



Par JULIE BAILLARGEON, agronome,
agente de transfert, et
ANNE-MARIE CHRISTEN, chargée de projet
en transfert, RCRMB, et DANIEL SCHOLL,
directeur scientifique, RCRMB, et
professeur, Faculté de médecine vétérinaire,
Université de Montréal

RECHERCHÉES :

Bactéries responsables de la mammite

■ Des tests PCR sont mis au banc d'essai pour aider au diagnostic de la mammite.

Lorsqu'un crime est commis, on parvient souvent à dévoiler l'identité du coupable grâce aux traces d'ADN laissées sur la scène du crime. Bientôt, les bactéries de la mammite seront traitées en vraies criminelles puisqu'il existe de nouveaux tests PCR spécialement conçus pour les démasquer. Les médecins vétérinaires et les producteurs laitiers auront donc l'occasion de jouer à Columbo et disposeront potentiellement d'un nouvel outil diagnostique puissant pour la gestion de la mammite.

La technique utilisée pour analyser l'ADN des bactéries est l'amplification en chaîne par polymérase, mieux connue sous son sigle anglais : PCR. Certains laboratoires offrent le service

PCR pour le diagnostic de la mammite depuis quelques années déjà, mais les tests disponibles ne permettent d'identifier qu'une seule bactérie à la fois et sont plus coûteux que la culture bactérienne traditionnelle.

Toutefois, de nouveaux tests PCR permettant d'identifier plusieurs agents pathogènes en même temps font depuis peu leur apparition sur le marché. On les appelle PCR multiplexe. Pour la plupart, ces tests permettent même de mesurer la quantité de bactéries dans l'échantillon. Dans ce cas, on dit de la PCR qu'elle est en temps réel. En laboratoire, ces tests sont très efficaces et offrent une avenue prometteuse dans le diagnostic de la mammite. Néanmoins, leur sensibilité et

UN TEST PCR, COMMENT ÇA MARCHE?

Trois éléments sont requis pour un test PCR : un tube PCR (petite éprouvette résistante à la chaleur), différents réactifs et une source de chaleur. Il suffit de 70 µl de lait infecté pour effectuer le test. Cette infime gouttelette de lait est d'abord soumise à une réaction enzymatique qui brise les cellules des bactéries présentes afin de libérer leur ADN ou code génétique. Les brins d'ADN sont ensuite purifiés et mis dans un tube PCR. Puis on doit ajouter :

- deux réactifs qui prédéterminent la séquence de gènes à multiplier (ce qui nous permet de cibler la bactérie recherchée);
- des nucléotides (A, C, G, T) qui forment le code génétique de l'ADN;
- une enzyme, la polymérase ADN, qui est capable de lire le code génétique de la bactérie et de reconstruire des copies de la séquence de gènes recherchée.

Ce mélange est ensuite soumis à plusieurs cycles consécutifs – chauffage et temps d'attente –, ce qui produit la multiplication de la séquence des nucléotides. L'identification de la séquence multipliée peut être confirmée par un logiciel conçu à cet effet ou d'autres procédures de laboratoire.



Trois éléments sont requis pour effectuer un test PCR : un tube PCR, différents réactifs et une source de chaleur.

FOOD SAFETY CENTER OF EXCELLENCE, THE UNIVERSITY OF TENNESSEE

leur spécificité réelles sur le terrain sont encore méconnues.

UN PROJET DE RECHERCHE D'ENVERGURE

Le Dr Daniel Scholl, directeur scientifique du Réseau canadien de recherche sur la mammité bovine (RCRMB) et professeur en épidémiologie à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, a donc décidé de remédier à la situation et a entrepris un projet d'envergure visant à valider trois trousse PCR commercialisées ou sur le point de l'être (voir encadré ci-contre).

Dans ce projet, le Dr Scholl et son équipe proposent d'évaluer la fiabilité des tests PCR en calculant les pourcentages de résultats faux négatifs (sensibilité) et faux positifs (spécificité). Les uns comme les autres ont un impact important à la ferme, car un mauvais diagnostic peut donner lieu à une décision de gestion inappropriée.

Pour ce faire, le Dr Scholl et son équipe disposent d'une quantité

DES TESTS PCR AU BANC D'ESSAI

Dans le cadre de ce projet, trois systèmes développés pour la détection des bactéries de la mammité sont évalués et comparés à la culture bactérienne. Il s'agit de :

▶▶ DAIRYGUARD™ DE SAFEGUARD BIOSYSTEMS INC., CANADA

Cet équipement est capable d'identifier plusieurs bactéries dans un seul échantillon de lait. Il n'est pas encore sur le marché.

▶▶ PATHOPROOF MASTITIS PCR™ DE FINNZYMES OY, FINLANDE

Cet équipement détecte 11 bactéries ou groupes de bactéries. Il est commercialisé depuis trois ans.

