

# UN NOUVEAU CONCEPT DE DIAGNOSTIC RAPIDE DES *E. COLI* AVIAIRES ET D'ETUDE PRECOCE DE LEUR SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

<sup>1</sup>Contant Geneviève, <sup>1</sup>Beaupère Françoise, <sup>2</sup>Mathon Alain, <sup>2</sup>Bonal Francis et  
<sup>3</sup>Le Blanc Jean-Paul

<sup>1</sup> Serbio, Département de Microbiologie, 92, Gennevilliers, <sup>2</sup> Cabinet Vétérinaire des Drs Mathon et Bonal, 85, Boufféré, <sup>3</sup> Agro-Bio, 41, Villeny

## Résumé

Le diagnostic bactériologique de la colibacillose aviaire nécessite un isolement de 24h sur gélose. Le nouveau concept évite ce délai, il consiste : (1) à séparer et concentrer les bactéries des biopsies dans un gel, (2) à révéler leur activité enzymatique après 2 heures de culture, (3) à les dénombrer et à les récupérer pour réaliser l'antibiogramme (ATB).

La sensibilité du test de dépistage-numération est > 95 % après 2h d'incubation à 37°C ; celle du test d'identification d'*E. coli* est de 70 % après 4h (bactéries  $\geq 10^5$ /ml à partir de 262 pools d'organes).

L'ATB réalisé après récupération des *E. coli* de 282 lots de volailles a montré une bonne corrélation (exactitude : 85 %) avec l'ATB standard.

## Abstract

**A new concept for avian *E. coli* rapid detecting, identifying and early susceptibility testing to antibiotics.**

The bacteriological diagnosis of avian colibacillosis requires a 24 hour-agar isolation step. The new concept avoids this delay, it consists : (i) in separating and concentrating bacteria from biopsies in a gel. (ii) in revealing their enzymatic activity after a 2 hour-culture, (iii) in enumerating and recuperating them for susceptibility testing (ST).

The sensitivity of detection-enumeration test is > 95 % after 2 hours incubation at 37°C and the one of *E. coli* identification test is 70 % after 4 hours incubation ( $\geq 10^5$  bacteria/ml from 262 organ pools).

ST after *E. coli* recuperation from 282 lots of poultry was shown to be well-correlated (accuracy 85 %) with the standard method.

## Introduction

La colibacillose est la pathologie aviaire la plus fréquente. L'infection, généralement secondaire à une infection virale à tropisme respiratoire ou mycoplasmatique est le plus souvent systémique. Elle provoque fréquemment une mortalité source de pertes économiques importantes.

La prévention et le traitement de la colibacillose sont basés sur une antibiothérapie adaptée en fonction des résultats de la biologie.

Le diagnostic bactériologique repose sur :

- l'isolement de la bactérie en 24h sur gélose, à partir des différentes biopsies,
- l'identification d'*E. coli* basée sur la mise en évidence du métabolisme commun à toutes les souches d'*E. coli*,
- l'antibiogramme (ATB) en 24h sur gélose,
- des tests complémentaires pour caractériser la souche isolée comme pathogène ou non pathogène.

L'objectif principal est d'obtenir l'ATB précoce des souches pathogènes. Le nouveau concept de diagnostic que nous avons développé évite l'étape d'isolement de 24h qui précède la réalisation de l'ATB. Il est utilisable directement à partir de prélèvements provenant de volailles suspectes de colibacillose (Sojka et al., 1961 ; Cloud et al., 1985) ; il indique, dans un délai de 2 heures, la présence de bactéries ( $> 10^4$ /ml) et identifie *E. coli*. La numération permet de standardiser l'inoculum bactérien de l'ATB qui peut ainsi être interprété en même temps que le sérotypage.

## Matériels et méthodes

### 1. Réalisation du test rapide

10 à 12 oèses de 10  $\mu$ l des biopsies de différents organes : rate, foie, et coeur (RFC), poumon, trachée et vitellus ou autre (PTA) ou RFCPTA ont été ensemencées par flacon de milieu de prélèvement pour les volailles mortes d'une part, et pour les volailles malades du même lot d'autre part. Pour chaque flacon ensemencé, 3 tubes de dépistage-

numération des bactéries et 1 tube d'identification d'*E. coli* (*E. coli* FAST<sup>TM</sup> Agro-Bio, 41 - Villeny, F.) ont été testés, centrifugés 10 min. à 3000 g (4500 TPM) puis incubés 2h à 37°C. Le dépistage des bactéries a été positif dès le changement de couleur (du violet au rose ou à l'incolore) et l'identification d'*E. coli* dès l'apparition de la fluorescence du gel. En cas de négativité, l'incubation a été prolongée.

