

compte rendu

Intérêts et limites de la PCR pour le diagnostic des mammites des vaches laitières

Laurent MASCARON

Correspondant en infectiologie et vaccinologie
Courriel : l.mascaron@orange.fr

ANALYSE

L'utilisation de la PCR* pour le diagnostic bactériologique des mammites offre l'avantage d'une grande sensibilité et de résultats disponibles rapidement, en comparaison avec la culture bactérienne. Malgré ses attraits, la PCR apparaît plus comme un outil pédagogique auprès de l'éleveur concernant ses bonnes pratiques que comme un test diagnostique de routine.

Bernard Poutrel, directeur de recherche honoraire à l'Inrae**, et notre consœur Ivanne Leperlier (GDS*** Bretagne), ont fait le point, lors des Journées nationales des GTV**** 2019, sur l'intérêt de la PCR, ses limites et ses indications, au niveau des laits de quartier et de mélange comme sur le lait de tank.

Une offre large et séduisante

« L'identification des pathogènes impliqués dans les mammites est souvent utile, que ce soit à des fins thérapeutiques ou pour confirmer un modèle épidémiologique dans le troupeau, soit contagieux, soit environnemental. Même si la culture bactérienne reste la méthode de référence, l'analyse de prélèvements de lait par PCR est une pratique tentante, compte tenu de sa sensibilité, de la rapidité d'obtention des résultats et de modalités



▲ La PCR nécessite une asepsie parfaite lors de la réalisation des prélèvements : au-dessus de deux pathogènes différents mis en évidence, les résultats sont ininterprétables.

moins contraignantes d'acheminement au laboratoire et de conservation des échantillons », a déclaré Bernard Poutrel (voir tableau).

En comparaison avec la PCR, le manque de sensibilité de la méthode de référence (mise en culture d'un prélèvement aseptique de lait sur géloses au sang pendant 24 à 48 heures, puis identification des colonies bactériennes par différents tests) est le plus souvent dû à un *inoculum* trop faible ou, lors de mammites aigües à coliformes, à une réaction inflammatoire intense avec recrutement massif de polynucléaires, qui limite le nombre de bactéries dans le lait.

La PCR est une technique, conçue dans les années 1980, qui a pour finalité d'augmenter le nombre de copies d'un segment cible d'acide nucléique (ADN ou ARN) afin de permettre sa détection.

Plus l'échantillon est riche en séquences cibles, moins il faudra de cycles d'amplification pour atteindre un signal fluorescent significativement supérieur au bruit de fond (principe de la PCR quantitative en temps réel).

Cette amplification explique la sensibilité des techniques PCR : quelques copies de l'acide nucléique cible génèrent en quelques heures plusieurs milliards de fragments identiques.

Depuis la commercialisation des premiers kits de recherche de pathogènes par PCR en médecine vétérinaire, dans les années 1990, les trousses actuellement disponibles pour le diagnostic des mammites permettent d'identifier au laboratoire jusqu'à quinze espèces ou groupes bactériens différents dans un prélèvement de lait.

Diagnostic des mammites

L'utilisation de la PCR offre de nombreux avantages :

- identifier des pathogènes en quelques heures, ce qui peut permettre au praticien d'intervenir plus efficacement en ayant connaissance de ceux-ci ;
- elle peut être réalisée sur du lait frais ou congelé ou contenant un conservateur, ce qui ne rend pas nécessaire le transport de l'échantillon sous froid.

« Le seuil de détection est de 2 à 4 bactéries/ml de lait contre un peu moins de 100 bactéries/ml pour la culture bactérienne ; la PCR détecte à la

Conférenciers



Ivanne LEPELIER
Vétérinaire conseil et référent santé de la mamelle
GDS Bretagne



Bernard POUTREL
Directeur de recherche honoraire
Inrae

fois les bactéries viables et non-viables, ce qui ne facilite pas toujours l'interprétation des résultats après traitement », fait remarquer Bernard Poutrel.

« Sa très grande sensibilité peut aussi entraîner certaines difficultés d'interprétation des résultats. La PCR exige en particulier une asepsie parfaite lors de la réalisation des prélèvements : au-dessus de deux pathogènes différents mis en évidence, les résultats sont ininterprétables car il y a une très forte probabilité que l'échantillon ait été contaminé par des bactéries présentes dans l'environnement », a précisé Bernard Poutrel.

