

Peut-on améliorer le dépistage des infections *Mycobacterium avium ssp paratuberculosis* (MAP) dans le troupeau ?

Fecteau, Gilles; Roy, Jean-Philippe; Paré, Julie; Labrecque, Olivia;
Arango Sabogal, Juan Carlos; Wellemans, Vincent.

No de projet : IA113041

Durée : 01/2013 – 01/2015

FAITS SAILLANTS

Les études évaluant des modifications du protocole de décontamination sur la surcroissance microbienne dans les cultures bactériologiques de MAP sont peu abondantes. Après recensement de la littérature, 5 variations au protocole de décontamination ayant un impact sur le pourcentage d'échantillons déclarés non interprétables (NI) ont été identifiées et 3 parmi elles ont été choisies en fonction de leur faisabilité. Une étude a permis de comparer les rendements de chacune des variantes. Le phénomène de la surcroissance microbienne est difficile à contrôler et prédire. Cela a été démontré par la faible répétabilité des résultats obtenus. Un protocole idéal à partir des variantes identifiées dans la littérature n'a pu être déterminé. À ce stade-ci, l'utilisation de la PCR pour classer les échantillons NI semble être une alternative adéquate, cependant, à des coûts additionnels. Pour les résultats de l'étude sur l'utilisation de la PCR, nous avons constaté l'importance de l'interprétation de la coloration acido-alcoolo-résistante dans le processus de culture. L'utilisation de la PCR devient intéressante lorsqu'un commentaire d'interprétation de la lame suggestif de la présence de contaminants est noté. Pour les échantillons individuels et environnementaux, la PCR a permis de classer les cultures déclarées NI. Elle a aussi permis d'identifier des échantillons positifs à MAP qui n'avaient pas été identifiés par le processus de culture initial en raison de la surcroissance microbienne. Cependant, les coûts additionnels associés à la PCR restent à être considérés avant de recommander d'inclure systématiquement la PCR dans le protocole de routine.

OBJECTIF(S) ET MÉTHODOLOGIE

Objectif : 1) Optimiser la technique de culture bactériologique des fèces en identifiant le protocole de décontamination développé à partir d'une revue de la littérature et mise à l'épreuve dans une étude expérimentale. 2) Estimer l'impact d'une utilisation stratégique de la réaction de PCR pour identifier la présence de MAP (ADN) dans des échantillons non-interprétables.

Méthodologie :

1. **Revue de la littérature** sur les protocoles de décontaminations a été réalisée en utilisant la banque Web of Knowledge via des mots clés.
2. **Décontamination, cultures et PCR**: Trois protocoles de décontamination ont été évalués en parallèle en les comparant au protocole standard.
3. **Décontamination et cultures**: Impact des modifications apportées au protocole de décontamination (6 années).
4. **PCR** : a été évaluée afin de mieux comprendre quand il serait le plus utile de l'effectuer (estimée via la banque de résultats et au laboratoire).

RÉSULTATS SIGNIFICATIFS POUR L'INDUSTRIE

1. **Revue de littérature sur les protocoles de décontamination et les contaminants.**

Les études évaluant l'impact des modifications au protocole de décontamination sur la surcroissance microbienne dans les cultures bactériologiques de MAP sont peu abondantes. Le pourcentage

d'échantillons non interprétables (NI) n'est pas souvent mentionné dans les études utilisant la culture bactériologique.

2. Protocoles de décontamination

Des modifications au protocole de décontamination furent: 1) protocole traditionnel, 2) incubation à 42°C (au lieu de 37°C), 3) 3 jours d'incubation (au lieu de 2 jours) et 4) changement de la concentration d'amphotéricine-B 50 µg/ml (au lieu de 25 µg/ml).

2.1. Évaluation du % d'échantillons NI avec différents protocoles de décontamination

Le % d'échantillons NI avec chaque protocole a été évalué sur 25 échantillons avec un résultat non-interprétable précédent disponibles (quantité de MAP inconnue).

Tableau 1. Résultats des 3 études pilotes de 4 variations au protocole de décontamination pour la culture de *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* des échantillons de l'environnement de troupeaux laitiers du Québec.

Protocole	Pilote (nombre d'échantillons) *											
	1 et 2 (n=25) **			3.1 (n=25)			3.2 (n=22) ***			3.3 (n=21) ***		
	Nég	NI	% NI (IC 95%)	Nég	NI	% NI (IC 95%)	Nég	NI	% NI (IC 95%)	Nég	NI	% NI (IC 95%)
Traditionnel	10	15	60 (38.7- 78.8)	11	14	56.0 (34.9- 75.6)	9	13	59.1 (36.4- 79.3)	4	17	81.0 (58.1- 94.6)
Température	19	6	24 (9.4- 45.1)	18	7	28.0 (12.1- 49.4)	10	12	54.6 (32.2- 75.6)	9	12	57.1 (34.0- 78.2)
Temps	14	11	44 (24.4- 65.1)	14	11	44.0 (24.4- 65.1)	7	15	68.2 (45.1- 86.1)	10	11	52.4 (28.8- 74.3)
Antibiotique	13	12	48 (27.8- 68.7)	13	12	48.0 (27.8- 68.7)	8	14	63.6 (40.7- 82.8)	9	12	57.1 (34.0- 78.2)

Échantillon témoin positif décontaminé avec chaque protocole

Nég : échantillon négatif à MAP. NI : résultat non-interprétable.

