ne rentrent pas dans la catégorie des analyses officielles. (Exemple : les recherches de salmonelles programmées en élevage de volailles).

L'AGREMENT CIR : C'est l'agrément Crédit Impôt Recherche qui permet des avantages fiscaux à un fournisseur d'ordre du laboratoire dans le cadre d'activités de recherche. Il ne concerne pas la biologie clinique.

C. ANALYSE BACTÉRIOLOGIQUE EN LABORATOIRE: L'EXISTANT ET LE FUTUR

Guillaume Lequeux

Cette fiche a pour objet d'éclairer le clinicien sur l'étendue des techniques proposées par les laboratoires de biologie vétérinaire qui offre de nouvelles possibilités d'identification de germes en bactériologie, des délais plus courts dans l'obtention des résultats et plus de fiabilité des résultats.

PRÉAMBULE

Les techniques en bactériologie médicale ont considérablement évolué depuis l'époque pasteurienne avec le développement de l'informatique et des nouvelles techniques analytiques.

L'étude des bactéries d'intérêt médical requiert toujours l'utilisation de la bactériologie dite « classique » puisqu'elle permet également l'obtention d'indications pour le traitement et l'épidémiologie.

Les dernières technologies disponibles dans de nombreux laboratoires vétérinaires sont également décrites dans cette fiche.

1. LA BACTERIOLOGIE CONVENTIONNELLE

1.1. PRINCIPE ANALYTIQUE

Isoler une ou plusieurs bactéries réputées pathogènes ou d'intérêt à partir d'une culture sur milieu solide plus ou moins précédée d'une culture en milieu liquide (enrichissement) :

Premières étapes:

- coloration de Gram,
- tests rapides: oxydase, catalase,
- tests phénotypiques : caractères biochimiques, agglutination ...
- miniaturisation sous forme de galeries (dispositifs constitués d'une série de microtubes de réactifs prêts à l'emploi dans lesquels la souche à identifier est inoculée avant incubation : api biomérieux, micronaut identification system, thermo sensitre id plate par exemple),
- standardisation de la lecture (abaques pour la lecture visuelle ou lecture spectrophotométrique),
- automatisation (VITEK 2 BIOMERIEUX validé pour de nombreux germes d'origine animale).

1.2. AVANTAGES

Il s'agit d'une approche non sélective : grande diversité de pathogènes détectables à un faible coût (différent de la technique PCR).

L'isolement permet de connaître la bactérie responsable et de réaliser un antibiogramme.

1.3. INCONVÉNIENTS

- réservée aux espèces les plus fréquentes et cultivables,
- pas toujours parfaitement cohérente avec la taxonomie microbiologique actuelle surtout pour les espèces spécifiquement vétérinaires,
- nécessite une présélection pour la réalisation de tests appropriés et une expertise en bactériologie clinique,
- nécessite une incubation de plusieurs heures avant tout résultat.

D'après Descy et al.: Spectrométrie de masse MALDI-TOF en bactériologie clinique ou comment identifier une bactérie en une minute. <https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/83161/1/maldi-tof.pdf>

2. MALDI-TOF

Il s'agit d'une méthode de spectrométrie de masse permettant l'identification automatisée et rapide des bactéries, levures et moisissures, apparue pour une utilisation en routine au début de la décennie 2010.

2.1. PRINCIPE ANALYTIQUE

- un spécimen (souche, suspension bactérienne ou autre) est déposé sur une lame puis mis en contact avec une matrice qui cristallise en séchant. Les molécules de l'échantillon sont ainsi « piégées » dans cette matrice puis ionisées par un laser. Ces ions chargés sont accélérés puis percutent un détecteur, selon une rapidité liée à leur masse : les molécules les plus petites étant les plus rapidement détectées. Elles sont ainsi séparées selon le ratio m/z c'est-à-dire (masse/charge) par un analyseur de masse en fonction de leur temps de vol (TOF : Time Of Flight, temps de vol nécessaire pour traverser le tube) ;
- la génération du spectre permet de produire une « empreinte de masse peptidique », dans la très grande majorité des cas unique pour un germe donné (existence de pics spécifiques aux genres, espèces voire sous-espèces). L'« empreinte » est alors comparée à une base de données existante pour déterminer de quelle espèce/sous-espèce microbienne l'échantillon se rapproche le plus et le degré de confiance qui peut être attribué à cette comparaison, par l'intermédiaire des algorithmes du logiciel. La gamme de masses est habituellement comprise entre 2 et 20 kDa, ce qui comprend principalement les protéines ribosomales ;
- deux systèmes commerciaux existent principalement sur le marché : le MALDI Biotyper de Bruker et le VITEK MS de BIOMERIEUX. Les bases de données comprennent environ 2000 espèces ou sous-espèces bactériennes à l'heure actuelle, dont un grand nombre de bactéries, levures et moisissures d'importance vétérinaire. Leurs performances relatives sont très proches ;
- les bases de données sont en perpétuelle évolution et leur contenu en croissance exponentielle depuis plusieurs années. L'utilisateur a également la possibilité de construire ses propres bases de données, en complément de celles fournies par le fournisseur du matériel.

2.2. AVANTAGES

- le maldi-tof est relativement robuste et peu affecté par les conditions de culture des germes ;
- fiabilité des identifications. C'est un avantage majeur ;
- la rapidité d'analyse est l'élément majeur : en effet, dans cette approche, le laboratoire n'est plus dépendant de la croissance des bactéries et de l'expression de leurs phénotypes (notamment biochimiques) nécessaires aux identifications classiques ; il n'y a plus de nécessité d'attente pendant les temps d'incubation nécessaires à cette expression des phénotypes, qui requiert le plus souvent 16 à 48 heures ;

- technique moins dépendante que celles de bactériologie classique de l'état physiologique des bactéries et de leurs capacités de croissance, notamment en lien avec les conditions de conservation et d'envoi des échantillons ;
- coût modéré (de l'ordre de 0.3 à 1 € / identification) et peu de consommables nécessaires à la mise en œuvre ;
- aucune nécessité de connaître ni de suspecter la bactérie en cause ou d'avoir une orientation au préalable (différence majeure avec l'approche PCR et bactériologie classique) ;
- les performances sont très élevées en comparaison des méthodes de référence (séquençage de l'ARN 16 S) : de l'ordre de 85 à 100 % des bactéries sont correctement identifiées, ces pourcentages étant variables en fonction des genres ou espèces considérés ;
- les possibilités offertes d'identifier des germes difficiles (anaérobies à croissance lente, mycobactéries) ouvrent des perspectives importantes dans la gestion des infections liées à ces agents.

2.3. LIMITES ACTUELLES

- pas de différenciation possible entre bactéries proches : exemple d' *E.Coli* et *Shigella*, discrimination parfois difficile entre espèces de streptocoques, pas de possibilité d'identification à l'espèce entre les bactéries du complexe *Enterobacter cloacae* ;
- les bases de données ne couvrent pas l'ensemble des bactéries pouvant être isolées en bactériologie clinique et des erreurs d'identification peuvent également se produire, notamment entre espèces très proches ;
- l'identification de certaines bactéries pose encore à l'heure actuelle des difficultés pour certaines mycobactéries, actinomycétales, certains genres anaérobies ou leptospires par exemple, que ce soit en termes de préparation de l'échantillon ou de performance d'identification sensu stricto ;
- la standardisation des protocoles entre laboratoires n'est pas encore élaborée, malgré la robustesse et la reproductibilité connues des systèmes ;
- le coût de l'appareil représente un investissement très conséquent pour le laboratoire et peut représenter un frein à la diffusion massive de cette technologie : une activité suffisamment importante en bactériologie est nécessaire pour amortir ce coût ;
- les souches d'aspect muqueux (filantes après culture) peuvent ne pas pouvoir être identifiées ;
- **la croissance bactérienne sur milieu solide est nécessaire à l'exception des hémocultures et des échantillons urinaires pour lesquels il peut être possible d'identifier le germe qui y est présent en travaillant directement sur ces matrices après une phase de traitement (extraction protéique) mais sans phase de culture initiale.**

2.4. UTILISATIONS POSSIBLES POUR LE VÉTÉRINAIRE

- **identifications bactériennes et fongiques ;**
- NB : les identifications directes sur urine, cultures sanguines, liquide céphalo-rachidien, lavages respiratoires, laits de mammites pourraient être une piste prometteuse à l'avenir, en matière de gains de délai de réponse au praticien. Les premières publications sur le lait ne sont pas convaincantes
- typage, détection de facteurs de virulence et taxonomie bactérienne ;

- identification de germes auparavant non connus.

