

### 3.3.2.5 Recherche de *Rhodococcus equi* au sol grâce aux lingettes

#### Matériel :

- 2 ou 3 Chiffonettes spécifiques *Grosseron*
- 2 ou 3 Piluliers en plastique identifiés

#### Méthode :

A l'aide d'une chiffonette spécifique *Grosseron*, nous récoltons les poussières sur un lieu de passage des chevaux et dans le box où le prélèvement d'air s'effectue. Les bactéries récoltées dans les poussières survivent et se multiplient dans la chiffonette imprégnée d'eau peptonée à 10 %. Ce liquide constitue un milieu de transport pour les bactéries.

Photographie n° 64: Réalisation d'un prélèvement avec une lingette sur une allée fréquentée par les poulains du haras H2



- Mettre les gants puis sortir la chiffonette de sa pochette et la déplier,
- Étaler la chiffonette sur la zone à prélever,
- Mettre en contact la chiffonette avec le sol en appuyant légèrement sur celle-ci afin de récupérer le maximum de poussières,
- Répéter la même opération,
- Enrouler la chiffonette et l'introduire dans le pilulier identifié.

### 3.3.2.6 Quantification de *Rhodococcus equi* dans les fèces

#### Matériel :

- Gants de fouille identifiés

#### Méthode :

Nous récoltons les fèces des juments et des poulains. Les fèces frais sont récoltés à l'aide de gants de fouilles en prenant soin d'en prélever à différents endroits du crottin pour une meilleure représentativité de l'échantillon. Nous n'avons pas prélevé les fèces par écouvillonnage rectal car cela présente un risque trop important de perforation rectale et nous avons toujours travaillé avec des crottins frais. Les prélèvements de crottins sont ensuite placés dans une glacière pour le retour au laboratoire.

### 3.3.3 Organisation d'une séance de prélèvement

#### 3.3.3.1 Opérations préliminaires

Avant chaque séance de prélèvement, nous téléphonons au haras pour rappeler notre visite. Pour ce qui est du matériel, nous chargeons la voiture le jour même des consommables et des pièces autoclavées au préalable. Ainsi les éléments constituant les 6 têtes des CIP et leurs 6 coupelles rotatives sont autoclavées la veille du jour de prélèvement. Les mousses rotatives nécessitent une préparation toute particulière.

#### 3.3.3.2 Préparation des mousses rotatives et détermination de leurs masses

La préparation des mousses est délicate. Nous avons suivi le protocole proposé par l'Institut National de Recherche et de Sécurité (fiche 085 Métropol) Nous présentons ici les étapes de cette préparation en prenant comme repère le jour J, jour du prélèvement.

##### *Matériels :*

- CIP 10 (Capteur Individuel de Poussières),
- Gants en nitrile (non talqués),
- Mousses en polyuréthane et leurs coupelles numérotées avec leurs couvercles respectifs numérotés,
- Pince,
- 1 Buse, 1 carter,
- Papier aluminium, Tournevis,
- Étuve à + 50 °C,
- Balance de précision au 10<sup>ème</sup> de milligramme (*Analytical Standard Ohaus®*),
- Eau déionisée et savon liquide.

##### *Protocole:*

##### *J-2*

- Laver les mousses à l'eau savonneuse tiède et les presser plusieurs fois pendant le lavage et les premiers rinçages. Rincer au moins 5 fois à l'eau déionisée filtrée,
- Laver séparément les coupelles avec leur couvercle,
- Faire sécher les mousses et les coupelles à l'étuve en les plaçant sur un plateau propre pendant 12 h à environ 50 °C.

J-1

- Placer les mousses propres dans une coupelle au moyen d'une pince,
- Ouvrir les coupelles et placer le couvercle sous la coupelle ouverte. Les mettre pendant 4 heures dans l'étuve à 50 °C,
- Conditionner ensuite les coupelles par un séjour d'une nuit dans le local de pesée.

J, 8h00

- Avant la pesée des coupelles, tarer correctement la balance,
- Peser chaque coupelle repérée et enregistrer la valeur affichée après amortissement des oscillations. Pour la pesée, disposer la coupelle sur le couvercle pour minimiser l'instabilité,
- Intercaler la pesée des coupelles servant de témoins dans la série de pesée des autres coupelles,
- Effectuer le relevé d'hygrométrie et de température de la salle de pesée,
- Consigner toutes les mesures sur la feuille de prélèvement.

### **3.3.3.3 Présentation d'une journée type de prélèvement**

Afin de comprendre le déroulement d'une journée de prélèvements, nous vous présentons ci-dessous les opérations menées à chaque séance ainsi que les horaires théoriques.

