

EXPERTISE ET DIAGNOSTIC

Par Marie-Lou Gauthier m.v., microbiologiste, MAPAQ

Il était une fois... ou l'importance de l'anamnèse

La soumission d'échantillons au laboratoire de bactériologie est un élément important dans la démarche diagnostique pour bien des situations cliniques, afin de confirmer ou infirmer l'implication de certains agents infectieux dans les processus pathologiques observés. Bien qu'il s'agisse d'une démarche courante, il n'en demeure pas moins important de **bien compléter les requêtes du laboratoire**, et ce afin de maximiser la pertinence et l'utilisation qui pourra être faite des résultats.

Dans les laboratoires du Service de diagnostic de la Faculté de médecine vétérinaire de même que dans les laboratoires du MAPAQ (Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec), des médecins vétérinaires microbiologistes sont disponibles pour vous conseiller dans toutes les étapes du processus de soumission d'échantillons, de la sélection des analyses appropriées pour un certain prélèvement jusqu'à l'interprétation des résultats obtenus. Le bactériologiste vétérinaire peut également aider, dans plusieurs situations, à faire la différence entre un échantillon contaminé, la présence de flore indigène au site prélevé, un processus infectieux polymicrobien ou un agent pathogène possiblement impliqué dans le processus clinique. **Une courte liste des bactéries que vous suspectez ou tenez d'exclure peut s'avérer très utile afin de bien cibler les recommandations quant aux choix de l'analyse, des milieux de culture à utiliser, des températures et atmosphères d'incubation, etc.** Des contraintes de laboratoire existent en ce qui concerne la croissance de certains microorganismes et parfois relativement au type d'échantillon soumis. En voici quelques exemples :

Histophilus somni

Bien que cette bactérie puisse pousser sur les milieux usuels utilisés en laboratoire, sa croissance est favorisée par l'utilisation de milieux enrichis (géloses chocolat). La sélection d'une analyse particulière sur les requêtes du laboratoire permet l'utilisation de milieux de culture adéquats.

Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP/paratuberculose)

Cette bactérie est fastidieuse, nécessite plusieurs semaines d'incubation pour croître et nécessite également des milieux spéciaux. Les analyses d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ont largement remplacé la culture pour le diagnostic de cette condition avec une sensibilité et spécificité similaire tout en permettant d'obtenir les résultats beaucoup plus rapidement.¹ La détection de la bactérie dans des prélèvements environnementaux est également possible à l'aide de cette technique.² Pour le diagnostic individuel, il est cependant important de se rappeler que la détection de la présence de la bactérie par PCR ne peut se faire uniquement qu'à partir du moment où

l'animal excrète la bactérie. Une analyse sérologique par méthode ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) est également possible sur du sérum pour le diagnostic individuel, préférablement lorsque la prévalence dans le troupeau est élevée. Cela dit, ce type d'analyse est moins sensible qu'une analyse par culture ou PCR.³ Cette méthode peut également être utilisée pour le dépistage de troupeau.

E. coli

Cette bactérie n'est pas fastidieuse et l'isoler en culture est chose commune. Cependant, lorsqu'elle est recherchée dans des échantillons provenant du tube digestif, il est nécessaire de faire la recherche de facteurs de virulence afin d'identifier les souches potentiellement pathogènes. La flore indigène digestive comporte plusieurs populations d'*E. coli* commensaux et la distinction entre ces souches est impossible avec la culture seule. Des méthodes génétiques telles la PCR ou le séquençage sont nécessaires afin de démontrer la présence de facteurs de virulence.

Salmonella spp (incluant *S. Dublin*)

Lorsqu'une salmonelle est recherchée, des milieux de culture sélectifs et différentiels doivent être utilisés lors de soumission d'échantillons refermant une flore bactérienne abondante, par exemple des matières fécales. Dans le cas particulier des échantillons d'environnement, différentes étapes d'enrichissement s'ajoutent également à la technique afin d'en augmenter la sensibilité, si les bactéries ont été altérées par la dessiccation, les désinfectants, etc.

Les cas de recherche de *Salmonella* Dublin sont particuliers. En effet, cette bactérie, contrairement aux autres sérotypes de salmonelle fréquemment retrouvés en médecine vétérinaire, ne pousse pas très bien sur les différents milieux sélectifs utilisés pour faciliter l'isolement des salmonelles. Lorsqu'un échantillon normalement stérile est soumis tel un organe, la culture est un moyen fiable de mettre la bactérie en évidence, mais dès qu'il est question d'échantillons contenant une flore bactérienne abondante, d'autres méthodes diagnostiques doivent être envisagées. Lorsque l'animal excrète la bactérie, la PCR peut devenir une méthode utile dans le diagnostic et des PCR spécifiques à *S. Dublin* existent.⁴ Des analyses sérologiques sont également possibles sur du lait individuel, du sérum et du lait de réservoir pour le dépistage de troupeau, mais plusieurs limitations existent quant à l'interprétation des résultats de ces analyses.⁵

Cette liste n'est pas exhaustive et plusieurs autres microorganismes ont des besoins particuliers au niveau de leur croissance, n'hésitez pas à contacter le laboratoire pour plus d'information. Au-delà des bactéries recherchées, certaines contraintes de laboratoire existent relativement à la nature des différents types d'échantillons soumis. Voici certains éléments à considérer pour quelques-uns des types d'échantillons fréquemment soumis au laboratoire :

Lait de réservoir

Selon les normes du NMC (National Mastitis Council), lors de la culture d'échantillon de lait individuel, un échantillon contenant 3 espèces bactériennes différentes ou plus est considéré contaminé.⁶ Lors de demande de culture sur un lait de réservoir, l'application de ce critère résulte presque en tout temps en l'émission d'un résultat de lait contaminé. Il est donc important de cibler les agents pathogènes à rechercher.