2.5. FUTUR

- **détection de résistances aux antibiotiques**

Référence : Irene Burckhardt and Stefan Zimmermann Susceptibility Testing of Bacteria Using Maldi-Tof Mass Spectrometry Front. Microbiol, 06 August 2018 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01744>

3. PCR

Biologie Moléculaire ; identification de germes pathogènes ciblés sans culture préalable

3.1. PRINCIPE ANALYTIQUE

d'après Poutrel, 2018

La PCR est une technique d'amplification de l'ADN qui permet d'obtenir in vitro un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie et définie comme étant une séquence cible spécifique à mettre en évidence.

Chaque cycle de PCR comporte 3 étapes après extraction de l'ADN présent dans l'échantillon. Les produits de chaque étape sont utilisés comme matrices pour les étapes suivantes :

- dénaturation de l'ADN par chauffage à 95°C pour séparer les 2 brins qui le composent, ce qui conduit à l'obtention d'un ADN monocaténaire,
- hybridation d'un couple d'amorces ou « primers » à chacune des extrémités de la séquence d'ADN recherchée et qui sera amplifiée. Ces primers « pointent » l'un vers l'autre et bornent la séquence à amplifier. Cette hybridation est réalisée entre 40 et 65°C en fonction de la longueur des primers. Plus la température est élevée, plus l'hybridation est sélective, donc plus elle est spécifique,
- élongation à 72°C par la Taq polymérase. A chaque cycle le nombre de copies de l'ADN ciblé est multiplié par 2. Ainsi après 30 cycles, le nombre de copies d'un fragment d'ADN permet en théorie d'obtenir plus d'un milliard de copies de ce fragment.

La PCR en temps réel repose sur la possibilité de suivre au cours du temps le processus à l'aide de la fluorescence.

Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant du fait que la fluorescence émise est directement proportionnelle à la quantité d'« amplicons » générés pendant la PCR, elle-même étant corrélée à la quantité d'ADN de la matrice originale.

Plus l'échantillon est « riche » à l'origine en molécules d'ADN cible, moins il faudra de cycles pour atteindre un signal fluorescent significativement supérieur au bruit de fond (Ct = cycles seuil). La PCR quantitative exprime des résultats en quantité de génome/pathogène/cible en fonction d'un volume ou unité d'échantillon.

3.2. AVANTAGES

La majorité des bactéries d'intérêt médical sont cultivables (techniques plus ou moins longues mais peu coûteuses) mais avantage à la PCR pour :

- les bactéries non cultivables ou de culture longue ou fastidieuse (anaérobies, mycobactéries),
- les cas où la flore commensale est importante et variée (exemple du tube digestif) - recherche ciblée,
- la détection des facteurs de pathogénicité / virulence/résistance (ex : toxines de *E.Coli* ou de staphylocoque) ou des marqueurs épidémiologiques,

- la quantification possible du pathogène (ex : fréquence et seuil d'attribution d'avortement ?),
- le rapport coût / efficacité,
- la bonne sensibilité,
- la spécificité de la cible, mais, comme pour la sensibilité, ces performances sont également fonction de la valeur seuil (en Ct) retenue,
- la rapidité (délai inférieur à celui de la culture).

Applications en Bactériologie :

- détection d'un agent pathogène ciblé,
- identification,
- séquençage,
- détection des mécanismes de résistance,
- épidémiologie (typage moléculaire).

3.3. INCONVÉNIENTS

- prix parfois élevé,
- technicité nécessaire du personnel afin notamment de garantir une qualité d'extraction des acides nucléiques à partir des échantillons et de limiter le risque d'inter-contaminations,
- nécessité de locaux adaptés afin de limiter les risques de contaminations des échantillons (séparation physique ou temporelle des phases d'extraction et d'amplification, principe de la marche en avant),
- multiples analyses d'espèce ou de genre à réaliser en parallèle,
- défaut classique de la PCR : détecte la présence mais pas la viabilité d'un agent pathogène. De ce fait, le lien de causalité doit parfois être fait avec prudence selon le contexte médical,
- difficultés techniques ou d'interprétation.

DIFFICULTÉS	CONSÉQUENCES
Mise en évidence de bactéries non viables	PERTINENCE CLINIQUE
Contamination de laboratoire	FAUX POSITIF
Inhibition de l'amplification par des substances présentes dans le prélèvement biologique (charbon présent dans les flacons d'hémoculture, ...)	FAUX NÉGATIF
Hybridation non spécifique des amorces	FAUX POSITIF
Bactérie ou prélèvement biologique difficile à lyser	FAUX NÉGATIF
Choix du fragment de biopsie à analyser - hétérogénéité de l'échantillon	FAUX NÉGATIF
Inoculum inférieur au seuil de détection	FAUX NÉGATIF
Prélèvement plurimicrobien (infection plurimicrobienne ou présence d'une flore commensale)	RÉSULTAT ININTERPRÉTABLE

D'après F. Doucet-Populaire. Qu'attendre de la biologie moléculaire en bactériologie ?

<http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/JNI/2005/CT/ct9-1-doucet.pdf>

EN CONCLUSION

Les ESV auraient la possibilité de disposer des techniques de PCR (c'est déjà le cas pour certaines d'entre elles), en réunissant différentes conditions :

- formation du personnel à cette technique,
- locaux adaptés afin de limiter les risques de contaminations,
- pertinence financière : les investissements matériels restent accessibles en terme de prix (un thermocycleur neuf coûte entre 15 et 20 000 €) dès lors qu'une activité analytique suffisante peut les justifier

En revanche, la pertinence pour les ESV de s'équiper de MALDI-TOF apparaît faible, compte-tenu du nombre très élevé d'identifications quotidiennes nécessaires à son amortissement.

COMPARAISON DES DIFFERENTES APPROCHES

Méthode	Avantages	Inconvénient	Durée de préparation	Durée d'identification	Coût (consommables)	Identifications possibles	Compétence requise	Type d'échantillons analysables
Identification conventionnelle : culture puis caractères biochimiques	Sensible Faible coût Grande diversité de pathogènes détectables Permet réalisation d'anti-biogrammes	Longueur du processus : délai de réponse (24-48h)	1 à 20 minutes	5 à 48 heures	5 €/éch	Espèces les plus fréquentes d'intérêt clinique	Modérée	Souches bactériennes A peu près tous les spécimens possibles (organes, écouvillons, fluides, laits, fèces, etc...)
MALDI-TOF	Rapide (3-5 min) Fiable/précise Moins chère que PCR Peu dépendante état physiologique bactéries et de l'orientation préalable pour l'identification	Coût initial achat (150 k€) Certaines bactéries peuvent être difficilement identifiables	5 minutes 20 minutes	2 minutes	0,1 €/éch - 0,5 €/éch	Bactéries aérobies/ anaérobies Levures Mycobactéries Champignons filamenteux	Basique Compétence technique spécifique à acquérir limitée	Souches bactériennes Pas d'application actuelles validées directement sur échantillons
PCR	Sensible Spécifique Identification de souches non cultivables ou de culture longue/fastidieuse	Compétence technique Coût	60 minutes	45 minutes à 48 heures	30-50 €/éch	Toutes théoriquement	Elevée	Souches bactériennes A peu près tous les échantillons possibles (organes, écouvillons, fluides, laits, fèces, etc...)

