Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE
ET DE LA PECHE

Direction Générale de l'Alimentation **Sous-direction de la santé et de la protection animale** **Sous-direction de la réglementation, de la recherche et de la coordination des contrôles** **Adresse : 251, rue de Vaugirard 75732 Paris cedex 15** Suivi par : Alexandre BLANC-GONNET Tél : 01 49 55 81 49 Fax : 01 49 55 49 61 Réf. Interne : NS méthode MCE IF 151007.doc	**NOTE DE SERVICE** **DGAL/SDSPA/SDRRCC/N2007-8262** **Date: 23 octobre 2007** Classement : OTA 38

Date de mise en application Immédiate
Annule et remplace : néant
Date limite de réponse : sans objet
Nombre d'annexe : 1 -
Degré et période de confidentialité : Aucune

Objet : Méthode d'identification de *Taylorella equigenitalis* par immunofluorescence indirecte à partir de prélèvements génitaux d'équidés

Bases juridiques : Articles D.223-1 et D.223-2 du code rural
Article R.202-17 du code rural

Résumé : La présente note de service référence la méthode d'identification de *Taylorella equigenitalis* par immunofluorescence indirecte à partir de prélèvements génitaux d'équidés

MOTS-CLES : Méthode officielle d'analyse – Equidés - Métrite contagieuse des équidés

DESTINATAIRES	
Pour exécution : - Directeurs départementaux des services vétérinaires - Laboratoires agréés	Pour information : - Préfets - Directeur de l'Ecole nationale des services vétérinaires - Directeur de l'INFOMA - AFSSA – Direction générale - AFSSA – LERPE - COFRAC

J’ai l’honneur de vous faire parvenir en annexe, le protocole de la méthode d’identification de *Taylorella equigenitalis* par immunofluorescence indirecte à partir de prélèvements génitaux d’équidés.

Méthode	Référence
méthode d’identification de *Taylorella equigenitalis* par immunofluorescence indirecte à partir de prélèvements génitaux d’équidés	LERPE/MCE-IF – version 01

Le dossier de validation de cette méthode, réalisé par le laboratoire national de référence en matière de métrite contagieuse des équidés (Agence française de sécurité sanitaire des aliments, Laboratoire d’études et de recherche sur recherches en pathologie équine – AFSSA/LERPE, site de Dozulé), peut être communiqué aux laboratoires agréés pour l’identification de *Taylorella equigenitalis* par immunofluorescence indirecte à partir de prélèvements génitaux d’équidés.

Monique ELOIT
Directrice Générale Adjointe
C.V.O.

ANNEXE
Identification de *Taylorella equigenitalis* par la méthode d'immunofluorescence indirecte à partir de prélèvements génitaux d'équidés

1. Domaine d'application

Le présent document décrit une technique destinée à permettre l'identification de *Taylorella equigenitalis*, agent de la métrite contagieuse équine (MCE) par immunofluorescence indirecte. Cette méthode s'applique à tous les prélèvements d'équidés susceptibles de contenir la bactérie, notamment ceux effectués à partir du tractus génital. Elle peut aussi s'appliquer aux souches bactériennes isolées par bactériologie selon la norme NF U 47-108.

2. Références normatives

NF U 47-108, *Méthodes d'analyse en santé animale – Isolement et identification de Taylorella equigenitalis à partir de prélèvements génitaux d'équidés* (indice de classement : U 47-108).

3. Principes et réactions

Le diagnostic par immunofluorescence indirect de *Taylorella equigenitalis* repose sur la fixation d'anticorps spécifiques à la surface de la bactérie provenant du prélèvement. La présence de corps bactériens avec une fluorescence typique sur leur bordure se visualise indirectement par la fixation d'anticorps secondaires (dirigés contre les immunoglobulines de l'espèce animale dont sont issus les anticorps spécifiques anti-*Taylorella equigenitalis*) conjugués à une molécule d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). La réaction est observée à l'aide d'un microscope à immunofluorescence.

Deux types d'anticorps spécifiques de *Taylorella equigenitalis* peuvent être utilisés, au choix du laboratoire agréé, pour réaliser ce diagnostic :

- choix A : anticorps polyclonaux fabriqués sur lapin
- choix B : mélange d'anticorps monoclonaux fabriqués sur souris

4. Diluants, réactifs, souches témoins, milieux de culture et autres produits

4.1. Diluants

- tampon phosphate pH (7,3 ± 0,1) de formulation courante sans ions Ca^{2+} et Mg^{2+} stérile (stérilisation pendant 15 min avec un autoclave à (121 ± 2)°C ou par filtration).
- solution de Bleu d'Evans diluée au 1/10000ème dans du tampon phosphate à partir d'une solution de Bleu d'Evans stabilisée à 1% (choix A).