*Les mêmes 25 échantillons ont été soumis à 4 études de comparaison des protocoles.

** Les pilotes 1 et 2, même si réalisés sur les 25 échantillons, ont été réalisés en 2 parties de 10 et 15 échantillons respectivement.

*** La quantité d'échantillon n'a pas suffi pour réaliser tous les pilotes.

Proportion différente de NI surtout dans le protocole « température » et « antibiotique ».

2.2. Évaluation de la viabilité de MAP avec différents protocoles de décontamination

Le protocole traditionnel et les 3 variantes au protocole identifiées ont été mis à l'épreuve sur des échantillons de fèces (vache présumée négative) ensemencés avec une quantité connue de MAP équivalente à celle d'une vache excrétrice modérée (550 CFU/g de fèces).

Le nombre d'échantillons positifs était considérablement faible avec tous les protocoles. Le protocole température a le plus faible nombre d'échantillons positifs. La plupart des échantillons deviennent négatifs, incluant le contrôle positif. Parmi les taux de contamination, on n'a pas des différences significatives. Aucune variante au protocole traditionnel semble performer mieux quant à la détection des échantillons positifs à MAP.

3. **Analyse rétrospective.** Les échantillons ont été traités avec un cocktail standard dans la 1^e et 2^e série de prélèvements (été et automne 2011, respectivement). À la 3^e série (automne 2012) un cocktail avec ceftriaxone a été utilisé. Un cocktail avec une haute concentration d'acide nalidixique (High NAL) a été utilisé lors de la série 4 (automne 2013) et 5 (automne 2015).

4. PCR.

4.1. *Utilisation stratégique de la PCR dans le processus de culture bactériologique.*

Nous y avons constaté l'importance de l'interprétation de la coloration acido-alcool-résistante dans le processus de culture. L'utilisation de la PCR est seulement intéressante lorsqu'un commentaire suggestif de la présence de contaminants est fait à la coloration.

4.2. Performance de la PCR pour l'identification de l'ADN de MAP dans les échantillons NI.

4.2.1. *Évaluation et comparaison de 2 méthodes PCR sur des échantillons environnementaux à 2 moments différents (avant et après l'incubation des échantillons).*

4.2.2. Deux méthodes de PCR appliquées à 2 moments différents sur 154 échantillons de l'environnement (divisés en 3 groupes : Non Interprétable (NI : n=62), négatif (n=62) et positif (n=30)). Parmi le groupe NI, l'ADN de MAP a été identifié dans 1 échantillon (1.6%). Parmi le groupe négatif, l'ADN de MAP n'a pas été détecté. Parmi le groupe positif, il y avait plus de résultats positifs à la PCR après la culture qu'avant la culture (P=0.004). La PCR est une méthode fiable et constante pour classer des échantillons répertoriés comme NI.

4.2.3. *Comparaison de 2 méthodes PCR sur les échantillons de l'environnement prélevés en 2014.* La PCR-B a identifié plus d'échantillons sur J-2 que la PCR-A tant parmi les NI que parmi les positifs. La PCR-B a identifié plus d'échantillons positifs sur la masse d'œuf (après l'incubation) que la PCR-A lorsque réalisée sur les échantillons NI (1 vs. 0). Les 2 PCRs ont confirmé comme positifs les mêmes échantillons du groupe positif (12 vs. 12).

4.2.4. *Utilisation de la PCR pour la classification des échantillons individuels déclarés non interprétables.* Un total de 262 échantillons déclarés NI et 88 échantillons négatifs. De l'ADN de MAP a été identifié par PCR sur 8 échantillons parmi les 350 analysés. (2.28%, 95% CI: 1 - 4.5). Sur les 262 échantillons NI, 7 PCR se sont révélées positives (2.6%; 95% CI: 1.1 - 5.4%). Un échantillon a été déclaré positif sur les 88 contrôles négatifs (1.14%; 95% CI: 0.4 - 57.9%). La PCR a permis de classer les cultures NI et permis la récupération d'échantillons positifs à MAP (omis dans le processus de culture initial). Cependant, les coûts additionnels associés au PCR restent à être considérés.

4.2.5. *PCR directe sur des échantillons de l'environnement prélevés en 2015*

Au total, 95 échantillons de l'environnement ont été analysés avec la PCR-B directe et en culture fécale parmi les 170 échantillons de l'environnement prélevés en 2015.

APPLICATIONS POSSIBLES POUR L'INDUSTRIE ET/OU SUIVI À DONNER

Cette étude a permis d'investiguer des variations possibles au protocole de laboratoire pour optimiser la technique de culture des fèces. Malheureusement, le phénomène de la contamination est complexe et un protocole supérieur à celui en place n'a pas été identifié.

POINT DE CONTACT POUR INFORMATION

Nom du responsable du projet : Gilles Fecteau

Téléphone : 450-773-8521 (8337)

Télécopieur : 450-778-8102

Courriel : gilles.fecteau@umontreal.ca

REMERCIEMENTS AUX PARTENAIRES FINANCIERS

Ces travaux ont été réalisés grâce à une aide financière du Programme de soutien à l'innovation en agroalimentaire, un programme issu de l'accord du cadre Cultivons l'avenir conclu entre le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation et Agriculture et Agroalimentaire Canada.