



Détection de *Mycoplasma synoviae* dans l'environnement de volailles expérimentalement ou naturellement infectées*

Corinne MAROIS, Fabienne DUFOUT-GESBERT, Isabelle KEMPF

AFSSA site de Ploufragan, Unité de Mycoplasmologie - Bactériologie, BP 53,
22440 Ploufragan, France

*Traduction de l'article "Detection of *Mycoplasma synoviae* in poultry environment samples by culture and polymerase chain reaction. 2000. *Veterinary Microbiology*. 73, 311-318".

RESUME

La détection de *Mycoplasma synoviae* (MS) par culture et par PCR a été réalisée avec succès à partir d'échantillons collectés dans l'environnement de dindes et de poulets expérimentalement infectés, et dans l'environnement de poules pondeuses naturellement infectées. Lors de l'infection expérimentale, 16/112 et 57/112 échantillons d'eau de boisson, de fientes, d'aliment, de plumes et de poussière ont été positifs respectivement par culture et par PCR-*Mycoplasma*. Dans les élevages de poules pondeuses, 7/28 et 17/28 prélèvements ont été positifs par culture et par PCR-*Mycoplasma*. Ces résultats confirment que MS a une grande capacité de dissémination dans l'environnement. De plus, la PCR semble un outil précieux pour l'analyse épidémiologique des mycoplasmoses aviaires.

SUMMARY

Detection of Mycoplasma synoviae in poultry environment samples by culture and polymerase chain reaction.

Successful detection of Mycoplasma synoviae by culture and PCR from samples collected in the environment of experimentally infected chickens and turkeys, or under field conditions, is described. Results showed that in the experimental infection, 16/112 and 57/112 samples of drinking water, droppings, food, feathers, and dust were positive by culture and Mycoplasma-PCR. In field conditions, the number of positive results for environmental samples were respectively 7/28 and 17/28. These observations highlight the high disseminating capacities of this mycoplasma and show the usefulness of the PCR method for epidemiological studies.

1. Introduction

Mycoplasma synoviae (MS) est un micro-organisme pathogène chez les volailles, potentiellement responsable d'infections respiratoires ou de synovite infectieuse. Les mycoplasmoses à MS peuvent entraîner des pertes économiques importantes liées aux saisies à l'abattoir, au coût élevé des traite-

ments antibiotiques souvent renouvelés et aux baisses de performances zootechniques, telles que des baisses de production d'oeufs commercialisables et des retards de croissance (Kleven, 1997).

Les mycoplasmoses aviaires peuvent être transmises soit verticalement, par l'oeuf, soit horizontalement, par contact direct entre animaux malades ou porteurs

latents et oiseaux sensibles. Une transmission horizontale indirecte, par l'intermédiaire de l'homme, des oiseaux sauvages, de l'eau de boisson, de la litière et de matériel d'élevage, joue peut être un rôle important dans l'initiation des mycoplasmoses à MS, notamment à cause de la persistance possible de MS dans l'environnement (Christensen et al., 1994).

Le but de ce travail était d'étudier la transmission indirecte de MS via l'environnement. Pour atteindre cet objectif, nous avons tout d'abord recherché la présence de MS ou de son ADN, respectivement par culture et par PCR, dans des prélèvements d'eau de boisson, de fientes, d'aliment, de plumes, de poussières voire de mouches ou de terre. Ces échantillons avaient été collectés dans l'environnement de poulets et de dindes expérimentalement infectées avec MS et dans l'environnement de deux élevages de poules pondeuses conventionnelles naturellement infectées par MS.