4.2. Réactifs

- anticorps primaires spécifiques de *Taylorella equigenitalis* :
  - choix A : anticorps polyclonaux fabriqués sur lapin à diluer au 1/64ème dans du tampon phosphate
  - choix B : mélange d'anticorps monoclonaux fabriqués sur souris
- anticorps secondaires marqués à la FITC :
  - choix A : conjugué anti-IgG de lapin à diluer au 1/30ème dans la solution de Bleu d'Evans au 1/10000ème
  - choix B : conjugué F(ab)'$_2$ anti-immunoglobulines de souris

4.3. Souches témoins et milieux de culture

Chaque laboratoire doit posséder au moins une souche streptomycine-sensible et une souche streptomycine-résistante référencées ou isolées au laboratoire et convenablement identifiées.

Les milieux de culture employés sont identiques à ceux de la norme NF U 47-108 en vigueur.

4.4. Autres produits

- eau : la qualité de l'eau utilisée doit permettre une mise en œuvre satisfaisante de la technique décrite dans le présent document.
- acétone de qualité analytique à température ambiante *ou glacé (placer l'acétone au congélateur à une température ≤ - 18°C au moment de la préparation des échantillons. Pour une question de sécurité, ne pas conserver l'acétone à une température ≤ - 18°C une fois la manipulation terminée).*
- glycérine tamponnée pour immunofluorescence : 9 volumes de glycérol de qualité analytique pour 1 volume de tampon phosphate.
- huile à immersion pour microscope.
- dispositif de Mac Farland.

5. Appareillage et verrerie
Matériel courant de laboratoire de bactériologie et de biochimie, notamment :

- lame à cupules (2 x 5 cupules) de diamètre 7 mm.
- lamelles couvre-objet 25 x 60 mm.
- étuve à CO_2 (matériel recommandé) à (37 ± 2)°C ou matériel équivalent permettant de réaliser les conditions d'incubation requises pour la croissance des souches témoins.
- étuve sèche à environ 37°C ou matériel équivalent permettant de sécher les lames.
- chambre humide à environ 37°C ou matériel équivalent permettant de réaliser les conditions d'incubation.
- cuves à coloration en verre ou matériel équivalent permettant de réaliser les différents lavages, le tout devant être stérilisable.
- hotte chimique (sorbonne).
- congélateur à une température ≤ - 18°C ou ≤ - 65°C.
- enceinte réfrigérée à (5 ± 3)°C.
- microscope à épi fluorescence (objectifs 40 et 100 à immersion).

6. Echantillons

6.1. Ecouvillons

Les échantillons à traiter sont le plus souvent des écouvillons placés en milieu de transport de type Amies simple.

Les milieux de transport doivent être convenablement bouchés et expédiés au laboratoire, à l'abri de la lumière et dans des conditions qui permettent la réception des échantillons dans les 72 heures qui suivent la réalisation des prélèvements.

Lorsque la bactériologie et l'immunofluorescence sont mises en oeuvre simultanément, le milieu de transport et l'acheminement des prélèvements doivent respecter les contraintes requises pour la bactériologie (cf. norme NF U 47-108).

Les écouvillons de la fosse urétrale, du canal urétral, du fourreau, du liquide prééjaculatoire prélevé dans l'urètre ou du sperme constituent des prélèvements de choix chez l'étalon.

Les écouvillons du clitoris, des sinus clitoridiens, de l'utérus, du mucus vaginal ou du mucus cervico-vaginal (voire de placenta) constituent des prélèvements de choix chez la jument.

A la réception des échantillons (associés de commémoratifs), vérifier la date de réalisation des prélèvements et noter la présence et la nature du milieu de transport.

6.2. Souches pures
- souches témoins.
- éventuellement, souches isolées par bactériologie (cf. norme NF U 47-108).

7. Préparation de l'échantillon pour analyse

7.1. Ecouvillons
Ré-humecter l'écouvillon dans du tampon phosphate (faible quantité) puis l'essorer légèrement sur la paroi du tube à hémolyse pour enlever l'excèdent de milieu de transport qui pourrait gêner la lecture.

7.2. Souches pures
A partir de quelques colonies sur boite de Pétri ensemencée par quart à la pipette Pasteur, préparer une suspension bactérienne à 0,5 de Mac Farland dans du tampon phosphate pour chacune des souches témoins et éventuellement pour les souches isolées par bactériologie.

8. Mode opératoire

8.1. Réalisation du frottis
Utiliser des lames à cupules propres et soigneusement essuyées pour y déposer :
- témoin positif : 10 µl de suspension à 0,5 de Mac Farland de chaque souche témoin (1 souche par cupule),
- témoin négatif : 10 µl de tampon phosphate dans une cupule,
- échantillon : essuyer l'écouvillon par rotation (1 écouvillon par cupule) ou 10 µl de suspension à 0,5 de Mac Farland de chaque souche isolée par bactériologie (1 souche par cupule).

