

emma qPCR – Une solution innovante pour l'identification des mammites cliniques en cabinet vétérinaire.

Christoph Kunas, Stephanie Walker
ender diagnostics ag, 2024



1. Résumé

L'identification rapide et précise des agents pathogènes est cruciale pour le traitement ciblé et fondé sur des données probantes de la mammite clinique. Plusieurs tests sont actuellement disponibles pour une utilisation en cabinet vétérinaire ou en élevage, mais il existe des différences majeures en termes de délai et de qualité des résultats.

Dans cette étude, 5 méthodes de test différentes ont été comparées sur 95 échantillons : emma qPCR, microbiologie classique et test C ont permis une détection concrète des agents pathogènes, là où les tests A et B n'indiquaient que le statut Gram et avaient un taux de détection significativement plus faible. D'une durée de 90 minutes, l'emma qPCR était de loin le test le plus rapide et la seule méthode appropriée pour détecter *Mycoplasma* spp. Ces résultats illustrent les différences de qualité entre les tests et soulignent l'importance d'une méthode de diagnostic appropriée pour le traitement de la mammite fondé sur des données probantes.

2. Introduction

Pour traiter de manière ciblée la mammite clinique chez les vaches laitières, un diagnostic rapide et précis des agents pathogènes est crucial en plus du tableau clinique. Il est courant de prescrire un traitement antibiotique initial en parallèle au prélèvement de l'échantillon pour l'analyse. Afin d'inverser ce processus et de baser le traitement sur le diagnostic, plusieurs tests pouvant être effectués au cabinet vétérinaire ou, dans certains cas en élevage, sont disponibles. Le plus rapide de ces tests est la solution de diagnostic innovante emma (ender molecular mutiplex approach). Il permet aux vétérinaires de générer un résultat par qPCR, dans leur propre cabinet en 90 minutes, grâce auquel les agents pathogènes les plus importants peuvent être détectés de manière comparable aux autres méthodes de diagnostics établies (voir Figure 1) et ceci incluant la détection des mycoplasmes peuvent être détectés. Tous les tests effectués sur site présentent l'avantage de générer un chiffre d'affaires supplémentaire pour le cabinet et ne nécessite plus l'envoi fastidieux d'échantillons à des laboratoires d'analyses spécialisés, ce qui signifie que le résultat du diagnostic et la connaissance de l'état clinique de la vache ne font qu'un et sont entre les mêmes mains.

Dans cette étude, 5 méthodes de test utilisées pour le diagnostic de la mammite clinique dans les cabinets vétérinaires ont été comparées au moyen d'une analyse en parallèle de 95 échantillons de lait.

3. Matériel et méthodes

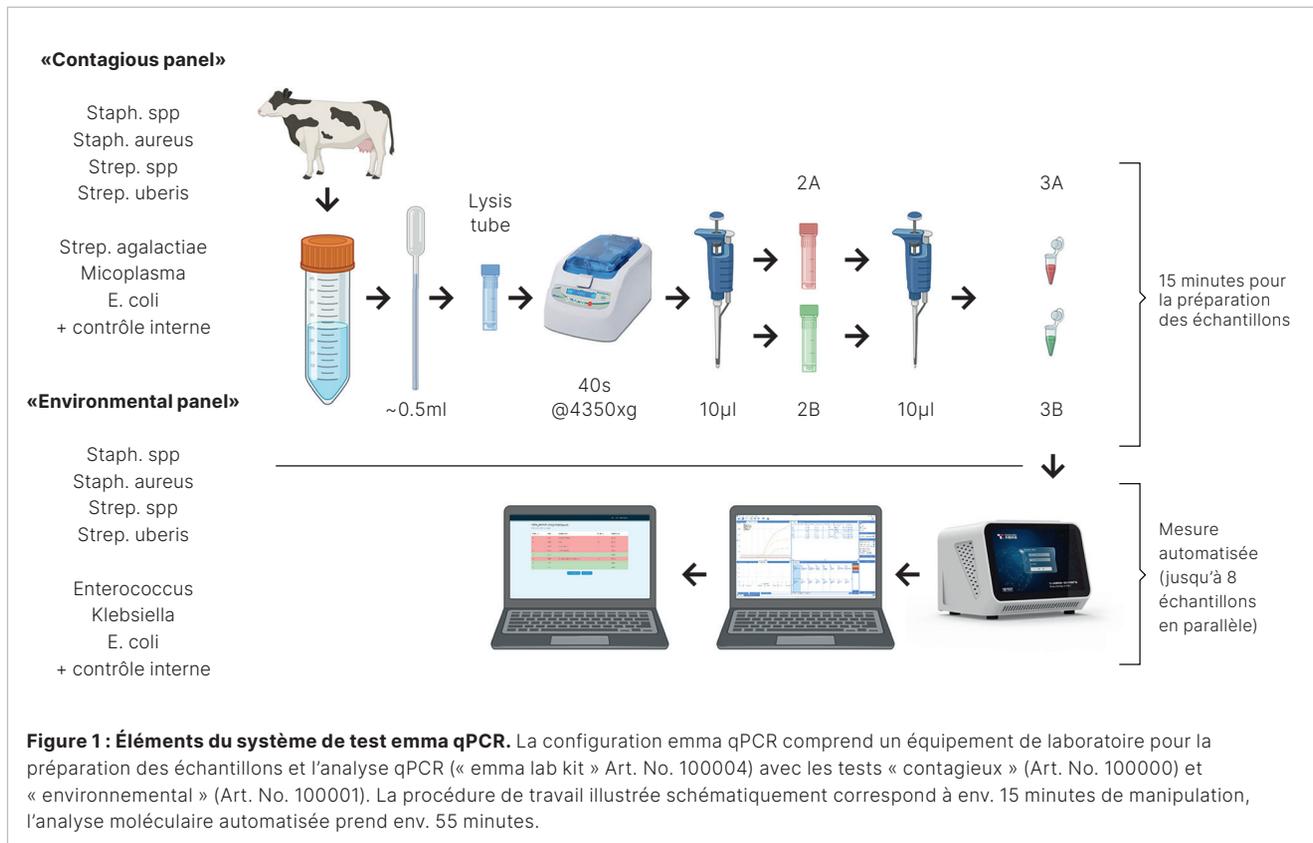
95 échantillons de lait provenant de vaches présentant des symptômes cliniques de mammite ont été testés en parallèle en utilisant le système emma qPCR, la microbiologie classique et trois tests rapides disponibles dans le commerce. Le tableau 1 donne un résumé de ces méthodes.

