

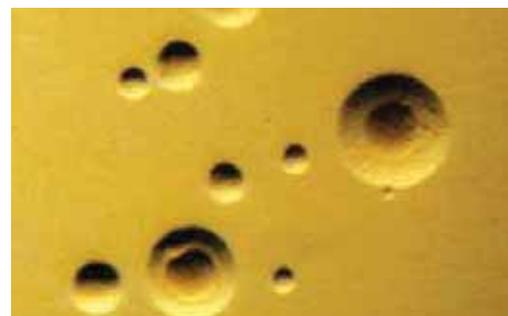


Méthodes

Méthode d'isolement de *Mycoplasma* spp. chez les ruminants – Enseignements des résultats de l'essai inter-laboratoires 2009 réalisé dans le cadre du réseau VIGIMYC

M. Chazel, F. Tardy, F. Poumarat, Afssa, Lyon (France)

Chazel M., Tardy F., Poumarat F. (2009). Method for isolating *Mycoplasma* spp. in ruminants, cahiers de la Référence, No. 2, CR2-09M02. <http://www.afssa.fr/cahiersdelareference/numero2/PNCO10.htm>



Près de quarante espèces de mycoplasmes ont été décrites chez les ruminants, parmi lesquelles plusieurs sont pathogènes et certaines sont responsables de mycoplasmoses soumises à une réglementation nationale et/ou internationale.

À la demande du vétérinaire praticien, lors d'une suspicion de mycoplasmoses, les laboratoires départementaux recherchent en routine les mycoplasmes dans les prélèvements cliniques transmis pour diagnostic. Lorsque cette analyse est positive, le laboratoire d'études et de recherches en pathologie bovine et hygiène des viandes de l'Afssa à Lyon, dans le cadre du réseau d'épidémiologie des mycoplasmoses des ruminants (VIGIMYC), procède à l'identification du/des mycoplasmes isolés en culture (Poumarat *et al.*, 2009; Chazel *et al.*, 2008).

Afin d'harmoniser les techniques d'analyses dans les laboratoires, Vigimyc a récemment proposé un essai inter-laboratoires (EIL) d'isolement de mycoplasmes auquel 32 laboratoires du réseau ont participé. Cet article a pour objectif de présenter les erreurs observées et de proposer des mesures correctrices.

Caractéristiques de l'EIL

Méthode d'analyse d'isolement de mycoplasmes

La méthode d'isolement des mycoplasmes des ruminants préconisée par le laboratoire d'études et de recherches en pathologie bovine et hygiène des viandes de l'Afssa à Lyon est décrite dans un protocole disponible sur simple demande⁽¹⁾. Cette méthode (AFSSA 2008) annule et remplace la précédente version (CNEVA 1996).

Elle est fondée sur l'ensemencement du prélèvement sur bouillon spécifique pour mycoplasme en dilutions successives de 10 en 10, puis le repiquage sur gélose après incubation.

Les milieux préconisés sont de préférence ceux du commerce. Spécifiquement adaptés à la culture des mycoplasmes, ils garantissent une qualité constante de lot à lot difficile à obtenir par les productions internes. La présence d'inhibiteurs de croissance (déjà contenus dans le milieu commercial ou à ajouter) pour limiter les contaminations fongiques et bactériennes est fortement recommandée.

Protocole de l'EIL

L'objectif principal de l'EIL était de permettre aux laboratoires de s'auto-évaluer sur leur capacité à isoler les principales espèces de mycoplasmes pathogènes des ruminants, à des titres compatibles avec une bonne détection en diagnostic courant, mais aussi dans le cadre de dépistage en portage sain. Pour ce faire, il a été proposé à l'analyse des aliquotes d'EIL correspondant à des cultures pures de trois mycoplasmes reconnus comme pathogènes majeurs en France (Poumarat *et al.*, 2009): *Mycoplasma* (M.) *bovis*, *M. agalactiae* et *M. mycoides* subsp. *mycoides* biotype Large Colony récemment renommé *M. mycoides* subsp. *capri* (Mmc). Chaque mycoplasme a été préparé à deux concentrations différentes, l'une comparable aux concentrations élevées retrouvées dans des prélèvements pathologiques (>10⁶ CFU.mL⁻¹) et l'autre faible proche de celle

retrouvée dans des prélèvements issus d'animaux porteurs sains (100 CFU.mL⁻¹). En parallèle certaines aliquotes étaient négatives.