8h00 : Pesée des mousses rotatives avec la balance de précision,

9h : Montage des CIP au laboratoire pour le 1<sup>er</sup> prélèvement et chargement de la voiture,

9h30 : Départ,

10h : Arrivée dans le Haras,

10h15 : Fixation des CIP sur une jument suitée pour le prélèvement dans le paddock,

10h30 – 11h : Prélèvements de terre dans le paddock,

11h – 11h40 : Prélèvements dans le box des crottins des juments et poulains,

11h45 : Fin du prélèvement au paddock. Démontage des CIP et conditionnement des prélèvements. Préparation de nouvelles têtes de CIP,

12h : Fixation des CIP sur une jument suitée pour le prélèvement au box,

12h15 : Échantillonnage du sol du box avec une chiffonnette,

12h30 : Pause déjeuner,

13h : Chiffonnette dans l'allée principale, fréquentée par les juments et chiffonnette à l'entrée du box de gynécologie dans le haras H2,

13h30 : Fin du prélèvement au box. Démontage des CIP et conditionnement des prélèvements. Préparation de nouvelles têtes de CIP,

13h45 : Fixation des CIP sur une jument suitée pour le prélèvement dans le champ,

14h – 14h30 : Prélèvements de terre dans le champ,

14h30 – 15h10 : Prélèvements des crottins juments et poulains dans le champ,

15h15 : Fin du prélèvement au champ. Démontage des CIP et conditionnement des

prélèvements,

16h00 : Retour au laboratoire,

16h -18h00 : Traitements des prélèvements. Les prélèvements réalisés avec les CIP 10 M et CIP 10 MR, les lingettes ainsi que les prélèvements de fèces sont mis en culture. Les prélèvements de terre sont conservés à +4 °C pour être ensemencés le lendemain. Les mousses rotatives utilisées sur le terrain sont conditionnées en salle de pesée.

#### **3.3.3.4 Opérations de retour au laboratoire**

De retour au laboratoire, le matériel et les consommables sont rangés. La tarière Edelman, les pochettes Rhodopop, les lanières de fixation en cuir et les corps des CIP sont nettoyés puis désinfectés avec de l'Argospray®. Les volumes de BHI restant dans les coupelles métalliques des CIP 10 M et CIP 10 MR sont collectés à l'aide d'une pipette graduée puis déposés dans des tubes stériles identifiés. Les valeurs sont soigneusement notées. Ce volume intervient de manière déterminante dans le calcul de la concentration de *Rhodococcus equi* dans l'air. Ensuite, les éléments formant chacune des 6 têtes de CIP ainsi que les 6 coupelles métalliques sont nettoyés puis autoclavés pendant 45 minutes puis emballés dans du papier d'aluminium. Les mousses rotatives utilisées pour les prélèvements et les 3 témoins « terrain » ont été conditionnées fermées dans leur coupelle respective et dans un pot vissable de 200 ml. Ces pots sont ensuite stockés dans la salle de pesée. Le traitement des mousses débute le lendemain après la journée de prélèvement dans le haras H2 afin de pouvoir les traiter ensemble.

#### **3.3.3.5 Analyses des prélèvements au laboratoire**

##### **3.3.3.5.1 Analyse bactériologiques des prélèvements**

###### **3.3.3.5.1.1 Mise en culture des prélèvements de terre ou de fèces**

*Matériel :*

- Gants à usage unique,
- Balance,
- Bec bunsen,
- Eau distillée,
- Tube de plastique 50 ml à fond conique,
- Étuve et agitateur chauffant,
- Agitateur mécanique,
- Géloses Columbia ANC +5 % de sang de mouton,
- Micropipette Eppendorf® et cônes,
- Pipette râteau,
- Argospray®.

*Protocole :*

- Mettre 1 g de terre ou de fèces et 40 ml d'eau distillée stérile dans un tube à fond conique à usage unique de 50 ml,
- Mettre le tube 30 minutes à +37 °C sous agitation,
- Ensemencer une gélose Columbia ANC au sang de mouton avec 100 µl de la préparation
- Étaler avec une pipette râteau,
- Mettre la gélose à l'étuve pour 48 heures à +37 °C,
- Dénombrer les colonies de *Rhodococcus equi* sachant qu'une colonie isolée donne  $4.10^2$  *Rhodococcus equi* / g de terre,
- Isoler ces colonies sur gélose Columbia ANC au sang de mouton,
- Mettre la gélose à l'étuve pour 24 heures à +37 °C,
- Vérifier que les colonies sont bien des colonies de *Rhodococcus equi*.

*3.3.3.5.1.2 Mise en culture des prélèvements effectués avec les lingettes*

*Matériel :*

- Eau physiologique stérile (40 ml par chiffonette) à 8,5 g/l,
- Gélose sang + ANC (2 par lingette),
- Micropipettes de 100 – 1000 µl et de 10 – 100 µl et ses cônes,
- Gants,
- Portoir, étuve, agitateur chauffant, PSM et Bec Bunsen.