Tableau 1 : Aperçu des méthodes de test

	Microbiologie	Test A	emma PCR	Test B	Test C
Principe du test	Microbiologie	Immuno-Chromatographie	RT-PCR	Milieu de culture	Microbiologie
Incubation	24 heures	7,5 heures	Non requise	12 heures	24 heures
Délai de résultat	Jusqu'à 72 heures	8 heures	1,5 heures	12 heures	24 heures
Résultat	Pathogène / Groupe de pathogènes	Gram positif	Pathogène / Groupe de pathogènes	Gram positif / négatif	Pathogène / Groupe de pathogènes
Interprétation	Visuelle, biochimique	Visuelle (test bandelette)	Automatisée, semi-quantitatif	Visuelle (changement de couleur)	Visuelle (croissance)

Emma qPCR

L'échantillon de lait a été lysé dans un homogénéisateur, suivi d'une qPCR avec le panel « environnemental » ou « contagieux », tous deux couvrant différents groupes de bactéries. La procédure a été réalisée selon les instructions du fabricant (Mode d'emploi). Ces panels sont sélectionnés par le vétérinaire avant le test sur la base de l'état clinique de la vache et de la situation pathogène prévalente (voir Figure 1). Après 55 minutes, l'identification des agents pathogènes a été réalisée par une évaluation automatisée hébergée sur le Cloud.



Microbiologie classique

L'échantillon de lait a été ensemencé sur une boîte de Pétri et incubé à 37 °C pendant 24 heures. L'agent pathogène a été identifié par morphologie, coloration de Gram, sous-culture sur gélose sélective et tests biochimiques supplémentaires tels que les tests de catalase, de coagulase et d'oxydase.

Test A

L'échantillon de lait a été ensemencé sur une boîte de Pétri et incubé à 37°C pendant 24 heures. L'agent pathogène a été identifié par changement de couleur de la bandelette de test. Ce test a été réalisé en suivant les instructions du fabricant.

Test B

L'échantillon de lait a été incubé dans deux bouillons différents à 37°C pendant 12 heures. Les pathogènes Gram positifs et Gram négatifs pouvaient être détectés par un changement de couleur du milieu de culture. Le test a été réalisé selon les instructions du fabricant.

Test C

L'échantillon de lait a été ensemencé sur une boîte de Pétri avec trois milieux de culture (sélectifs) différents et incubé à 37°C pendant 24 heures. Les pathogènes ont été identifiés en fonction de leur croissance et de leur morphologie sur les différents milieux. Le test a été effectué conformément aux instructions du fabricant.

Analyse des données et comparaisons

Sept échantillons ont été exclus de l'analyse en raison de résultats invalides avec le test emma qPCR. Selon les instructions du mode d'emploi, ce résultat conduit à un test de suivi, qui n'a pas été réalisé ici en raison de contraintes de temps.