Pour chaque aliquote, la réponse attendue des laboratoires au vu de leurs résultats d'analyse sur bouillon et gélose était « absence de mycoplasmes » ou « présence de mycoplasmes » et/ou « contamination ».

Afin d'objectiver les résultats d'analyses, il était demandé aux laboratoires de retourner à l'Afssa leurs tubes de bouillon d'analyse (y compris les « négatifs ») pour recherche et identification sérologique (MF-dot) des mycoplasmes.

Cette identification des mycoplasmes contenus dans les bouillons de culture a permis de mettre en évidence les limites d'une lecture visuelle de la croissance en bouillon et d'exclure les éventuelles contaminations des cultures par des mycoplasmes autres que ceux initialement présents dans les aliquotes d'EIL. Parmi les 32 laboratoires participants, deux n'ont transmis aucun bouillon de culture et sont donc exclus des résultats ci-dessous, quatre n'ont transmis qu'une partie des bouillons d'analyse et n'ont donc pu être que partiellement validés et enfin 26 laboratoires ont transmis la totalité des bouillons d'analyse.

Résultats et enseignements

En première analyse, les déviations par rapport aux résultats escomptés apparaissent nombreuses puisque seuls six laboratoires sur 30 ont répondu sans aucune erreur. Cependant une grande partie de ces déviations sont mineures (15 laboratoires) et concernent essentiellement les échantillons à très faibles titres (déviations largement attribuables aux limites propres à la technique).

Le graphique ci-joint (figure 1) représente pour chaque laboratoire anonymé le nombre de réponses conformes ou non conformes sur les huit tubes soumis à l'analyse, en déclinant



Méthodes

alors deux types d'erreurs : les erreurs graves, qui conduiraient dans le cadre de Vigimyc à une identification impossible ou erronée, et les erreurs mineures n'ayant pas d'influence sur le résultat que le laboratoire rend au vétérinaire.

Parmi les erreurs graves, la plus fréquente (5/30) a été une réponse « aliquote contaminée par des bactéries » alors qu'il contenait *Mmc*. La croissance de *Mmc* assez atypique pour un mycoplasme (croissance rapide et exubérante entraînant un trouble important du bouillon et formant un tapis épais sur gélose) pourrait expliquer cette confusion, notamment pour les laboratoires qui ne travaillent pas de mycoplasmes caprins. Une autre erreur relevée parfois (3/30) était la présence dans le bouillon d'analyse transmis par le laboratoire d'autres mycoplasmes que ceux initialement présents dans les aliquotes d'EIL, soit en plus, soit à leur place. Cette erreur, survenue suite à une contamination croisée entre différentes cultures de mycoplasmes, est très instructive pour la communauté car on ignore ou sous-estime souvent l'importance des possibilités de ce type de contamination entre les cultures au sein d'un laboratoire de mycoplasmologie. Le format du protocole de l'EIL, avec une multiplicité d'espèces mycoplasmiques et nombreux prélèvements à traiter simultanément, a évidemment favorisé ces contaminations croisées.

Le tableau ci-joint (tableau 1) reprend les descriptions d'erreurs relevées lors de l'EIL et propose les mesures correctives susceptibles de les résoudre.