Singhal et al. *Frontiers in Microbiology*, 2015 et C. Meex. Apport du MALDI-TOF en bactériologie.

<https://orbi.uliege.be/handle/2268/164531>

D. LA PLACE DE L'ESV DANS L'EXAMEN BACTÉRIOLOGIQUE

Nicolas Keck, Véronique Bachy

Cette fiche peut aider le lecteur :

- à définir la place et le rôle majeur de l'ESV dans l'examen bactériologique et en particulier dans le pré-analytique et le post-analytique,
- à disposer de résultats fiables à interpréter en coopération avec le laboratoire, pour leur exploitation clinique,
- et de résultats utilisables et compatibles avec la réglementation actuelle sur l'utilisation des antibiotiques critiques.

OBJECTIFS DE SANTÉ ANIMALE

Les principaux objectifs de l'examen bactériologique sont :

- mettre en évidence, isoler et identifier la ou les bactéries impliquées dans le processus infectieux,
- évaluer leur sensibilité aux antibiotiques,
- aider à préciser les caractéristiques épidémiologiques de l'infection,
- détecter une éventuelle colonisation bactérienne des animaux,
- suivre l'évolution d'une infection (éventuellement en cours de traitement),
- et ce, à partir de spécimens biologiques.

1. PRINCIPES

- ◆ Mise en évidence, isolement et identification de bactéries pathogènes à partir de spécimens de nature variée prélevés sur animal vivant ou en post-mortem.
- ◆ Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques des espèces bactériennes d'intérêt médical.

NB : Dans certains cas (bactéries ne pouvant être cultivées, identification non obtenue par les méthodes bactériologiques) les micro-organismes responsables de l'infection peuvent faire l'objet d'une recherche par biologie moléculaire, qui doit dans ce cas respecter les recommandations de la fiche dédiée.

2. PARTICULARITÉS DE L'ANALYSE BACTÉRIOLOGIQUE

La plupart des techniques de bactériologie ne peut être réalisée que dans des laboratoires d'analyse spécialisés, nécessitant des locaux dédiés et sécurisés, du matériel spécifique et du personnel formé et expérimenté. Ces laboratoires sont responsables de la qualité des résultats afin de pouvoir respecter les bonnes pratiques en bactériologie et les normes NFU47-107 et NFU47-106 préconisées par le décret 2016-317 du 16 mars 2016 concernant l'usage des antibiotiques critiques.

L'arrêté du 18 décembre 2017 accepte également toute méthode ou test revendiquant la détermination de la sensibilité bactérienne aux antibiotiques, ayant obtenu un résultat favorable à la validation réalisée par le laboratoire national de référence.

Des techniques rapides alternatives aux méthodes officielles, réalisables par les ESV, existent mais elles ne sont pas validées par l'Anses.

La gestion de la qualité par les ESV se limite dans la majorité des cas à celle des étapes pré-analytiques - déterminantes pour l'analyse ultérieure et pour l'obtention de résultats fiables par le laboratoire spécialisé.

Cependant certaines techniques analytiques peuvent être utilisées par le praticien pour orienter son diagnostic dans l'attente de confirmation par un laboratoire spécialisé.

Dans ce cas l'ESV devra respecter les conditions opérationnelles adéquates et les règles d'hygiène et de sécurité.

3. L'ÉTAPE PRÉ-ANALYTIQUE : PRÉLÈVEMENT/COLLECTE DES SPÉCIMENS

LA QUALITÉ DU RÉSULTAT NÉCESSITE :

- **des précautions environnementales :**

limiter au maximum la contamination par des bactéries non pathogènes, ubiquitaires d'origine animale (par exemple, flore cutanée non pathogène, fécale ou salivaire) ou humaine, notamment cutanée,

- ◇ désinfection des mains par friction hydro-alcoolique avant le prélèvement,
- ◇ port de gants à usage unique,

- **un matériel de prélèvement : matériel dédié et utilisé avant la date limite d'utilisation**

- ◇ à usage unique et étanche,
- ◇ tube sec si collecte de liquide biologique (fluides et cytoponctions) - tube borate possible pour l'urine,
- ◇ flacon adapté pour les hémocultures (sur indication du laboratoire),
- ◇ tube sec pour les biopsies et les raclages cutanés additionnés d'un peu de sérum physiologique stérile,
- ◇ écouvillons : en matériau neutre (comme nylon ou dacron) en présence d'un milieu de transport (type Amies ou Stuart) sont recommandés. Le coton et le bois ne doivent pas être utilisés. Selon les cas, il est recommandé de prélever deux écouvillons : un pour l'examen direct et l'autre pour la culture,
- ◇ cytobrosses stériles dans certains cas mais éviter les cytobrosses et écouvillons secs pour le transport (seules les espèces bactériennes les plus résistantes survivraient au transport),

- **une technique de prélèvement avec procédure standardisée**

- ◇ un volume optimum : un volume insuffisant peut conduire à des résultats faussement négatifs (par ex : un volume de 20 ml de sang est conseillé pour investiguer une bactériémie).
- ◇ pour augmenter la sensibilité, les prélèvements peuvent être multiples: plusieurs contenants avec une aiguille ou une lame de bistouri par prélèvement, celui-ci étant adapté au processus infectieux exploré :
 - ◆ privilégier les prélèvements profonds,
 - ◆ proscrire les prélèvements superficiels (bords, fistule, pus sur compresse, écouvillon sur cicatrice etc.),
 - ◆ effectuer si possible le prélèvement en début d'évolution clinique et avant la mise en place de traitements spécifiques,
 - ◆ prélèvements lors de septicémie : à organiser avec le laboratoire,
 - ◆ interaction avec la flore commensale de la zone (cf. supra « précautions environnementales »),
 - ◆ désinfecter la zone par l'utilisation d'un antiseptique (ex : ponction d'un liquide interne).

◇ **des modalités de prélèvement adaptées aux germes anaérobies :**

- ◆ pus, épanchement : prélever avec une seringue stérile, chasser toute bulle d'air, boucher stérilement et hermétiquement, envoyer au laboratoire en moins de 24h
- ◆ si le spécimen est peu abondant, écouvillonner et placer dans un milieu de transport pour germe anaérobie,
- ◆ si la conservation ou le délai de transport excèdent 24h, utiliser un milieu de transport adapté.

A FAIRE OU NE PAS FAIRE

A PROSCRIRE

- les fixateurs (formol ou autre) pour les tissus,
- la présence d'air dans le tube ou le flacon si une bactériologie anaérobie est requise,
- le délai trop important post-mortem (prélèvement réalisé moins de 6h après la mort),
- les lames de scalpel, aiguilles dans les tubes contenant les spécimens

RECOMMANDÉ

- effectuer le prélèvement avant traitement antiseptique/antibiotique. Ceci n'est pas toujours possible en pratique et doit dans ce cas être signalé au laboratoire. Si un antibiotique a déjà été administré, arrêter si possible le traitement 4 jours avant le prélèvement (notamment pour infections cutanées et urinaires),
- valider avec le laboratoire les spécimens à prélever en fonction des signes cliniques/durée d'évolution,
- utiliser un milieu de conservation des bactéries,
- utiliser un pack réfrigéré ou de température contrôlée pour certains spécimens (notamment fragments d'organes).