Lors de l'évaluation des résultats, le taux de détection des échantillons positifs, le statut Gram des agents pathogènes et l'identification des agents pathogènes des différents tests ont été comparés.



emma
by *ender*



4. Résultats

Taux de détection et statut Gram

Le taux de détection d'agents pathogènes était le plus élevé avec le système emma qPCR et le test C (90,9 % et 94,3 %), suivi par la microbiologie classique (79,5 %). Les tests A et B semblaient avoir une capacité de détection significativement inférieure (28,4 % et 40,9 % ; voir figure 2a).

La proportion de bactéries Gram positives détectées était similaire pour le système emma qPCR, la microbiologie classique et le test C (77,3 %, 65 % et 78,4 %), tandis que les tests A et B ont donné des résultats significativement inférieurs (28,4 % et 27,3 %). Aucune différence statistiquement significative n'a été trouvée dans les proportions de bactéries Gram négatives (test C 15,9 % ; microbiologie classique 14,8 %, emma qPCR et test B 13,6 %). Aucune détection de bactéries Gram négatives n'est possible avec le test A (voir Figure 2b).

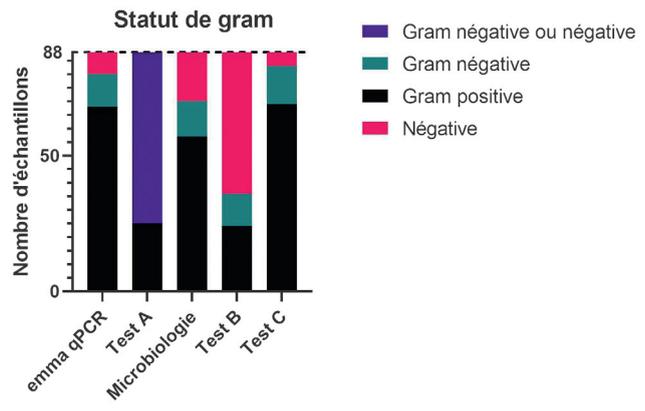
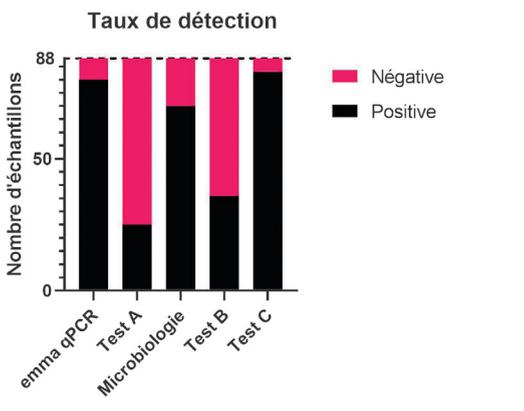


Figure 2 a) Taux de détection des différentes méthodes.

La microbiologie classique, le système emma qPCR et le test C ont obtenu un taux de détection significativement plus élevé que les tests A et B.

Figure 2 b) Statut Gram des pathogènes détectés.

Le test A ne peut pas faire la distinction entre les résultats de test négatifs et Gram négatifs. Par ailleurs, aucune différence significative dans la proportion de résultats de test Gram négatifs n'a été trouvée avec les quatre autres méthodes de test. La microbiologie classique, le système emma qPCR et le test C ont détecté significativement plus d'agents pathogènes Gram positifs que les tests A et B.

Identification des agents pathogènes

Le système emma qPCR, la microbiologie classique et le test C fournissent des résultats de test avec identification des agents pathogènes. La détection de Staphylococcus aureus, Staphylococcus non-aureus, Streptococcus spp. et les bactéries coliformes ne différaient pas de manière statistiquement significative. Enterococcus spp. a été détecté dans 4,5 % des échantillons en microbiologie classique et dans 1,1 % avec emma qPCR, alors qu'aucune détection n'a été obtenue avec le test C. Le système emma qPCR était le seul test capable de détecter Mycoplasma spp. (détecté dans 19 des 88 échantillons ; 21,6 %).

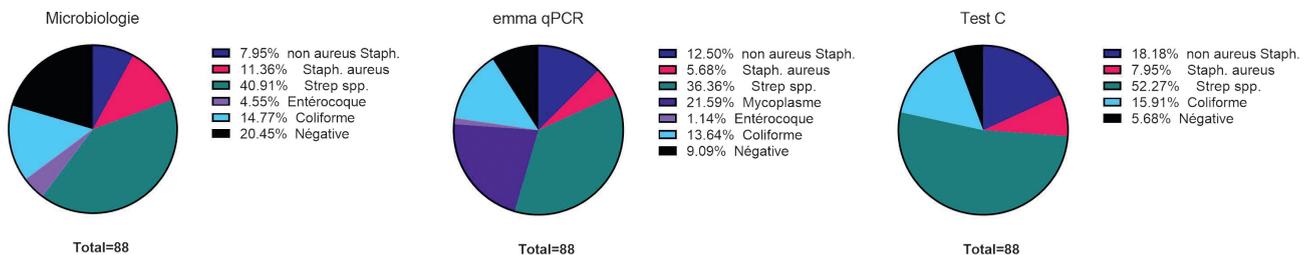


Figure 3 : Répartition des espèces pathogènes détectées.