## 2. Réalisation de la méthode sur gélose considérée comme référence

Une oèse de biopsie de chacun des organes a été ensemencée directement sur géloses au sang, Drigalski et Chapman. Le dépistage des bactéries et l'identification d'*E. coli* ont été réalisés pour des volailles mortes d'une part, et des volailles malades du même lot d'autre part. Ils ont été positifs dès que  $\geq 10^2$  colonies étaient présentes pour au moins un des organes après 24h d'incubation à 37°C.

## 3. Réalisation de l'antibiogramme

L'antibiogramme a été réalisé par la méthode des disques sur gélose Mueller-Hinton après 24h d'incubation à 37°C :

- à partir de colonies isolées d'une part, selon le protocole habituel.
- à partir des bactéries récupérées du premier tube positif de dépistage-numération d'autre part. Après rejet du surnageant, le gel du tube a été repris en solution saline (NaCl 0.9 %) pour obtenir la solution concentrée de bactéries. La standardisation de l'inoculum a été effectuée par dilution de cette solution en tenant compte des résultats de la numération.

## 4. Réalisation du sérotypage d'*E. coli*

Le sérotypage (réactifs BioVac, 49 - Beaucozé et LDA, 22 - Ploufragan) a été réalisé à partir des colonies isolées d'*E. coli* sur gélose Drigalski ensemencée :

- soit directement à partir des biopsies par la méthode de référence.
- soit à partir des bactéries récupérées comme précédemment du tube d'identification d'*E. coli* positif.

## Principe du test rapide

Il est basé sur :

1. une centrifugation permettant :

- la séparation sélective des bactéries des autres composants des biopsies après leur ensemencement en milieu de prélèvement,

- la concentration des bactéries de l'échantillon dans la phase GEL d'un tube capillaire.

2. une incubation à 37°C permettant :

- la culture des bactéries au sein de la phase GEL contenant un milieu de culture adapté à leurs besoins,
- la révélation de l'activité des déshydrogénases bactériennes à l'aide d'un substrat chromogène (Walker et al., 1959) ou de l'activité de la glucuronidase d'*E. coli* à l'aide d'un substrat fluorogène (Trepeta et al., 1984) inclus dans la phase GEL.

Le changement de couleur est lu à l'oeil nu par rapport à une gamme de couleur et l'apparition de la fluorescence est lue sous une lampe UV.

En présence d'un test positif, les bactéries sont récupérées après élimination du surnageant pour réaliser l'ATB habituel. Après ajout de volumes variables d'échantillon, les bactéries dénombrées selon un abaque sont diluées de façon à standardiser l'inoculum bactérien.

## Résultats

Le test rapide a été effectué sur 262 pools d'organes de 121 lots de volailles, parallèlement à la méthode sur gélose. 30 % des lots étaient suspects de colibacillose à l'examen anatomopathologique.

### 1. Dépistage-numération des bactéries

92 % des biopsies étudiées contenaient  $\geq 10^2$  bactéries/ml et 70 %  $\geq 10^5$  bactéries/ml. La sensibilité du test rapide a été trouvée à 84 % en présence de  $\geq 10^2$  bactéries/ml, et a atteint 94 % en présence de  $\geq 10^5$  bactéries/ml après 2h d'incubation. La moitié des lots contenant  $\geq 10^5$  bact/ml a été positive dès 1h d'incubation. Les lots contenant  $10^4$  bact/ml (n = 4) ont pu être dépistés après 4h d'incubation.

Les cas de faux positifs ont tous été confirmés sur gélose après récupération des bactéries contenues dans le gel. Ces faux positifs étaient liés au mode d'ensemencement : biopsies directement sur gélose et biopsies en flacon de prélèvement sur tube ; donc à la probabilité de prélever les bactéries au niveau des lésions.