4. RECUEIL DES INFORMATIONS PERTINENTES

- Sur le contenant du spécimen : Nom animal/propriétaire, localisation du site pour éviter toute interversion
- Sur la demande d'analyses :
 - ◇ animal : espèce, nom animal/propriétaire, âge ;
 - ◇ contexte de réalisation : date de prélèvement, localisation du site et nature de chaque spécimen, degré d'urgence ;
 - ◇ informations pouvant aider à l'interprétation des résultats, notamment cliniques et sur l'antibiothérapie éventuellement réalisée avant le prélèvement ;
 - ◇ demande claire : culture (aérobie/anaérobie), bactérioscopie, recherche spécifique éventuelle (ex : recherche de mycobactéries) etc...

5. CONSERVATION DES SPÉCIMENS AVANT ENVOI

Certaines espèces bactériennes sont très fragiles ou à croissance difficile et les conditions de conservation pré-analytiques sont très importantes pour le déroulement ultérieur de la culture.

Il est nécessaire de rechercher le délai le plus court entre le prélèvement et la mise en culture.

A PROSCRIRE

- exposition directe à la chaleur (dessiccation des spécimens),
- congélation du sang et des fluides,
- congélation des organes (sauf exception, à valider avec le laboratoire).

RECOMMANDÉ

- réfrigération ($5\pm 3^{\circ}\text{C}$), en attente de l'envoi (au maximum 2 jours à l'ESV), dans un tube ou flacon adapté pour les liquides biologiques,
- dans un milieu adapté de transport/conservation des bactéries pour les écouvillons.

6. EXPÉDITION VERS LE LABORATOIRE

- ◇ matière infectieuse de catégorie B (UN 3373),
- ◇ triple emballage avec absorbant requis pour protéger les spécimens et absorber la totalité des liquides en cas de casse,
- ◇ expédition rapide (en moins de 24h) et suivie à température ambiante ou réfrigérée.

7. ETAPE ANALYTIQUE RÉALISABLE EN ESV

7.1. EXAMEN MICROSCOPIQUE :

a. examen direct à l'état frais :

b. colorations différentielles

- I. éviter d'étaler trop de tissus sur la lame
- II. utiliser les kits prêts à l'emploi
- III. respecter le mode opératoire et les dates de péremption
- IV. augmenter la sensibilité par centrifugation à faible vitesse (ex : urines)

7.2. CULTURE BACTÉRIENNE

a. L'utilisation de réactifs prêts à l'emploi et aux normes C.E est recommandée, principalement pour des applications bien identifiées (ex : des systèmes constitués d'une lame de plastique recouverte de 2 milieux de culture gélosés permettant de déterminer la bactériurie après avoir été plongée dans l'urine fraîchement émise). Le mode d'emploi de ces milieux de culture prêts à l'emploi doit être strictement respecté.

b. La réalisation d'antibiogrammes par diffusion selon la norme NF U 47-107 est rarement applicable en routine car elle nécessite une expertise difficile à maintenir dans un ESV.

c. Les manipulations doivent respecter les règles d'hygiène et de sécurité adaptées aux analyses de laboratoire.

A PROSCRIRE

- utiliser des réactifs d'évaluation rapide de la résistance aux antibiotiques non validés par le laboratoire de référence (Anses),
- effectuer un antibiogramme à partir de colonies non isolées ou non identifiées.

La norme NF U 47-107

Elle précise dans quelles conditions réaliser un antibiogramme par diffusion en milieu gélosé (méthode des disques).

Elle définit notamment :

- les milieux utilisables (Mueller Hinton simple ou enrichi),
 - la préparation de l'inoculum bactérien (évalué par étalons de Mac Farland ou densitomètre),
 - la réalisation pratique (ensemencement, application des disques),
 - la durée et les conditions d'incubation,
 - l'interprétation selon les recommandations du CA-SFM*/ section vétérinaire, mises à jour chaque année,
 - les modalités de réalisation de contrôles qualité réguliers à l'aide de souches de référence.
- * **CA-SFM* : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie**
(<https://www.sfm-microbiologie.org/2023/06/15/casfm-veterinaire-2023/>)

E. L'ANALYSE BACTÉRIOLOGIQUE DU LAIT DANS L'ESPÈCE BOVINE



Olivier Salat

Cette fiche présente une expérience rigoureuse d'analyse bactériologique ciblée dans un ESV (1ère partie).

OBJECTIFS ET JUSTIFICATIONS

Identifier la cause d'une inflammation/infection mammaire chez la vache, qui peut être :

- une infection bactérienne classique (la plupart du temps),
- une infection bactérienne préalablement éliminée par la mamelle (une des principales causes des cultures sans pousse bactérienne – « stériles »),
- une infection bactérienne à pourcentage élevé de guérison spontanée (infection colibacillaire responsable de mammites non sévères),
- une infection non bactérienne (levures ou champignons).

Il faut souligner la variabilité étiologique constatée dans les mammites cliniques non sévères (où la clinique ne peut orienter valablement sur le germe en cause) et la fréquence des entérobactéries lors de mammites avec répercussion sur l'état général (tableau 1).

	MAMMITES NON SÉVÈRES	MAMMITES SÉVÈRES
Effectif	1782	615
Coliformes	14%	65%
Streptococcus uberis	33%	9%
Autres Streptocoques	8%	7%
Staphylococcus aureus	8%	5%
Levures ou champignons	1%	0,2%
stériles	17%	6%

Tableau 1 : principaux résultats des analyses bactériologiques effectuées de 2016 à 2020 selon le type de mammite clinique (données personnelles – clinique vétérinaire de la Haute Auvergne)

L'intérêt de l'analyse pratiquée en ESV réside essentiellement dans le délai d'obtention des résultats, permettant parfois de ne traiter qu'après identification du germe, et dans la confrontation tableau clinique et identification bactérienne.

1. PRÉLÈVEMENT

A l'heure actuelle, le lait dans la mamelle est considéré comme un milieu normalement stérile. La mise en évidence dans ce lait de la présence de germes peut donc être interprétée comme révélateur d'une infection d'un ou plusieurs quartiers de la mamelle

1.1. MATÉRIEL NÉCESSAIRE

- serviette désinfectante ou tampon imbibé d'alcool à 70°,
- petits pots stériles, cette dernière qualité étant indispensable. Il vaut mieux privilégier un matériel non cassable (type PVC) plutôt que le verre.

1.2. PRÉCAUTIONS À PRENDRE

Prélever le lait de chaque quartier atteint de façon aseptique. C'est facilement réalisable pourvu que l'exécution du protocole de prélèvement soit rigoureuse, c'est-à-dire :

- trayon propre,
- extrémité du trayon désinfectée,
- premiers jets de lait jetés,
- mains propres,
- 1 ou 2 jets de lait (au moins 100 µl) dirigés vers un flacon tenu le plus horizontalement possible (et pas à l'aplomb du quartier prélevé).

Si une vache présente plusieurs quartiers infectés, la rigueur commande de prélever chaque quartier dans des pots différents. En pratique, selon l'expérience et l'interdépendance entre les quartiers (épidémiologique mais pas organique), c'est souvent le même germe qui est retrouvé, ce qui autorise à mélanger dans le même pot le lait de plusieurs quartiers (on se limite quand même à un maximum de 2)

1.3. MODES DE CONSERVATION

Dans la mesure du possible, l'analyse doit être effectuée le plus rapidement possible. Sinon le spécimen doit être gardé au froid positif (2-8°C). En cas de prélèvement correctement réalisé, le délai entre prélèvement et analyse peut aller jusqu'à 3 jours sous couvert du froid.