Il est recommandé de laisser une cupule vide entre chaque dépôt.

8.2. Fixation du frottis

- Sécher complètement les lames à l'air libre ou dans une étuve sèche à environ 37°C.
- Placer les lames dans un bain d'acétone, sous une hotte chimique, pendant 15 minutes.
- Sécher les lames à l'air libre ou dans l'étuve sèche à environ 37°C.

8.3. Test immunofluorescence indirect

8.3.1. Incubation de l'anticorps primaire

- Déposer dans les cupules témoin ou échantillon 20 µl d'anticorps polyclonaux anti- *Taylorella equigenitalis* prédilués (choix A) ou 30 µl d'anticorps monoclonaux anti- *Taylorella equigenitalis* (choix B).
- Incuber les lames 30 minutes en chambre humide à environ 37°C.

8.3.2. Lavage

- Rincer les lames avec un filet de tampon phosphate à l'aide d'une pissette.
- Placer les lames dans un bain de tampon phosphate pendant 15 minutes.
- Rincer les lames avec un filet d'eau à l'aide d'une pissette.
- Sécher les lames à l'air libre ou dans l'étuve sèche à environ 37°C.

8.3.3. Incubation de l'anticorps secondaire

- Déposer dans les cupules témoin ou échantillon 20 µl de conjugué anti-IgG de lapin prédilué (choix A) ou 30 µl de conjugué F(ab)'$_2$ anti-immunoglobulines de souris (choix B).
- Incuber les lames 30 minutes en chambre humide à environ 37°C.

8.3.4. Lavage

- Procéder comme en 8.2.2. en plaçant le bain de tampon phosphate à l'obscurité (par exemple, recouvrir les cuves à coloration de papier aluminium).

8.4. Lecture

- Monter les lamelles sur les lames à l'aide de la solution de glycérine tamponnée.
- L'observation se fait au microscope immunofluorescence (de préférence en chambre noire) en commençant par la lecture des témoins positif et négatif : première lecture en objectif adapté sec de 40 suivi d'une seconde lecture en objectif adapté en immersion de 100.

9. Expression des résultats

Les résultats seront notés en précisant le nom de l'animal, le site de prélèvement et l'importance du nombre d'éléments fluorescents spécifiques visualisés : **absence ou présence.**

Un résultat sera considéré comme négatif en l'absence d'éléments fluorescents.

Un résultat sera considéré comme positif en présence d'éléments fluorescents qu'ils soient rares (moins de 10 éléments), nombreux ou très nombreux.

Attention : en cas de suspicion de fausses fluorescences de germes n'ayant aucune parenté avec des souches de *T. equigenitalis*, il est nécessaire de :

- vérifier toutes les étapes de la manipulation ainsi que tous les réactifs, matériels et verrerie qui pourraient être contaminés par des microorganismes autres que *Taylorella equigenitalis*. En tout état de cause, il est nécessaire de stériliser régulièrement le matériel.
- réaliser une coloration de Gram à partir de l'écouvillon concerné pour vérifier la morphologie de la bactérie car la solution d'anticorps polyclonaux anti- *Taylorella equigenitalis* peut entraîner des réactions croisées avec des coques à Gram positif tels que *Streptococcus zooepidemicus* et *Staphylococcus aureus*.

10. Rendu des résultats

Les résultats doivent être rendus au maximum 72 heures après réception des prélèvements.

Tout résultat positif en immunofluorescence doit être confirmé par l'identification de *Taylorella equigenitalis* par bactériologie (cf. norme NF U 47-108). Pour ce faire, demander la réalisation de nouveaux prélèvements.

Lorsque la bactériologie est pratiquée concomitamment et que l'immunofluorescence est positive, le rapport d'analyse est établi à l'obtention du résultat de la bactériologie.

11. Conditions de conservation et élimination des échantillons

Les solutions d'anticorps non diluées sont aliquotées et conservées à une température ≤ - 18°C; les solutions diluées peuvent être conservées au maximum une semaine à (5 ± 3)°C.

Les souches témoins de *Taylorella equigenitalis* sont conservées à une température ≤ - 18°C ou une température ≤ - 65°C ou encore lyophilisées ; chaque souche doit être identifiée.

Les lames montées peuvent être conservées à (5 ± 3)°C à l'abri de la lumière durant 2 à 3 jours.

Les échantillons soigneusement identifiés sont conservés à (5 ± 3)°C, 8 jours au maximum et au minimum jusqu'au départ des résultats.