### 2. Identification d'*E. coli*

La fréquence d'isolement d'*E. coli* a été de 75 %. Il a été isolé seul (49 % des lots), associé à d'autres bactéries (11 % des lots) ou à d'autres souches d'*E. coli* (15 % des lots). La sensibilité du test de 86.5 % en présence de  $\geq 10^2$  *E. coli*/ml a atteint 97 % en présence de  $\geq 10^5$  *E. coli*/ml après

24h d'incubation. 40 % des pools contenant  $\geq 10^5$  *E. coli*/ml ont été positifs après 2h d'incubation et 74 % après 4h.

Environ 8 % des échantillons contenaient des souches d'*E. coli* "déficient" (Iritani et al., 1988 ; Pace et al., 1996) dont l'activité enzymatique de la glucuronidase était lente (détectable en 24h seulement ou non détectable).

Nous avons remarqué que ces souches étaient des souches typables, principalement O78K80.

Un décalage entre la positivité du test de numération et celle du test d'identification indique la présence d'une bactérie autre qu'*E. coli*, ou son association à *E. coli*, ou exceptionnellement la présence d'un *E. coli* déficient.

### 3. Antibiogramme (ATB)

L'étude de la sensibilité sur gélose à 9 antibiotiques a été réalisée après récupération des bactéries, comparativement à la méthode usuelle à partir de colonies isolées.

314 pools de biopsies de 184 lots de volailles n'ont comporté qu'une seule espèce bactérienne après leur récupération et 160 pools de biopsies de 98 lots de volailles ont comporté deux espèces.

Les résultats ont montré une concordance entre les deux méthodes de 85 % en présence d'une seule espèce bactérienne, et 86 % en présence de deux espèces (TABLEAU). La présence d'un inoculum trop riche explique les résultats ininterprétables. Les discordances les plus importantes ont été obtenues pour les antibiotiques les plus sensibles aux variations de l'inoculum.

### 4. Sérotypage :

Le sérotypage est réalisable quel que soit le mode d'ensemencement de la gélose. Les résultats sont similaires lorsqu'elle est directement ensemencée avec les biopsies (63 % de souches sérotypables) et après récupération des bactéries (58 % de souches sérotypables). Ces résultats dépendent de la probabilité de prélever les bactéries au niveau des lésions.

### Conclusion et discussion

Les cas de suspicion de colibacillose à l'examen anatomopathologique ont été confirmés dans les 2 à 4h par le test rapide de dépistage des bactéries et d'identification d'*E. coli*. Le test a aussi été positif dans 67 % des cas non suspects à l'examen des biopsies. Il a été de réalisation simple et pratique. Il a réduit le temps d'analyse et a permis un gain de 24h sur le rendu de l'antibiogramme.

### Références

- Cloud S.S., Rosenberger J.K., Fries P.A. Wilson R.A., Odor E.M. 1985. Avian diseases, 29, 1084-1093.
- Iritani B. and Inzana T.J. 1988. Journal of Clinical Microbiology, 26, 564-566.
- Pace M.A., Doyle M.L. Scantling M.K. and Waldroup A.L. 1996. General Meeting of the American Society for Microbiology, New Orleans, Louisiana, May 19-23.
- Sojka W.J. and Carnaghan R.B.A. 1961. Res. Vet. Sci., 2, 340-352.
- Trepeta R.W. and Edberg S.C. 1984. Journal of Clinical Microbiology, 19, 172-174.
- Walker H.W., Coffin W.J. and Ayres J.C. 1959 Food Technology, 13, 578-581.

**TABLEAU : Résultats de l'antibiogramme à partir de la récupération des bactéries (ATB Test), parallèlement à l'ATB Référence à partir de colonies isolées.**

ATB Test/Référence	Présence d'une seule espèce bactérienne		Présence de deux espèces bactériennes	
	Pools de biopsies	Lots de volailles	Pools de biopsies	Lots de volailles
Nombre	314	184	160	98
Concordance (%)	85	87	86.2	88
Discordances mineures : dm (%)	9.9	6.5	6.3	3
Discordances majeures : DM (%)	1.6	1.6	1.2	1
Discordances très majeures : DTM (%)	0	0	1.9	3
Ininterprétables (%)	3.5	4.9	4.4	5