Il est envisageable de congeler les spécimens mais il faut savoir alors qu'une partie des bactéries risque de disparaître, en particulier les « Gram négatives ». Il existe alors des pots spécifiques de prélèvements (CRYOKIT) (laboratoire MSD).

1.4. QUALITÉ DU PRÉLÈVEMENT

Il faudra absolument la présence dans la méthode analytique d'une étape permettant de s'assurer que le spécimen n'est pas contaminé, préalable indispensable à toute tentative d'analyse de résultat.

2. MATÉRIEL ANALYTIQUE

Le matériel requis est relativement simple et d'un coût le plus souvent modéré.

Il s'agit (liste non exhaustive et fortement conseillée) :

- d'une étuve (munie d'un thermomètre interne),
- de diverses géloses ou bouillons (selon la méthode utilisée),
- de certains réactifs (eau oxygénée) ou de tests et réactifs divers (coagulase, de lancefield),
- d'un kit de coloration de Gram,
- de divers petits matériels stériles (Anses, bâtonnets, lames, puits d'identification),
- de récipients de collecte de déchets à risque et éventuellement de collecte des colorants (conteneur à DASRI),
- d'un microscope (avec objectif à immersion X 100).

NB : ce matériel ne permet pas de cultiver des bactéries anaérobies ou de culture difficile

3. MÉTHODES ANALYTIQUES

Il existe plusieurs méthodes phénotypiques d'identification des bactéries pathogènes mammaires. Leurs principales caractéristiques sont résumées dans le tableau 1.

S'il est concevable que l'ensemencement du lait puisse être réalisé par un technicien (ne)/auxiliaire en santé animale, il est indispensable que le reste de l'examen soit pratiqué par un vétérinaire ou par un biologiste.

	DESCRIPTION RAPIDE	AVANTAGES	INCONVÉNIENTS
Géloses multi compartimentées	Géloses à 2 à 4 compartiments, certains chromogènes. La lecture combinée de ces compartiments conduit à une identification avec une forte probabilité	Simplicité, Matériel requis limité Nécessite peu de formation pour l'utilisation, Lecture d'un manuel d'interprétation	Impossibilité de vérifier la contamination du spécimen. Volume d'ensemencement limité → sensibilité réduite. Lecture parfois délicate. Concordance d'identification faible avec Maldi-Tof pour les Gram + (1) Coût des géloses.
Méthode classique (2,3)	Gélose au sang à partir de laquelle les colonies identifiées vont faire l'objet de divers tests et en premier d'une coloration de Gram	Appréciation de la qualité du prélèvement, plus complète que les géloses uniques, (sources d'erreurs plus limitées,) Identification large, coût	Nécessité d'une formation spécifique. Chronophage Matériel requis (péréemption des géloses au sang). Concordance d'identification inconnue avec Maldi-Tof
Méthode dite des 3 géloses (4) ou Patho 12	Gélose au sang de mouton, gélose spécifique Gram + et gélose spécifique des entérobactéries. Compléter par différents tests complémentaires (catalase, coagulase, Gram) et autres bouillons ou géloses	Appréciation de la qualité du prélèvement plus complète que les géloses uniques (sources d'erreurs plus limitées) Identification large Méthode moyennement simple, rapide et robuste (reproductible, tests faciles à interpréter et à réaliser avec l'expérience)	Nécessité d'une formation spécifique Concordance d'identification correcte avec Maldi-Tof (= 0.77 Gram – et 0.61 pour les Gram +) Matériel requis conséquent (péréemption des géloses au sang)

4. PRÉCAUTIONS À PRENDRE

La lecture des géloses peut se faire au bout de quelques heures, en fonction de la vitesse de pousse des bactéries. Il faut au moins attendre 48 heures pour rendre un résultat définitif.

La plupart des bactéries pathogènes mammaires bovines ne présentent pas de dangers particuliers en cas de contamination humaine. Cependant les règles d'hygiène élémentaires doivent être respectées. Il n'est pas indispensable – bien que conseillé – de travailler sous bec Bunsen ou en dépression, seulement les géloses ne doivent pas être conservées plus de 48 heures à l'étuve avant lecture. Il est conseillé de mettre en DASRI les géloses immédiatement après lecture.

5. CONTRÔLE QUALITÉ

Il est indispensable de faire pratiquer en parallèle des analyses bactériologiques à partir d'un même spécimen de lait à un laboratoire de référence pratiquant régulièrement des analyses bactériologiques de lait. Il serait essentiel d'évaluer régulièrement la technique employée dans les ESV :

- ◇ soit en identifiant des souches envoyées par un laboratoire partenaire (EILVET)
- ◇ soit en faisant parvenir à intervalle régulier au laboratoire partenaire des bactéries préalablement identifiées pour confirmation.

Un certain nombre de tests rapides (gélose multi-compartmentée) ont fait l'objet d'évaluations ayant débouché sur des publications (1).

6. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

L'isolement d'un germe ne signifie pas qu'il est systématiquement à l'origine des troubles observés. Un isolement d'une CFU est synonyme d'infection pour les pathogènes majeurs (*Staphylococcus aureus*, les *Streptococcus uberis*, *agalactiae*, *dysgalactiae* et les coliformes), *Corynebacterium bovis* et les entérocoques.

C'est beaucoup plus discutable et à pondérer en fonction du nombre de CFU (Colony Forming Unit) isolées pour les autres germes rencontrés.

En règle générale, il faut toujours se référer à la clinique avant toute conclusion : il est donc **indispensable** que le résultat soit validé par un vétérinaire **ayant des compétences en santé mammaire**.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 : Griffioen (K.), Velthuis (A.G.J.), Lagerwerf (L.A.), Heuvelink (A.E.), Lam (T.J.G.M.). Agreement between four commercial diagnostic tests and routine bacteriological culture of milk to determine the udder infection status of dairy cows. *Prev Vet Med.* 2018 Sep 1;157:162-173.
- 2 : Le Page (P.), Poutrel (B.) L'analyse bactériologique du lait de mammites par la méthode de référence utilisant une gélose non sélective et la coloration de Gram. *Recueil Journées GTV 2014*, p. : 87-92.
- 3 : Lequeux (G.) Bergonier (D.) Diagnostic bactériologique des mammites au laboratoire. *Bull. GTV 2019*, 95 : 35-44.
- 4 : Salat (O.), Lemaire (G.) La bactériologie de lait. *Point Vet. N° spécial rurale « Les indispensables en pratique rurale » 2017*, p. 100 – 10