*Méthode :*

- Ajouter 40 ml d'eau physiologique stérile directement dans le tube contenant la chiffonette sous la PSM et Vortexer,
- Laisser sous agitation 30 minutes à + 37 °C,
- Vortexer puis réaliser des étalements de 100 µl et des isolements de 10 µl sur gélose ANC,
- Incuber 24 h à 48 h à + 37 °C.

### 3.3.3.5.1.3 Mise en culture des prélèvements d'air

#### Matériel :

- Pipettes graduées, pipettes Pasteur et pipeteur automatique,
- Petits tubes stériles en plastique et portoir,
- Micropipettes de 100 – 1000 µl et de 10 – 100 µl et ses cônes,
- Milieu BHI et gélose ANC + 5 % de sang de mouton,
- Bec Bunsen et PSM,
- Étuve.

#### Méthode :

- Récupérer le liquide dans la coupelle. Mesurer le volume à l'aide d'une pipette graduée et le transférer dans un petit tube en plastique stérile à boucher,
- Réaliser une dilution à  $10^{-1}$  dans un petit tube en plastique stérile (le plus souvent 100 µl de liquide dans 900 µl de BHI) puis à  $10^{-2}$  dans un autre tube stérile (100 µl de liquide de la dilution à  $10^{-1}$  dans 900 µl de BHI),
- Réaliser un étalement à partir de 100 µl à l'aide d'une pipette râteau sur gélose ANC + 5 % de sang de mouton pour chaque dilution (0 et -1),
- Pour les prélèvements issus de l'air total, ces étalements sont effectués en triplicata pour les dilutions  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$ ,
- Pour les prélèvements issus de l'air alvéolaire, ces étalements sont tous effectués en triplicata ( $10^0$ ,  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$ ),
- Incuber 24 h à 48 h à + 37 °C.

La lecture des toutes les boîtes ensemencées est quotidienne entre J+1 et J+4 après la mise en culture. Les résultats provisoires sont reportés sur un cahier de laboratoire. Une fois clairement visible, les supposées colonies de *Rhodococcus equi* sont repiquées sur une nouvelle gélose ANC +5 % sang de mouton. Une nouvelle lecture a lieu les jours suivants pour confirmation. Ensuite, les colonies de *Rhodococcus equi* isolées sont disposées dans des tubes et sont conservées dans un tube conique à PCR dans la souchothèque.

### 3.3.3.5.2 Analyse de la virulence de *Rhodococcus equi* par Polymerase Chain Reaction

L'analyse de la virulence de *Rhodococcus equi* a été réalisée grâce à la PCR dont le protocole est exposé dans la partie « Recherche et développement » au paragraphe 2.5.1.

### 3.3.3.6 Détermination de la concentration massique en aérosols

*Matériel* : Identique à celui utilisé pour la préparation des mousses rotatives et détermination de leurs masses (cf 3.3.3.2).

*Protocole* :

*J+1* :

- Munis de gants en nitrile, et sous un poste de sécurité microbiologique, ouvrir les coupelles et retirer à l'aide d'une pince les gros éléments qui auraient pu se déposer sur la mousse (brindille),
- Placer le couvercle sous la coupelle ouverte,
- Placer les coupelles ouvertes pendant 4 h à l'étuve à +50 °C,
- Conditionner ensuite les coupelles ouvertes par un séjour d'une nuit dans le local de pesée.

*J+2* :

- Procéder comme pour les pesées initiales en intercalant les pesées des coupelles témoins et celles des coupelles utilisées.

Un calcul permet ensuite de déterminer la concentration massique des aérosols dans l'air à partir de la différence de masse mesurée. Soient  $x$ , le numéro du prélèvement et  $Q_x$  la masse d'aérosol (en mg) prélevée sur la mousse en polyuréthane. Soit  $T_x$ , les masses des témoins. Soit  $\Delta T_x$  ou  $\Delta M_x$ , les variations de masse mesurées.

$$Q_x = \Delta M_x - 1/6 ((\Delta T_1 + \Delta T_2 + \Delta T_3) + (\Delta T_4 + \Delta T_5 + \Delta T_6))$$

Nous comptons donc 3 témoins communs à chaque haras : les témoins de pesée qui restent dans la salle de pesée. En outre chaque haras compte 3 témoins qui lui sont propres. Ces trois témoins sont emportés dans le haras lors de la séance de prélèvement. La concentration pondérale de l'aérosol dans l'atmosphère prélevée  $C_x$  (en  $g/m^3$ ) est exprimée ainsi :

$$C_x = Q_x / V \quad \text{où } V \text{ est le volume d'air prélevé exprimé en } m^3.$$

### 3.3.3.7 Constitution d'une souchothèque

Après leur mise en culture et leur isolement, chaque colonie de *Rhodococcus equi* est prélevée et placée dans un tube en plastique contenant des perles. Ce tube est ensuite identifié et conservé à -80 °C dans une souchothèque. La constitution de cette souchothèque permet un archivage de toutes les souches de *Rhodococcus equi* prélevées au cours de cette campagne. Cela permet de disposer de souches de *Rhodococcus equi* pour des expériences in vitro.