« Les agents pathogènes responsables de mammites peuvent être identifiés par PCR dans le lait de tank, à condition que l'analyse soit fréquente et répétée. La PCR sur lait de tank peut faciliter la mise en évidence de pathogènes à localisation intramammaire (*Streptococcus agalactiae*, *mycoplasmes*) ou présentant un risque en santé publique (*Listeria*, *salmonelles*...). En clientèle la culture bactérienne doit être préférée pour les laits de quartiers, en raison d'une interprétation plus facile des résultats, à condition d'utiliser pour la culture sur gélose un inoculum suffisant (50 à 100 µl) ; en cas de résultats stériles, notamment lors de suspicion de coliformes, la culture dans un bouillon d'enrichissement de 1 ml de lait s'impose pour éclairer le diagnostic bactériologique des mammites », a conclu Bernard Poutrel.

Laits de mélanges

Notre consœur Ivanne Leperlier a présenté son expérience terrain et celle de l'équipe de conseillers spécialisés sur les mammites avec laquelle elle agit sur demande des éleveurs adhérents.

AVANTAGES COMPARÉS DE LA PCR ET DE LA CULTURE BACTÉRIENNE POUR L'IDENTIFICATION DES PATHOGÈNES DE MAMMITES

Critères	PCR	Culture bactérienne
Facilité de conservation et de transport des échantillons de lait	++++ (fiable sur échantillons congelés)	++
Rapidité de l'identification	++++ (3-4 heures)	++ (48-72 heures)
Sensibilité	++++	+++
Spécificité	+++	++++
Interprétation des résultats	++	++++

▲ L'analyse PCR est tentante, compte tenu de sa sensibilité et de la rapidité d'obtention des résultats.



compte rendu (suite)

« Le GDS intervient sous forme d'audit de traite en situation dégradée lors de pénalités pour cause de cellules ou de flambées de mammites cliniques. En maladie de troupeau, l'épidémiologie est l'élément clé pour avoir une idée précise de la situation : gravité, origine et dynamique des infections. Même si la culture bactérienne reste l'analyse bactériologique de référence, elle présente des inconvénients importants en termes de délai d'obtention des résultats et de coût, qui limite le nombre d'analyses possibles », a précisé notre consœur.

Deux études ont été menées sur le terrain par le GDS Bretagne afin de tester l'apport éventuel de

la PCR sur laits de mélanges à la détection et/ou à la surveillance des infections mammaires.

« Notre expérience, tant lors d'analyses de petits mélanges (20 vaches) que sur lait de tank, menées dans 60 élevages bretons, a montré que certains pathogènes, notamment *Mycoplasma bovis*, ne sont jamais mis en évidence. On n'a pas trouvé non plus de corrélation entre la présence de tel ou tel germe et l'état de santé du troupeau, notamment le nombre de mammites cliniques. La recherche des entérobactéries s'est avérée inutile : rarement positive, elle n'est jamais corrélée à un réservoir environnemental mais plutôt à des défauts d'hygiène/entretien de la machine à traire. La PCR sur lait de tank doit donc

être considérée davantage comme un outil pédagogique auprès de l'éleveur que comme une aide au diagnostic étiologique. Le suivi longitudinal de laits de mélanges pour les valences *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus uberis* donne les perspectives les plus intéressantes, en particulier lors de surveillance conjointe du taux cellulaire du lait de tank, pour repérer les situations qui se dégradent », a conclu Ivanne Leperlier. ■

* PCR : Polymerase chain reaction, technique d'amplification de séquences spécifiques d'acide nucléique.
 ** Inrae : Institut national de la recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement.
 *** GDS : Groupement de défense sanitaire.
 **** GTV : Groupement technique vétérinaire.

Covid-19 : la DGAL alerte les vétérinaires travaillant avec les élevages de visons français

ÉPIDÉMIOLOGIE

À la suite de la mise en évidence, aux Pays-Bas, du virus SARS-CoV-2 chez des visons d'Amérique de deux élevages (lire page 13), la DGAL* alerte les vétérinaires travaillant avec les 10 élevages français sur la sensibilité des visons au virus.