LA BACTÉRIOLOGIE SIMPLIFIÉE DU LAIT

Objectifs : * Traiter un spécimen de lait au moyen d'une batterie de milieux de culture, pour :	* Identifier le / les germes pathogènes * Faire le diagnostic étiologique d'une mammité * puis réaliser éventuellement un antibiogramme
Indication : * Examen entrant dans l'offre de services d'un ESV spécialisé en production laitière	<input checked="" type="checkbox"/> Indispensable <input checked="" type="checkbox"/> Utile (Très) <input type="checkbox"/> En urgence au chevet de l'animal <input checked="" type="checkbox"/> Dans un délai rapide pour poser un diagnostic
Avantages : * Utilisation	<input type="checkbox"/> Facile <input checked="" type="checkbox"/> Rapide <input checked="" type="checkbox"/> Disponible <input checked="" type="checkbox"/> Faible coût
Inconvénients /Contraintes : * Technique	<input checked="" type="checkbox"/> Difficile <input type="checkbox"/> Longue <input type="checkbox"/> Contraignante <input type="checkbox"/> Coût moyen
Apport au diagnostic : Indispensable	<input checked="" type="checkbox"/> Examen d'orientation <input checked="" type="checkbox"/> Examen de confirmation * Sensibilité : 1 2 3 4 5 (de - à +) * Spécificité : 1 2 3 4 5 (de - à +)
Contrôle qualité : Oui	<input checked="" type="checkbox"/> Technique manuelle (qualité de la réalisation technique) <input type="checkbox"/> Technique automatisée (contrôle de qualité du matériel et des résultats)
Niveau de technicité requis : Assez élevé	* Niveau : 1 2 3 4 5 (de - à +)
Coûts des examens : Modéré	Matériel : <input checked="" type="checkbox"/> Bas <input type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé Temps passé : <input type="checkbox"/> Bas <input checked="" type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé Prix des réactifs : <input checked="" type="checkbox"/> Bas <input type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé
Elimination des déchets avec les DASRI :	<input checked="" type="checkbox"/> Oui - spécimens, milieux de culture colorants, matériel de pipetage <input type="checkbox"/> Non
Hygiène et sécurité : * Risque infectieux	* Risque : 1 2 3 4 5 (de - à +)

F. ANTIBIOGRAMMES APPLIQUÉS AUX GERMES DE MAMMITES BOVINES ET RÉALISABLES EN ESV



Olivier Salat

Cette fiche apporte une expérience rigoureuse d'analyse bactériologique ciblée (avec focus sur la réalisation d'antibiogrammes par la méthode des disques) dans un ESV (2eme partie).

QUELLES TECHNIQUES ?

Il existe essentiellement 3 méthodes pour établir un profil d'antibiorésistance d'un germe ou tester sa sensibilité aux antimicrobiens :

- la méthode de diffusion en gélose dite « méthode des disques »,
- la méthode de micro-dilution en gélose qui permet la détermination précise de concentration minimale inhibitrice,
- la recherche directe de gènes d'antibiorésistance par techniques de biologie moléculaire.

Seule la méthode des disques est envisageable actuellement à l'échelle de l'ESV. C'est également encore la méthode considérée comme celle de référence en France.

1. PRÉALABLES INCONTOURNABLES À LA RÉALISATION D'ANTIBIOGRAMMES PAR LA MÉTHODE DES DISQUES DANS UN ÉTABLISSEMENT DE SOINS VÉTÉRINAIRES :

- point de départ indispensable : culture pure du germe à tester,
- application stricte de la norme NF U47-107

2. MATÉRIEL NÉCESSAIRE

- étuve et petits matériels (ampoule de sérum physiologique, écouvillons),
- milieux adaptés :
 - ◇ Mueller-Hinton simple pour les staphylocoques, les entérobactéries et les entérocoques,
 - ◇ Mueller-Hinton au sang pour les streptocoques
- outils de mesure de la densité bactérienne de l'inoculum
 - ◇ densitomètre
 - ◇ milieux étalons de Mac Farland
- disques d'antibiotiques (essentiellement bêta lactamines, macrolides, aminosides, sulfamides et diaminopyrimidines, quinolones)
- souches de référence pour autocontrôles réguliers

3. CHOIX DES DISQUES

Il doit être fait selon l'ordre prioritaire suivant :

- tout d'abord, favoriser l'expression d'une résistance
- ensuite, être représentatif (quand c'est possible) d'une famille d'antibiotiques
- enfin, être utilisé en pratique courante (les disques de spécialités antibiotiques réservées à la médecine humaine ne doivent pas être utilisés).

Pour des géloses rondes classiques, un maximum de 6 disques est utilisable, ce qui est largement suffisant en fonction de l'objectif recherché et des données disponibles d'extrapolation de ces résultats in vitro pour le traitement des mammites bovines.

4. DES LIMITES ?

- la technique des disques n'est pas adaptée à la détermination de la sensibilité des streptocoques à la pénicilline ;
- la technique des disques n'est pas adaptée à la détermination de la sensibilité des colibacilles à la colistine ;
- le test à la céfinase est complémentaire de la méthode des disques pour déterminer la sensibilité des staphylocoques à la pénicilline, surtout ceux dont la résistance est inducible, (information capitale dans la gestion des infections mammaires bovines) mais il ne peut seul déterminer ou non cette sensibilité ;
- la méthode des disques est bâtie sur une extrapolation (lien entre diamètre d'inhibition et concentration d'antibiotique).

Cela a 2 conséquences majeures :

- ◇ la méthode de microdilution en gélose est plus précise car elle détermine des CMI, information plus pertinente qu'un caractère sensible ou résistant,
- ◇ on ne peut aboutir à une information fiable que si on respecte parfaitement le protocole d'analyse précisé par la norme NF U47-107.

5. MAIS AUSSI DES INTÉRÊTS

- mise en évidence des staphylocoques et streptocoques à résistance inducible aux macrolides par juxtaposition des disques d'érythromycine et de clindamycine (forme en D caractéristique) ;
- images en bouchon de champagne autour du disque d'amoxicilline-acide clavulanique pour la détection des colibacilles BLSE ;
- recherche de souches de staphylocoques à résistance inducible à la pénicilline (par test à la céfinase sur les souches récoltées à la limite d'inhibition du disque à la céfoxitine pour *Staphylococcus aureus* et du disque oxacilline pour les staphylocoques non aureus).

6. QUE PEUT-ON EN TIRER ?

- se méfier des extrapolations résultats in vitro – in vivo (interaction majeure avec la pharmacocinétique lors d'infections mammaires),
- très peu d'études ont pu établir un lien entre sensibilité in vitro et amélioration des résultats thérapeutiques sur le terrain. Pour les infections mammaires bovines, ces données existent pour :
 - ◇ la pénicilline et *Staphylococcus aureus*
 - ◇ la céfapirine et les streptocoques
 - ◇ l'association sulfamide-triméthoprime et les colibacilles
- ainsi le nombre de disques pour lesquels une information peut être utile est limité (pour ce qui est des infections mammaires).

7. ALORS, ON FAIT QUOI ?

- **l'antibiogramme par la méthode des disques a plus d'un intérêt dans la maîtrise des infections mammaires :**
 - ◇ pouvoir déterminer les souches potentiellement pathogènes en santé publique (SARM et colibacilles BLSE)
 - ◇ établir un profil d'antibiotypie des souches du même germe circulant dans l'élevage
 - ◇ établir un pronostic de guérison
 - ◇ orienter intelligemment un traitement antibiotique
- **mais il doit absolument être réalisé selon le protocole édicté par la norme 47-107 pour que ses résultats puissent être utilisés,**
- **il doit aussi être interprété par un vétérinaire clinicien expert des infections mammaires, seul capable d'en tirer les informations utiles.**