Conclusion

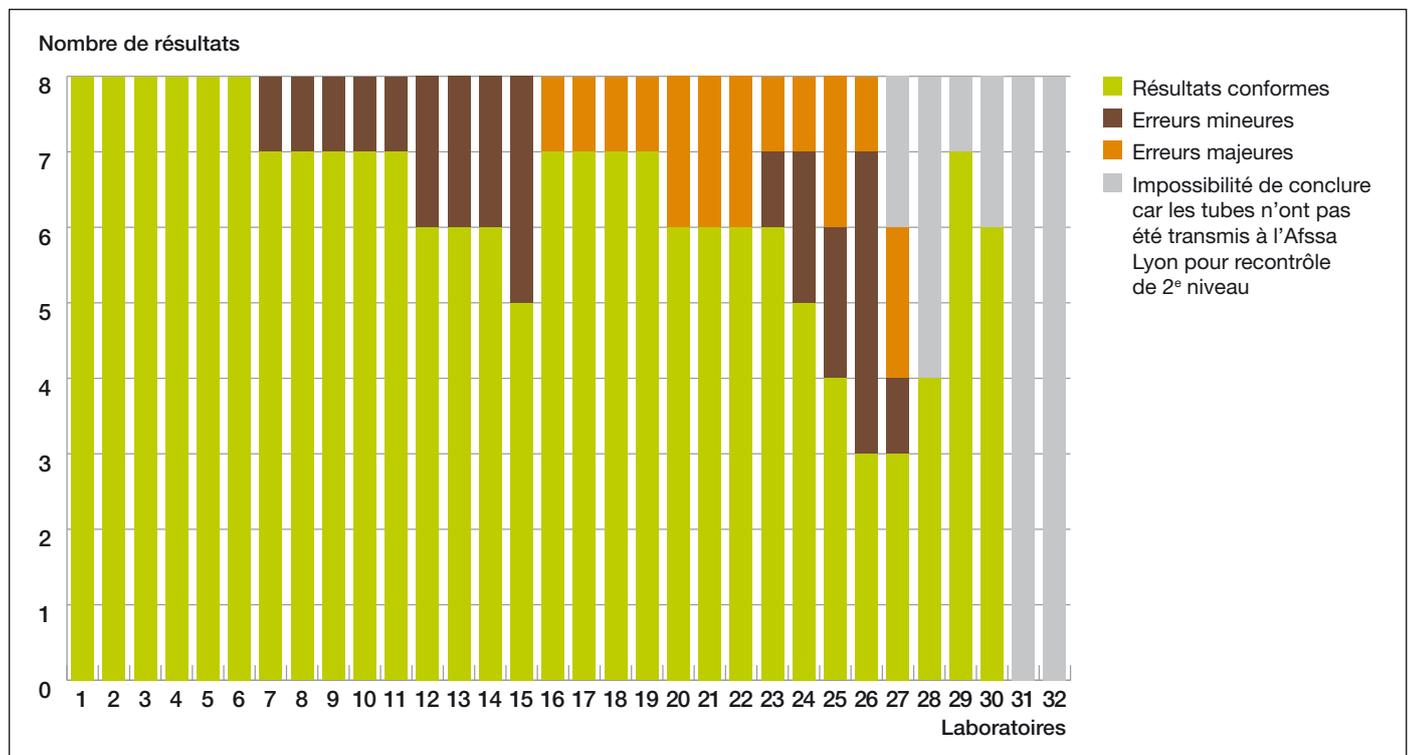
Même si, globalement, le nombre de laboratoires ayant fait des erreurs semble important, il s'avère, dans le détail, que les erreurs sont pour la plupart sans incidence sur le fonctionnement de Vigimyc et sur le résultat que le laboratoire rend sur le terrain. Les erreurs graves mises en évidence dans le cadre de cet EIL seront très faciles à corriger.

Références bibliographiques

Chazel M, Poumarat F, Tardy F. 2008. VIGIMYC : réseau d'épidémiologie-surveillance des mycoplasmoses des ruminants en France. *Bulletin Épidémiologique*, 30 : 10-11.

Poumarat F, Chazel M, Tardy F, Gaurivaud P, Arcangioli MA, Le Grand D, Calavas D. 2009. VIGIMYC, le réseau national d'épidémiologie-surveillance des mycoplasmoses des ruminants, bilan 2003-2007. *Bulletin Épidémiologique*, 31 : 4-8.

(1) Unité Mycoplasmologie – Afssa Lyon, 31 avenue Tony Garnier, F-69364 Lyon Cedex 07.



Graphique : Nombre de résultats conformes et non conformes par laboratoire ayant participé à l'EIL (n° de laboratoires anonymés).