2. Matériel et méthodes

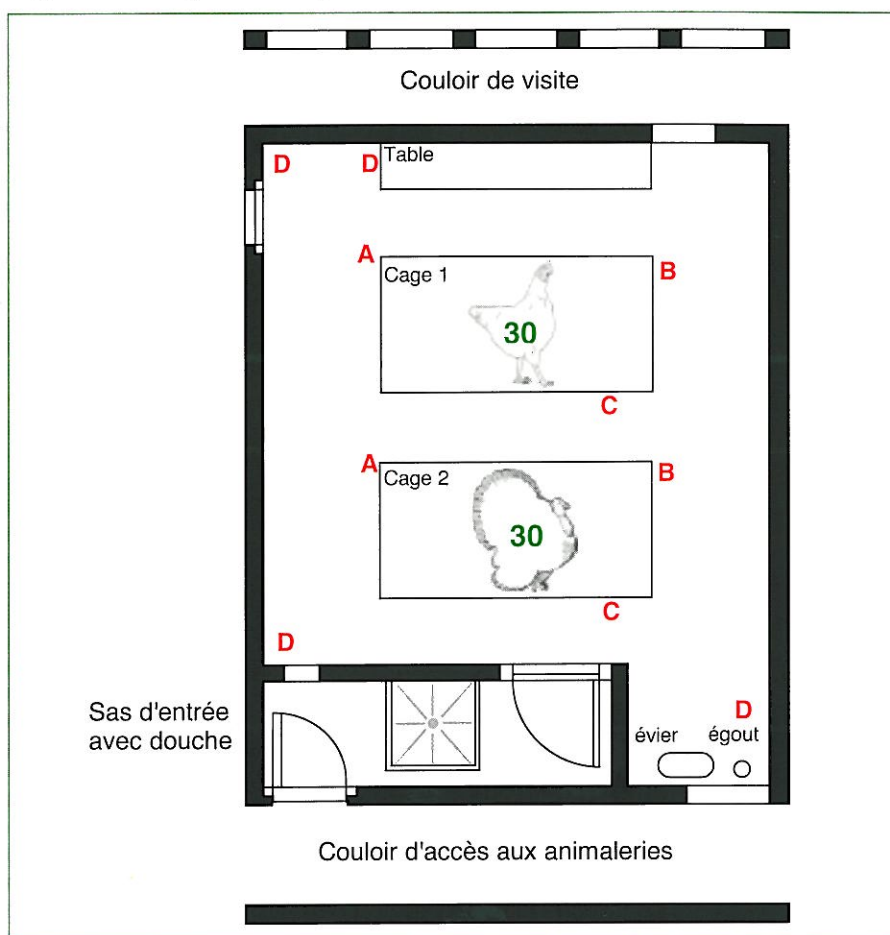
2.1. Infection expérimentale

Trente poulets et 30 dindes exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) produits dans l'Unité Expérimentale d'Aviculture de l'AFSSA-site de Ploufragan (France) sont inoculés par voie intratrachéale avec la souche MS 86122 (9×10^4 unités formant colonie par oiseau). Les animaux sont placés dans une même animalerie protégée, dans deux cages distinctes (une pour chaque espèce animale). Le dispositif expérimental utilisé est schématisé dans la Figure 1. Après chaque série de prélèvements, l'unité expérimentale est lavée avec de l'eau, les fientes sont éliminées et les mangeoires d'aliment sont réapprovisionnées.

Afin de confirmer l'infection des volailles, 9, 21 et 28 jours post-inoculation (PI) des écouvillons trachéaux sont prélevés sur 5 ou 10 poulets et sur 5 ou 10 dindes échantillonnés au hasard. Quarante et un jours PI, des écouvillons trachéaux sont collectés sur tous les oiseaux. Des écouvillons cloacaux sont également prélevés 28 jours PI sur 10 poulets et 10 dindes.

Des prélèvements environnementaux d'eau de boisson (25 ml), de fientes (15 g), d'aliment (15 g) et de plumes (2) sont collectés 13,

Figure 1 : Dispositif expérimental utilisé



21, 28 et 41 jours PI au niveau de chaque cage en 3 points opposés A, B et C. Des prélèvements de poussières sont également recueillis dans chaque coin de l'unité expérimentale, aux points D, à l'aide d'écouvillons. Pour les contrôles négatifs, de l'eau de boisson (25 ml), des fientes (15 g) et de l'aliment (15 g) sont collectés avant inoculation au niveau des cages renfermant les poulets et les dindes. De même, des prélèvements de poussières sont réalisés dans chaque coin de l'unité expérimentale avant inoculation.

2.2. Collecte des prélèvements dans l'environnement de deux élevages de poules pondeuses conventionnelles

Deux élevages de poules pondeuses conventionnelles sont sélectionnés sur la base de sérologies positives vis-à-vis de MS. Pour confirmer l'infection des poules pondeuses, 10 écouvillons trachéaux sont prélevés dans chaque élevage.