Il est ainsi recommandé aux vétérinaires d'informer sur la situation des élevages néerlandais, où des pertes dans la population de visons ont été causées par la transmission du SARS-CoV-2 par le personnel, et de recommander, aux professionnels concernés, l'adoption de mesures de prévention afin de limiter ces pertes.

La DGAL recommande notamment que :

- toute personne présentant des signes cliniques évocateurs du Covid-19 n'entre pas en contact des animaux ;
- toute personne sans signe clinique devant travailler au contact des visons ou à la préparation de leurs repas porte un masque de type I, dit « grand public » ;

- les mains soient parfaitement propres et les gants remplacés très régulièrement.

Dépistage possible

La DGAL rappelle toutefois que le Covid-19 est « une maladie humaine ; les contaminations animales sont rares et aucun cas de transmission de l'animal vers l'Homme n'a été constaté ».

Il est également indiqué qu'en cas de suspicion ou de mortalité dans l'élevage, un dépistage du SARS-Cov-2 par RT-PCR peut être réalisé par un des 17 laboratoires départementaux d'analyses (LDA) procédant, à ce jour, aux analyses Covid-19, aidés de leur Direction départementale de protection des populations pour s'assurer de la capacité du laboratoire à mettre en œuvre le test et du laboratoire de santé animale de l'Anses** Maisons-Alfort pour réaliser des analyses de confirmation.

Concernant le matériel biologique nécessaire au dépistage, un double prélèvement doit être réalisé sur l'animal malade (écouvillon trachéal et écouvillon rectal) ou le cadavre peut être



Georgys-Adobe Stock

▲ La DGAL recommande que toute personne présentant des signes cliniques évocateurs du Covid-19 n'entre pas en contact des animaux.

acheminé au LDA afin de procéder au test à partir de parenchyme pulmonaire.

La DGAL précise que toute mise en analyse et/ou confirmation de Covid-19 chez un vison ou furet doit lui être signalé par message électronique à l'adresse : alertes.dgal@agriculture.gouv.fr. **P.-L.H.**

* DGAL : Direction générale de l'alimentation.
 ** Anses : Agence nationale de sécurité de l'alimentation, de l'environnement et du travail.

Filière cunicole : réduction des antibiotiques de 50 % d'ici à 2022

ANTIBIORÉSISTANCE

Le nouvel objectif que se fixent l'Itavi* et la filière cunicole qui, depuis 2011, s'est engagée dans la lutte contre l'antibiorésistance, est de réduire son usage d'antibiotiques de 50 % d'ici 2022.

Cette mobilisation avait déjà permis une réduction des ventes d'antibiotiques de près de 25 % entre 2011 et 2014-2015, avant que l'Itavi ne déplore que « le rythme de réduction soit moins soutenu que les premières années ».

Dans la réalisation de ce nouvel objectif, l'Itavi et les acteurs de la filière cunicole vont prochainement mettre à disposition des éleveurs de lapin une boîte à outils qui permettra à l'éleveur et à son technicien de choisir « les leviers spécifiquement adaptés » à l'élevage sur les sujets de l'alimentation, de l'abreuvement, de

l'ambiance du bâtiment, de la conduite d'élevage ou encore de la maîtrise sanitaire.

Cette démarche s'inscrit au sein du projet Mobilis'actions, porté par l'Itavi en partena-

riat avec la SNGTV** et le Clipp***, dans le cadre du plan Ecoantibio.

Deux vidéos YouTube

Deux vidéos présentant cette boîte à outils à travers une animation mais également en traçant un parallèle entre les objectifs de la filière et ceux d'une vétérinaire faisant de l'*ultra-trail* sont disponibles sur la chaîne YouTube de l'Itavi****.

« Il est essentiel de remobiliser l'ensemble des acteurs de la filière pour poursuivre les efforts et atteindre les nouveaux engagements de la filière cunicole », affirme l'Itavi.

Les outils seront disponibles au cours de ce premier semestre. **P.-L.H.**

* Itavi : Institut technique de l'aviciculture.
 ** SNGTV : Société nationale des groupements techniques vétérinaires.
 *** Clipp : Comité interprofessionnel du lapin.
 **** Lien des vidéos : <https://bit.ly/2WY9d18>.



Adobe Stock

▲ La mobilisation de la filière cunicole contre l'antibiorésistance avait déjà permis une réduction des ventes d'antibiotiques de près de 25 %, entre 2011 et 2014-2015.