Méthodes

Tableau 1 : Erreurs observées lors de l'EIL et actions correctives proposées

Erreur observée	Conséquence de l'erreur sur le résultat d'analyse si l'échantillon était un prélèvement de terrain	Action corrective proposée
Le laboratoire ne détecte aucune croissance lors de son analyse alors que le MFdot de contrôle sur bouillon de culture est nettement positif	Réponse du laboratoire faussement négative	<ul style="list-style-type: none"> Revoir la préparation des boîtes de gélose et leur ensemencement : surface trop humide ou trop sèche, boîte préparée depuis plusieurs jours. Bien regarder la turbidité des tubes (dans les tubes de cet exemple les titres étaient élevés et la turbidité devait être détectable à l'œil nu). Comparer avec un tube témoin non ensemencé. Ensemencer toujours la dernière dilution de bouillon où la croissance est visible, des cultures ayant dépassé la phase de plateau (dilutions plus importantes) peuvent ne plus redémarrer sur boîte.
Le laboratoire annonce que l'échantillon est contaminé par un micro-organisme autre qu'un mycoplasme. Le MFdot confirme la présence de <i>Mmc</i> dans ce tube.	Impossibilité de réponse pour le laboratoire.	<p>Il s'agit très probablement d'une confusion entre la présence de <i>Mmc</i> de croissance rapide et massive et une culture bactérienne :</p> <ul style="list-style-type: none"> en cas de doute de contamination bactérienne classique, ensemencer sur gélose par étalement large en stries ou faire plusieurs dilutions de 10 en 10 de la culture et ensemencer chaque dilution en goutte roulante sur une même boîte. Pour les dilutions les plus élevées, les colonies seront dispersées et leur aspect typique en « œuf sur le plat » apparaîtra nettement même si leur taille est surprenante ; si le doute subsiste, le simple passage d'une cœse permet de différencier les colonies de bactéries qui sont entraînées sans laisser de trace tandis que pour les mycoplasmes il reste toujours la trace du « clou » central de la colonie qui s'enfoncé dans la gélose ou tout simplement faire un gram et/ou ensemencer une gélose au sang pour définitivement écarter l'hypothèse de contamination bactérienne
Le laboratoire indique la présence de mycoplasmes. Le MFdot révèle la présence d'un mycoplasme dans un échantillon attendu négatif (1 ^{er} cas) ou la présence d'un mélange du mycoplasme attendu et d'un autre mycoplasme contaminant (2 ^e cas).	Réponse du laboratoire faussement positive (1 ^{er} cas) ou erronée (2 ^e cas, réponse d'un mélange de mycoplasmes au lieu d'un mycoplasme en culture pure sur le prélèvement)	Bien respecter les conditions de travail en bonne aseptie, la contamination entre échantillons est un risque important en mycoplasmologie
Le laboratoire signale la présence d'un mycoplasme ainsi que d'un autre micro-organisme (bactérie ou champignon). Le MFdot confirme bien la présence du seul mycoplasme attendu.	Réponse correcte de la part du laboratoire. Cependant cette anomalie peut venir interférer sur le résultat final d'identification en le rendant impossible si la contamination est trop importante.	<ul style="list-style-type: none"> La contamination se situe très probablement au niveau des boîtes de gélose car elle est facilement repérable en MFdot sur le bouillon puisqu'elle entrave sa réalisation correcte Cette contamination est due soit à l'absence d'antibiotique ajouté aux géloses, soit aux géloses conservées trop longtemps et/ou cette contamination a lieu dans les étuves. Leur nettoyage régulier est impératif.
Aucun mycoplasme n'est mis en évidence par le laboratoire. Le MFdot confirme cette absence mais la réponse attendue était « présence » puisque l'aliquote initiale contenait des mycoplasmes à des titres en limite de détectabilité.	Réponse du laboratoire faussement négative.	Ce résultat peut s'expliquer statistiquement puisqu'en limite il y a 2 mycoplasmes par aliquote. Cependant si l'erreur se reproduit sur deux ou trois échantillons en limite de détection, il faut envisager un problème anormal de sensibilité du laboratoire, cette différence n'étant <i>a priori</i> pas liée au milieu utilisé pour ce qui concerne les milieux du commerce.