Dans l'élevage A, des prélèvements d'eau de boisson (40 ml), de fientes (15 g), d'aliment (15 g) et deux plumes sont collectés dans trois points distants. Au milieu du bâtiment d'élevage, un prélèvement de poussières (50 cm^3) est collecté et une mouche (*Musca domestica*) est capturée.

Dans l'élevage B, un prélèvement d'eau de boisson (80 ml) est collecté au bout d'une rangée de cages et 15 g d'aliment sont prélevés dans les mangeoires dans trois points opposés. Six prélèvements de poussière (50 cm^3 chacun) sont récoltés, en 6 points opposés. Trois échantillons de terre de 15 g chacun sont prélevés à l'extérieur du bâtiment d'élevage à proximité des bouches du système de ventilation.

2.3. Méthodes d'analyses

Tous les écouvillons sont placés dans 2 ml de milieu de transport pour mycoplasme. Les prélèvements de fientes, d'aliment, de poussière et de terre sont placés

dans 20 ml de milieu de transport et les plumes sont agitées dans 5 ml de milieu de transport. Tous les prélèvements environnementaux sont ensuite analysés par culture (Marois et al., 2000), par PCR-Mycoplasme (PCR-M) (van Kuppeveld et al., 1992) et par PCR-MS (PCR-MS) (Lauerman et al., 1993). Les écouvillons trachéaux sont analysés uniquement par culture et les écouvillons cloacaux sont analysés par culture et par PCR.

3. Résultats

■ 3.1. Détection de MS dans l'environnement de l'unité expérimentale

Tous les écouvillons trachéaux de poulets prélevés 9, 21 et 28 jours PI sont positifs par culture. Neuf jours PI, aucune des 5 trachées de dinde prélevées n'est colonisée par MS. Vingt et un et 28 jours PI, respectivement 6/10 et 9/10 dindes sont infectées par MS. Quarante et un jours PI, toutes les volailles sont colonisées par MS. Toutes les cultures et les PCR réalisées à partir des écouvillons cloacaux sont négatives.

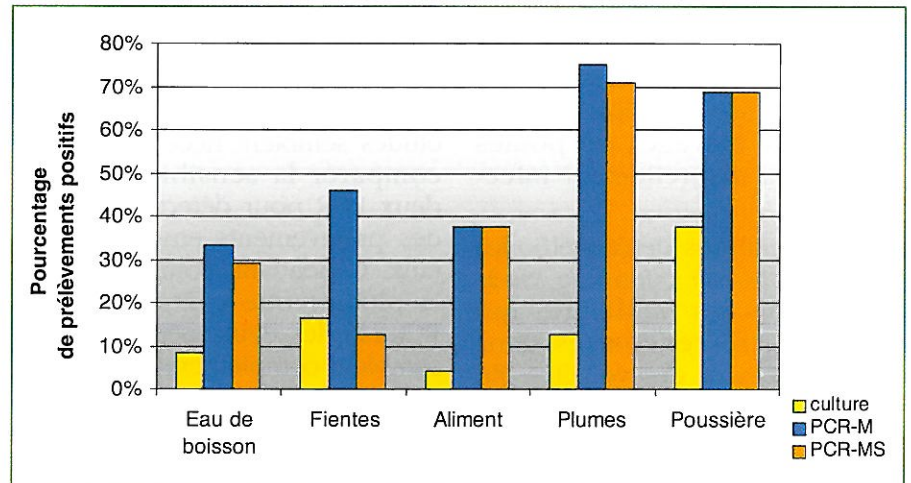
Les cultures de mycoplasme réalisées à partir des prélèvements environnementaux non dilués sont très souvent contaminées par des micro-organismes autres que des mycoplasmes (levures ou bactéries) rendant impossible l'isolement de MS.

Avant inoculation et 6 jours PI, aucun des prélèvements environnementaux ne renferme de cellules de MS cultivables, d'ADN de mycoplasmes ou d'ADN de MS.

Au cours de l'infection expérimentale, la culture, la PCR-M et la PCR-MS donnent respectivement 16, 57 et 47 résultats positifs sur 112 prélèvements environnementaux collectés 13, 21, 28 et 41 jours PI. Les résultats de la détection de MS dans les prélèvements environnementaux collectés 13, 21, 28 et 41 jours PI sont présentés dans la Figure 2.