Aucune différence significative n'a été trouvée dans la détection de Staphylococcus aureus, de Staphylococcus non-aureus et de Streptococcus spp. ainsi que les bactéries coliformes. La qPCR Emma et la microbiologie classique ont détecté beaucoup plus d'Enterococcus spp. que le test C. Le système emma qPCR était la seule méthode de diagnostic capable de détecter les infections à Mycoplasma spp.

5. Discussion des résultats

Cinq méthodes de test différentes avec des technologies différentes telles que la qPCR, la microbiologie ou l'immuno-chromatographie ont été comparées. Le taux de détection d'échantillons positifs était le plus élevé avec emma qPCR et le test C, suivis par la microbiologie classique. Les tests A et B ont montré un taux de détection nettement inférieur. Le taux de détection d'agents pathogènes Gram positifs était le plus élevé avec la qPCR emma, la microbiologie classique et le test C, tandis que les tests A et B en détectaient significativement moins. Aucune différence significative n'a été constatée dans le taux de détection des bactéries Gram négatives.

En utilisant le système emma qPCR, la microbiologie classique et le test C, l'identification au niveau de l'espèce est possible. Aucune différence statistiquement significative n'a été trouvée, sauf pour *Enterococcus* spp. et *Mycoplasma* spp. *Enterococcus* spp. a été détecté plus fréquemment avec la microbiologie classique qu'avec emma qPCR, alors qu'aucune détection n'a été obtenue avec le test C. La différence entre la microbiologie et emma qPCR s'explique par le fait que le panel environnemental emma qPCR, qui inclut *Enterococcus* spp., n'a été utilisé que dans 25% des tests. Le système emma qPCR est le seul test capable de détecter *Mycoplasma* spp. étant donné que cet agent pathogène ne se développe pas dans des conditions microbiologiques courantes. Des *Mycoplasma* spp. a été détecté dans 19 des 88 échantillons (21,6%).

Tandis que les tests A et B ont fourni des résultats nettement moins bons en raison d'un manque d'identification des agents pathogènes et d'un taux de détection plus faible des échantillons positifs, les résultats du système emma qPCR, de la microbiologie classique et du test C ont abouti à des résultats presque équivalents. Ces résultats montrent que le test emma qPCR, utilisable au cabinet, permet d'obtenir des résultats comparables aux tests microbiologiques établis au cabinet, mais en une fraction du temps.

6. Convivialité en routine

Tous les systèmes de test examinés se sont révélés conviviaux et adaptés à l'environnement du cabinet, avec une préparation des échantillons ne prenant que quelques minutes dans chaque cas (par exemple 15 minutes pour 8 échantillons en parallèle avec le système emma qPCR). L'évaluation visuelle des résultats des tests examinés peut être sujette à des interprétations erronées, en particulier si du personnel non formé ou intérimaire effectue les tests. Ce facteur est supprimé avec le système emma qPCR, du fait que l'évaluation est effectuée de manière uniforme dans la solution logicielle hébergée sur le Cloud et que des rapports de test standardisés sont générés automatiquement.

Tous les tests, à l'exception du système emma qPCR, nécessitent un long enrichissement en bactéries potentiellement pathogènes avant qu'un résultat de test ne soit disponible. Non seulement cela prend du temps, mais – selon le lieu où les tests sont utilisés – cela présente également un risque pour la sécurité au travail, ou peut être critiqué par les autorités de contrôle.

Le plus grand avantage du système emma qPCR est le temps nettement plus court nécessaire pour obtenir les résultats. Tandis que les tests examinés avec enrichissement nécessitent 8 à 24 heures, l'emma qPCR délivre des résultats en seulement 90 minutes. Cet avantage temporel permet un traitement (ou un non-traitement) rapide et ciblé de la mammites clinique basé sur l'identification des agents pathogènes directement au cabinet vétérinaire.

Contact

ender diagnostics AG, Freiburgstr. 251, 3018 Bern, Suisse

Site internet: www.emma.vet **Courriel:** emma-service@enderdiagnostics.com

Téléphone: +41 31 552 27 66 (Lundi au Vendredi, 09:00 à 17:00)