Les agents bactériens les plus souvent recherchés dans du lait de réservoir sont : *Mycoplasma bovis* et en raison de leur potentiel zoonotique : *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* et *Campylobacter* spp. Pour les agents zoonotiques, lorsqu'il est question de cas impliquant la santé publique, des analyses par culture sont préférées aux analyses par PCR afin de confirmer la présence de bactéries viables dans l'échantillon. Cependant, étant donné que le lait de réservoir représente un échantillon très dilué par rapport à un échantillon de lait individuel, des mesures additionnelles doivent être prises au laboratoire afin d'optimiser la sensibilité des analyses. Entre autres, un plus grand volume de lait est nécessaire (environ 200 ml selon les laboratoires), davantage de procédures d'enrichissement sont employées et les analyses sont parfois réalisées en plusieurs essais en parallèle. Un autre type d'analyse peut également être effectuée sur les échantillons de lait de réservoir afin d'obtenir un comptage pour différentes familles ou genres bactériens, par exemple des comptages d'entérobactéries, de coliformes totaux, de staphylocoques ou de streptocoques. La présence de *Staphylococcus aureus* et de *Streptococcus agalactiae* peut également être mise en évidence lors de ces comptages. Dans ces cas, des milieux spéciaux sélectifs pour ces différentes bactéries doivent être utilisés et un volume différent de lait doit être ensemencé comparativement à une culture de lait de routine.⁷

Fèces

Une bactériologie de routine utilisant des milieux non sélectifs et non différentiels sur des matières fécales n'est pas recommandée et fournit des résultats qui sont malheureusement difficiles à interpréter étant donné la flore bactérienne abondante se trouvant normalement dans le tube digestif. Une recherche d'agents pathogènes spécifiques est généralement recommandée dans ces situations, par exemple : recherche de *Salmonella*, *E. coli* avec facteurs de virulence, *Campylobacter*, MAP, etc.

Environnement

Lors de soumission d'échantillons provenant de l'environnement au laboratoire, il est primordial de savoir ce qui est recherché. Il n'est pas anormal de retrouver une variété importante de microorganismes dans l'environnement et sur certaines surfaces.

Pour être en mesure de se prononcer sur la présence d'un agent infectieux en particulier, des milieux d'enrichissement et des milieux sélectifs doivent parfois être utilisés. Pour ce type d'échantillon, il est préférable de contacter le laboratoire à l'avance afin de discuter des options, comprendre les limitations qui peuvent s'appliquer dans certains cas, etc. Par exemple, dans certaines situations, une culture positive sur un prélèvement d'environnement peut confirmer la présence de la bactérie dans l'échantillon, mais une culture négative n'est pas assez sensible pour conclure en son absence. Ces éléments sont à prendre en considération dans l'interprétation des résultats.

Références :

1. Sweeney, R.W., M.T. Collins, A.P. Koets, S.M. McGuirk, and A.J. Roussel. ACVIM Consensus Statement : Paratuberculosis (Johne's Disease) in Cattle and Other Susceptible Species. *J Vet Intern Med* 2012;26:1239-1250.
2. Aly, S.S., R.J. Anderson, R.H. Whitlock, T.L. Fyock, S. McAdams, J.M. Adaska, J. Jiang, and I.A. Gardner. Reliability of environmental sampling to quantify *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis on California free-stall dairies. *J. Dairy Sci* 2009;92:3634-3642.
3. Clark, D.L. Jr., J.J. Koziczowski, R.P. Radcliff, R.A. Carlson, and J.L.E. Ellingson. Detection of *Mycobacterium avium* Subspecies paratuberculosis: Comparing Fecal Culture Versus Serum Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Direct Fecal Polymerase Chain Reaction. *J. Dairy Sci* 2008;91:2620-2627.
4. Persson, S., T. Jacobsen, J.E. Olsen, K.E.P. Olsen, and F. Hansen. A new real-time PCR method for the identification of *Salmonella* Dublin. *Journal of Applied Microbiology* 2012;113:615-621.
5. Nielsen, Liza Rosenbaum. Review of pathogenesis and diagnostic methods of immediate relevance for epidemiology and control of *Salmonella* Dublin in cattle. *Veterinary Microbiology* 2013;162:1-9.
6. Adkins, P.R.F., J.R. Middleton, L.K. Fox, G. Pighetti, and C. Petersson-Wolfe. National Mastitis Council (U.S.). *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*. Third ed. New Prague: National Mastitis Council; 2017.
7. En coll. Using Bulk Tank Milk Cultures in a Dairy Practice. National Mastitis Council. <https://www.nmconline.org/wp-content/uploads/2016/09/Using-Bulk-Tank-Milk-Cultures-in-a-Dairy-Practice.pdf>



Bref, plusieurs éléments sont à prendre en considération lorsque vient le moment de soumettre un échantillon au laboratoire. Quel échantillon serait le plus approprié selon le contexte, dans quelles conditions le conserver jusqu'à son envoi, quel milieu de transport utiliser, quelles analyses demander, etc. Le médecin vétérinaire microbiologiste représente un allié dans le choix de ces différents éléments.

Prendre quelques minutes pour indiquer sur la requête du laboratoire quels sont les signes cliniques de l'animal, quel est le diagnostic différentiel ou les agents infectieux recherchés ou à exclure peut permettre de mieux cibler les analyses à effectuer. Il est ainsi possible de sauver des coûts en optimisant les chances d'obtenir une information utile au diagnostic à la suite de l'analyse et ainsi éviter les reprises si les résultats obtenus ne correspondent pas aux besoins. Une requête de laboratoire bien remplie est donc le point de départ qui aidera le laboratoire à mieux vous aider!