▶▶ MULTIPLEX REAL-TIME PCR, UNIVERSITY OF TENNESSEE, KNOXVILLE, ÉTATS-UNIS

C'est un test PCR mis au point par le Dr Stephen Oliver de l'Université du Tennessee. Il permet l'identification simultanée de quatre bactéries majeures de la mammité en temps réel et c'est pourquoi on le nomme « Multiplex Real-Time PCR ».

le
producteur
de **LAIT**
québécois

LA CULTURE BACTÉRIENNE AUX POUBELLES?



La culture bactérienne est un outil utile et efficace pour la détection des bactéries, mais elle a ses lacunes. Une concentration trop faible de bactéries dans l'échantillon à analyser ainsi qu'un mauvais choix de milieu de

culture peuvent donner un résultat de « non-croissance ». Dans certains cas, d'autres cultures ou tests doivent parfois être réalisés pour faire la distinction entre deux bactéries similaires. La contamination de l'échantillon de lait à la ferme ou au laboratoire est possible et conduit à un mauvais diagnostic (4 à 20 % des échantillons). De plus, le temps d'incubation engendre un certain délai et donc, les résultats tardent à parvenir à la ferme. Cependant, le coût d'une culture bactérienne est présentement plus abordable qu'un test PCR et cette méthode est offerte par tous les laboratoires de diagnostic au pays.

Les tests PCR promettent de compenser les lacunes de la culture bactérienne et offriront de nouvelles avenues pour la recherche et pour la gestion de la mammite au sein d'un troupeau. Toutefois, la culture bactérienne demeure un outil accessible et fort pertinent dans les programmes de santé du pis à la ferme.

SENSIBILITÉ ET SPÉCIFICITÉ : QUELLE EST LA DIFFÉRENCE?

La sensibilité d'un test comme la PCR est sa capacité à donner un résultat positif lorsqu'il y a réellement présence de la bactérie dans l'échantillon de lait.

La spécificité est la capacité du test à donner un résultat négatif lorsque l'échantillon est exempt de la bactérie recherchée dans l'échantillon.

Plus les valeurs de sensibilité et de spécificité sont hautes, plus le test sera efficace à nous communiquer la présence ou l'absence réelle de la bactérie dans l'échantillon.

En théorie, la PCR a la prétention d'offrir une sensibilité et une spécificité de 100 %. En pratique, plusieurs facteurs peuvent compromettre la validité du test et c'est ce que nous voulons vérifier dans notre étude.

phénoménale d'échantillons prélevés dans les quelque 91 troupeaux de la Cohorte nationale des fermes laitières du RCRMB. Celle-ci fournit une excellente représentation de la population laitière canadienne. Ainsi, les résultats de l'étude auront l'avantage d'être directement applicables dans le contexte de nos fermes. De plus, on dispose d'échantillons prélevés chez des vaches souffrant de mammite clinique – avec symptômes – ainsi que chez des vaches en lactation sans symptômes apparents.

Il n'existe pas de méthode de diagnostic parfaite pour détecter les bactéries de la mammite dans le lait. La bonne vieille culture bactérienne, celle qu'on utilise normalement pour analyser les échantillons que vous envoyez au laboratoire, fait office de méthode de référence (*gold standard*).

Ainsi, tous les échantillons prélevés dans le cadre de la Cohorte ont d'abord été soumis à une culture bactérienne dont les résultats seront ensuite comparés avec ceux des analyses PCR.

OU EN EST-ON?

À l'heure actuelle, 1 765 cas de mammite clinique sont en cours d'analyse au moyen des différents équipements PCR. Par la suite, 4 000 échantillons de lait récoltés chez des vaches en lactation en apparence saines seront analysés. Dans ces derniers, peut-être trouvera-t-on des infections qui n'avaient pas été détectées par la culture bactérienne. Aurons-nous enfin un moyen de « voir » la mammite subclinique? Les quatre bactéries recherchées dans ces échantillons sont les suivantes : *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* et *Streptococcus agalactiae*.

Tous les résultats sont attendus pour l'automne 2010. En parallèle, les chercheurs regarderont s'il existe une association entre la sensibilité et la spécificité et le stade de lactation au moment de l'échantillonnage, le comptage des cellules somatiques, le délai entre la prise de l'échantillon et la réalisation de l'analyse, le profil infectieux du troupeau et la présence d'autres bactéries.

IMPACTS À LA FERME

Grâce à la banque d'échantillons de lait générée par la Cohorte nationale des fermes laitières, seul le RCRMB peut réaliser ce projet unique et d'envergure. Dès le début de 2011, les résultats révéleront l'exactitude de ces nouveaux équipements pour le diagnostic de la mammite, ce qui pourrait grandement intéresser les laboratoires de diagnostic. Du côté de la ferme, le diagnostic précis et rapide des mammites cliniques et subcliniques aura un impact majeur sur les décisions de gestion en santé du pis.

Pour plus d'information et de ressources pratiques sur la santé du pis, visitez le www.reseaumammite.org et abonnez-vous à notre bulletin électronique *Flash-mammite* dès maintenant. ■