L'ANTIBIOGRAMME APPLIQUÉ AUX GERMES DE MAMMITES BOVINES

Objectifs : * par la méthode de diffusion en gélose « Méthode des disques » * sur une culture pure du germe à tester	* Identifier la sensibilité du germe aux familles d'antibiotiques utilisés en pratique vétérinaire * Favoriser l'expression d'une résistance
Indication : * Examen entrant dans l'offre de services d'un ESV spécialisé en production laitière	<input type="checkbox"/> Indispensable <input checked="" type="checkbox"/> Utile (Très) <input type="checkbox"/> En urgence au chevet de l'animal <input checked="" type="checkbox"/> Dans un délai rapide pour poser un diagnosti
Avantages : * Utilisation	<input type="checkbox"/> Facile <input checked="" type="checkbox"/> Rapide <input checked="" type="checkbox"/> Disponible <input checked="" type="checkbox"/> Faible coût
Inconvénients/Contraintes : * limites liées à la «méthode des disques» * selon la procédure de la norme NF U47-107	<input checked="" type="checkbox"/> Difficile <input type="checkbox"/> Longue <input type="checkbox"/> Contraignante <input type="checkbox"/> Coût moyen
Apport au diagnostic : Indispensable	<input checked="" type="checkbox"/> Examen d'orientation <input checked="" type="checkbox"/> Examen de confirmation * Sensibilité : 1 2 3 4 5 (de - à +) * Spécificité : 1 2 3 4 5 (de - à +)
Contrôle qualité : Oui	<input checked="" type="checkbox"/> Technique manuelle (qualité de la réalisation technique) <input type="checkbox"/> Technique automatisée (contrôle de qualité du matériel et des résultats)
Niveau de technicité requis : Moyen	* Niveau : 1 2 3 4 5 (de - à +)
Coûts des examens : Modéré	Matériel : <input checked="" type="checkbox"/> Bas <input checked="" type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé Temps passé : <input type="checkbox"/> Bas <input checked="" type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé Prix des réactifs : <input checked="" type="checkbox"/> Bas <input type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé
Elimination des déchets avec les DASRI :	<input checked="" type="checkbox"/> Oui - spécimens, milieux de culture colorants, matériel de pipetage <input type="checkbox"/> Non
Hygiène et sécurité : * Risque infectieux	* Risque : 1 2 3 4 5 (de - à +)

G. LES ANALYSES SÉROLOGIQUES



Véronique Bachy

Cette fiche décrit les principes et particularités analytiques puis les étapes pré-analytiques des analyses sérologiques. Le choix des analyses à réaliser et les étapes pré-analytiques, du prélèvement à l'expédition au laboratoire, conditionnent la qualité des résultats et leur fiabilité clinique.

L'envoi au laboratoire spécialisé de biologie vétérinaire est indispensable pour obtenir des résultats analytiques quantitatifs certifiés.

Dans certains cas, l'utilisation correcte des tests rapides permet de disposer de résultats qualitatifs ou semi quantitatifs utiles au chevet de l'animal.

OBJECTIF

Recherche d'anticorps (IgG et IgM) dans des échantillons biologiques.

1. PRINCIPE

Mise en évidence de la présence d'anticorps, en général d'IgM et d'IgG en diagnostic de routine vétérinaire, de façon qualitative, semi-quantitative ou quantitative, en fonction de la technique utilisée, à partir de liquides biologiques de nature variée prélevés sur animal vivant ou, beaucoup plus rarement, en post-mortem.

2. PARTICULARITÉS ANALYTIQUES

- L'analyse sérologique peut être réalisée au chevet de l'animal, dans les ESV, lorsqu'elle met en œuvre les techniques d'immunomigration/immunochromatographie (tests rapides), donnant des résultats qualitatifs, ou, plus rarement, semi-quantitatifs.
- L'analyse sérologique mettant en jeu les techniques d'ELISA, d'immunofluorescence indirecte, de Western-Blot, de séroneutralisation, d'inhibition de l'hémagglutination, de microagglutination, doit être réalisée dans des laboratoires d'analyse spécialisés, nécessitant des locaux dédiés et sécurisés ainsi que du matériel spécifique. Ce sont ces laboratoires qui sont responsables de la qualité des résultats. Dans le cas de ces techniques spécialisées, la gestion de la qualité par les ESV se limite à celle des étapes pré-analytiques et est essentielle pour l'analyse ultérieure.

2.1. ETAPES PRÉ-ANALYTIQUES

A. COLLECTE DES SPÉCIMENS : LA QUALITÉ DU RÉSULTAT DÉPEND

- des précautions environnementales : respecter, quand cela est possible, les mesures d'hygiène classiques (préparation de la zone de prélèvement, nettoyage des mains, ports de gants à usage unique ...),
- du matériel de prélèvement utilisé,
 - ◇ à usage unique,
 - ◇ stérile,
 - ◇ tube sec pour le sérum, les liquides d'épanchement, le LCR,
 - ◇ la présence d'activateurs de la coagulation, billes ou gel séparateur dans le tube sec est acceptable

pour l'obtention du sérum (attention, les billes ou les activateurs de coagulation interfèrent avec l'analyse cytologique, ils doivent être réservés à l'analyse sérologique),

◇ jamais d'EDTA dans le tube, la seringue ou le flacon.

- Des modalités de prélèvement

A PROSCRIRE

- les désinfectants/antiseptiques en contact direct avec le liquide biologique,
- les fixateurs (formol ou autre),
- le mélange par le préleveur de sérums de différents animaux,
- les aiguilles dans les tubes contenant les liquides biologiques soumis à analyse,
- l'envoi de sang total non centrifugé avant envoi, notamment si le transport ne s'effectue pas à température contrôlée entre 2 et 8°C. En effet, la lyse des hématies pendant le transport génère un sérum hémolysé, qui interfère avec la qualité de la plupart des analyses sérologiques. Une centrifugation du sang total et prélèvement du sérum uniquement sont toujours recommandés (10 minutes à 1500g),
- le sang total sur tube sec ne doit jamais être congelé

A VALIDER AVEC LE LABORATOIRE

Tout ajout de liquide (nature, volume) pouvant modifier le titre sérologique.

RECOMMANDÉ

production des IgM demande environ 5 à 7 jours et celle des IgG environ 15 jours.

- si le prélèvement est réalisé en tout début d'évolution (moins de 6 jours), alors la réalisation d'une cinétique sérologique est nécessaire (cinétique à 15 jours la plupart du temps, jusqu'à 6 semaines pour certains agents pathogènes, à valider avec le laboratoire),
- une cinétique sérologique est toujours intéressante et la séroconversion permet d'objectiver une infection récente, plutôt qu'une trace de contact ancien,
- prendre en compte le fait qu'un chiot ou un chaton peut présenter des anticorps d'origine maternelle jusqu'à 3 mois et un poulain sous la mère ou un veau jusqu'à 6 mois environ

B. CONSERVATION DES SPÉCIMENS AVANT ENVOI AU LABORATOIRE SPÉCIALISÉ

A PROSCRIRE

- exposition directe à la lumière, à la chaleur,
- congélation du sang total,
- ajout de formol,

RECOMMANDÉ

- centrifugation (10 minutes à 1500g) puis collecte du sérum dans les 4h suivant le prélèvement (à défaut, coagulation pendant 30 minutes à 2h puis prélèvement du sérum après décantation),
- réfrigération en attente de l'envoi (le titre en anticorps reste stable environ 7 jours de 2 à 8°C sur sérum et liquides d'épanchement),
- congélation pour le sérum qui ne peut pas être expédié sous 48h

C. EXPÉDITION VERS LE LABORATOIRE

- matière infectieuse de catégorie B (UN3373), bien que le sérum contienne en général moins d'agents pathogènes que certains tissus,
- triple emballage requis pour protéger les spécimens et absorber la totalité des liquides en cas de casse,
- expédition rapide et suivie (Chronopost, TNT ...) à température contrôlée de 2 à 8°C (pain de glace le cas échéant), le transport à température ambiante reste possible mais est moins recommandé.