### **3.3.4 Mode de collecte des informations sur les chevaux**

#### ***3.3.4.1 Identité des chevaux***

Les informations concernant l'identité des chevaux ont été obtenues auprès des éleveurs. Nous avons ainsi collecté le nom, la date de naissance, le sexe et le statut de chaque individu ayant participé à l'étude qu'il soit jument suitée ou poulain. La majorité de ces informations a été collectée au cours de la première séance. Nous avons par la suite eu l'occasion de nous familiariser avec chaque individu que ce soit lors du ramassage des crottins ou lors de la fixation des appareils de prélèvement. Par la suite ces informations ont été compilées dans un tableau Excel puis envoyées au secrétariat de chaque haras afin de subir une dernière vérification.

#### ***3.3.4.2 Renseignements médicaux***

En ce qui concerne les informations médicales, celles-ci nous sont parvenues au fur et à mesure en suivant les poulains suspects de rhodococcose. À la fin de l'étude, les vétérinaires de la clinique de la Côte Fleurie nous ont transmis le dossier médical de chaque poulain ayant été affecté par la rhodococcose. Ce dossier comprend les signes cliniques observés, les modalités et la date du diagnostic, la nature et la durée du traitement, ainsi que résultats des examens hématologiques et biochimiques réalisés au début de la suspicion, lors du suivi et après la rémission.

### **3.3.5 Méthode de traitement des données collectées**

#### ***3.3.5.1 Résultats obtenus***

Nous avons présenté les résultats sous deux formes. La première est une fiche récapitulant les conditions climatiques, les résultats bactériologiques et de PCR pour les prélèvements dans le sol et dans l'air ainsi que les masses des mousses rotatives avant et après prélèvement. Il y a une fiche par séance et par haras, ce qui ne permet pas d'avoir une vision synthétique pour comparer des valeurs entre séances ou suivre une évolution sur toute la saison. En revanche, ces fiches se sont révélées très pratiques pour noter les résultats obtenus sur le terrain ou en laboratoire. Un modèle de cette fiche est présenté en annexe n° 6 avec les données collectées pour le haras H2 le 19 mai 2011. Ces résultats sont également consignés dans un cahier de laboratoire afin d'en garder une copie en cas de perte des feuilles de résultats. Enfin, l'intégralité des données a été compilée dans un tableau Excel. Ces tableaux sont présentés en annexes n° 7 à n° 19.



### 3.3.5.2 Exploitation des résultats et outils statistiques

L'utilisation de tableaux croisés dynamiques a parfois facilité la mise en évidence de tendances. Il s'agit de tableaux modulables qui permettent de hiérarchiser les données selon les paramètres définis. Les statistiques ont été réalisées grâce au logiciel Statel version 2.6. Ce logiciel intégré à Excel minimise ainsi les erreurs liées au transfert des données. La véracité et la justesse des calculs exécutés par ce logiciel sont conformes aux exigences du NIST (National Institute of Standards and Technology). Les conditions d'application ont été vérifiées avant la réalisation des tests statistiques. Il ressort que la limite de cette étude se dessine avec la non-indépendance des prélèvements réalisés. En effet, nous avons effectué des prélèvements dans une même surface à plusieurs localisations et profondeurs. Il est raisonnable de penser que cette non-indépendance est susceptible de majorer le seuil de significativité. Une analyse statistique avec une modélisation mixte aurait permis de s'affranchir de la non-indépendance de nos prélèvements. Nous avons défini « p » comme le seuil de significativité. Le risque d'erreur «  $\alpha$  » admis est de 0,05. Nous avons utilisé le test t de Student, le test de Shapiro-Wilk, le test d'indépendance du  $\chi^2$ , le test de Mann-Whitney, le test exact de Fisher, le test de Wilcoxon et le test du coefficient de corrélation de Spearman.

## 3.4 OBSERVATIONS

La campagne de prélèvements s'est correctement déroulée. La réalisation des mesures embarquées avec les CIP ne s'est à aucun moment révélée dangereuse pour les chevaux ou l'opérateur. Il s'est avéré parfois difficile de récupérer la jument porteuse des CIP lors des prélèvements en extérieur, entraînant parfois un allongement de la durée de prélèvement de 5 à 10 minutes. Cependant, cette augmentation de la durée ne représente absolument pas une limite pour l'exploitation de la mesure puisqu'elle représente une augmentation du volume d'air prélevé prise en compte lors des calculs de concentrations massiques en aérosols ou de concentration *Rhodococcus equi* dans l'air.