2.2. ETAPES ANALYTIQUES POUR LES TESTS SÉROLOGIQUES POUVANT ÊTRE EFFECTUÉS EN ESV

(Tests rapides par Immunomigration / immunochromatographie)

A PROSCRIRE

- utilisation d'un lot périmé, sauf si autorisation exceptionnelle du fournisseur,
- utilisation d'un lot non conservé à la température recommandée avant utilisation,
- non respect des recommandations techniques précises du fournisseur,
- travail à température non contrôlée, exposition forte à la lumière, à la chaleur ou au froid <15 °C la température ambiante doit être comprise entre 15 et 25 °C,
- travail sur une surface non plane,
- manipulation manuelle du dispositif pendant la migration et le temps d'incubation,
- utilisation de sérums ou plasmas très hémolysés,
- non vérification de la validité des contrôles internes du test

RECOMMANDÉ

- toujours respecter scrupuleusement les recommandations du fournisseur,
- pour les kits conservés entre +2 et +8°C, ramener le dispositif à température ambiante selon les recommandations du fournisseur,
- utilisation de sérum, plasma hépariné ou sang total, selon les recommandations du fournisseur,
- respecter les volumes de sang ou de sérum à déposer (l'achat d'une pipette peut être recommandé si nécessaire) ; l'utilisation d'un volume trop faible ou trop important interfère de manière directe avec la qualité des résultats,
- respecter le temps d'incubation, à vérifier au chronomètre dans la mesure du possible - un temps de migration ou d'incubation trop court ou trop long avant lecture interfère notablement avec les résultats,
- vérifier les contrôles internes et respecter la règle d'interprétation donnée par le fournisseur,
- en cas de doute sur la lecture et l'interprétation, valider avec l'équipe technique du fournisseur

POUR EN SAVOIR PLUS :

Markey B., Leonard F, Archambault M., Cullinane A., Maguire D., Serological Diagnosis, in Clinical Veterinary Microbiology Second Edition, Mosby Elsevier, 2013, Chapter 3, p.49-58

(Référence bibliographique de base)

<https://tools.cofrac.fr/documentation/LAB-GTA-27> : Guide COFRAC

H. LES ANALYSES PCR *



Corine Boucraut-Baralon

Cette fiche décrit les principes et conditions pré-analytiques d'utilisation de ces analyses.

Le lecteur peut trouver les indications de ces analyses dans la fiche 3.7.3. « Analyse bactériologique en laboratoire : l'existant et le futur ».

Un encadré apporte la description des principes analytiques de la technique PCR.

OBJECTIFS

- Détection et caractérisation d'agents infectieux (quantification, typage de souches...)
- Analyses génétiques (détection de mutations ou autres polymorphismes génétiques, ie détection de gènes de virulence, ou d'antibiorésistance).

*PCR = **Polymerase Chain Reaction**

1. PRINCIPE

Mise en évidence de fragments de génomes, quantification et éventuellement caractérisation (souches, détection de mutations) à partir de spécimens de nature variée prélevés sur animal vivant ou en post-mortem.

2. PARTICULARITÉS ANALYTIQUES

La PCR ne peut être actuellement réalisée que dans des laboratoires d'analyse spécialisés, nécessitant des locaux dédiés et sécurisés ainsi que du matériel spécifique. Ce sont ces laboratoires qui sont responsables de la qualité des résultats. Par conséquent, la gestion de la qualité par les ESV se limite à celle des étapes pré-analytiques et est essentielle pour l'analyse ultérieure.

Lorsqu'ils sont quantitatifs, les résultats de PCR sont exprimés en nombre de copies de séquence cible / analyse ou par volume de spécimen ce qui implique l'intégration d'une gamme étalon. Les résultats parfois donnés sous forme de Ct (Cycle threshold ou cycle seuil) permettent une estimation semi-quantitative, sans gamme étalon ; il n'est pas possible de comparer les résultats de Ct d'analyses effectuées sur des séries d'analyse différentes car les Ct dépendent des conditions d'analyse et de réglage des seuils de positivité.

[NB : Des techniques moléculaires alternatives, différentes de la PCR (amplification isotherme), sont disponibles depuis peu pour une utilisation en clinique vétérinaire. Il existe peu de données indépendantes publiées sur les performances de ces tests dans les conditions d'utilisation recommandées. Les conditions pré-analytiques décrites dans cette fiche ne sont valides que pour les analyses PCR].

La qualité du résultat dépend d'une réalisation performante des étapes pré-analytiques :

2.1. COLLECTE DES SPÉCIMENS

- des précautions environnementales (au minimum nettoyage des mains à l'eau savonneuse avant le prélèvement, port de gants à usage unique recommandé),
- du matériel de prélèvement utilisé
 - ◇ à usage unique,

- ◇ tube EDTA pour le sang ou la moelle osseuse, tube sec ou EDTA pour les fluides et les cytoponctions; tube sec pour les biopsies et les raclages cutanés,
- ◇ utilisation d'écouvillons coton ou de cytobrosses stériles,
- ◇ jamais d'héparinate de lithium dans les contenants même sous forme de trace : bille retirée, tube rincé...);
- des modalités de prélèvement (à adapter à la nature du ou des spécimens prélevés)

À PROSCRIRE

- Les désinfectants/antiseptiques en contact direct avec le spécimen
- Les fixateurs (formol ou autre) pour les tissus
- Les écouvillons conditionnés dans une gélose (perte de matériel biologique, sensibilité moindre)
- Le mélange par le préleveur de spécimens destinés à être analysés en pool
- Le transfert du spécimen d'un tube à un autre contenant (le tube primaire peut ne pas convenir)
- Les lames de scalpel, aiguilles dans les tubes contenant les spécimens

À VALIDER AVEC LE LABORATOIRE

- Tout ajout de liquide (nature, volume)
- Utilisation des anesthésiques locaux, collyres à la fluorescéine (possible si le test a été validé en présence de ces milieux)

RECOMMANDÉ

- Faire le prélèvement en début d'évolution clinique et avant la mise en place de traitements spécifiques (antibiotiques, anti-viraux...)
- Faire plusieurs prélèvements (localisations multiples, sur plusieurs jours...) selon l'indication (recherche d'agents infectieux) – Validation des spécimens à prélever en fonction des signes cliniques/durée d'évolution/âge de l'animal auprès du laboratoire
- Utilisation de stabilisateurs de type DNA Shield™ ou RNA later™ si conservation sur le long terme (plusieurs semaines).

2.2. CONSERVATION DES SPÉCIMENS AVANT ENVOI

La PCR est peu sensible aux conditions de stockage des spécimens sur des périodes courtes, la viabilité des agents infectieux n'étant pas nécessaire pour l'analyse.

A PROSCRIRE

- exposition directe à la lumière, à la chaleur
- congélation du sang
- congélation des fluides (LCR, humeur aqueuse) sauf si l'expédition est réalisée à température négative
- la fixation des tissus

RECOMMANDÉ

- réfrigération en attente de l'envoi (max 1 semaine pour sang, épanchements, écouvillons) – NB : jusqu'à 1 mois à température ambiante (max 25°C) en présence d'un stabilisateur.
- congélation pour les tissus qui ne sont pas expédiés dans les 48h ou les écouvillons conservés plus d'une semaine.

2.3. EXPÉDITION VERS LE LABORATOIRE :

SPÉCIMENS NON STABILISÉS

- matière infectieuse de catégorie B (UN 3373),
- triple emballage requis pour protéger les spécimens et absorber la totalité des liquides en cas de casse,
- expédition rapide et suivie (Chronopost...) à température ambiante

SPÉCIMENS STABILISÉS

- Considérés comme non infectieux et stables à température ambiante sur plus d'un mois.

POUR EN SAVOIR PLUS

Fiche .3.7. C : Analyse bactériologique en laboratoire, l'existant et le futur § 3