Quarante et un jours PI, tous les prélèvements collectés dans

Figure 2 : Détection de MS dans l'environnement de l'unité expérimentale 13, 21, 28 et 41 jours après l'inoculation des poulets et des dindes.



l'environnement des poulets contiennent de l'ADN de mycoplasme. Les trois prélèvements de plumes de poulet renferment des cellules de MS cultivables. Dans l'environnement des dindes, un échantillon d'eau de boisson contient des cellules de MS, révélées par culture et PCR-M, alors que les 2 autres échantillons d'eau sont contaminés par des bactéries. De l'ADN de MS est détecté sur les plumes de dindes par PCR-M et par PCR-MS. Tous les autres prélèvements environnementaux collectés à proximité de la cage des dindes ne contiennent ni MS ni son ADN. MS est détecté dans la poussière collectée dans chaque coin de l'unité expérimentale par culture, PCR-M et PCR-MS.

■ 3.2. Détection de MS dans l'environnement des deux élevages de poules pondeuses

Dans les deux élevages de poules pondeuses, MS est détecté par culture sur tous les écouvillons trachéaux analysés. Les résultats de l'analyse des prélèvements environnementaux par culture, PCR-M et PCR-MS sont décrits dans le tableau 1.

Sept, 20 et 17 prélèvements environnementaux (sur 28 analysés) sont positifs respectivement par culture, PCR-M et PCR-MS.

Dans les 2 élevages, les prélèvements d'eau de boisson, de fientes, d'aliment, de plumes, de

Tableau 1 : Résultats de l'analyse par culture, PCR-M et PCR-MS des prélèvements environnementaux collectés dans deux élevages de poules pondeuses

	Culture	PCR-M	PCR-MS
Eau de boisson	1/4 ^a	1/4	1/4
Fientes	0/3	3/3	2/3
Aliment	0/6	6/6	6/6
Plumes	0/3	3/3	3/3
Poussière	5/7	5/7	4/7
Mouches (lavage)	0/1	1/1	1/1
Mouches (broyage)	0/1	0/1	0/1
Terre	1/3	1/3	0/3
Total	7/28	20/28	17/28

a Nombre de prélèvements positifs / nombre de prélèvements analysés

poussière et de terre ainsi que la solution de lavage de la mouche renferment de l'ADN de *Mycoplasma* (mis en évidence par PCR-M). Des cellules de MS cultivables sont aussi détectées dans des prélèvements d'eau de boisson, de poussière et de terre. Les cultures réalisées à partir des prélèvements non dilués de fientes, d'aliment, de poussière et de mouche sont contaminées par des micro-organismes autres que MS.

4. Discussion et conclusion

Les techniques utilisées dans cette étude (culture, PCR-M et PCR-MS) ont permis de détecter

respectivement des cellules de MS cultivables ou l'ADN de mycoplasmes ou l'ADN de MS dans des prélèvements environnementaux collectés dans une animalerie contenant des volailles expérimentalement infectées et dans deux élevages de poules pondeuses naturellement infectées.

La spécificité des deux méthodes PCR n'a pas été contrôlée vis-à-vis de tous les Mollicutes qui peuvent être rencontrés dans l'environnement des volailles. En effet, la PCR-M détecte toutes les espèces des genres *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Spiroplasma* et *Acholeplasma* potentiellement présents dans les prélèvements environnementaux (van Kuppeveld et al., 1992). Les résultats négatifs obtenus dans les conditions expérimentales, avant et dans les premiers jours suivant l'infection, nous laissent penser que les résultats positifs obtenus par la suite par PCR-M sont bien dus à MS.

Au cours de l'infection expérimentale, la culture, la PCR-M et la PCR-MS ont donné respectivement 16, 57 et 47 résultats positifs (sur les 112 prélèvements analysés). Dans les 2 élevages de poules pondeuses naturellement infectées, les nombres de résultats positifs étaient respectivement de 7, 20 et 17 (sur 28 prélèvements analysés). Le faible nombre de cultures positives obtenues à partir des prélèvements environnementaux peut être expliqué par des fréquentes contaminations par des bactéries ou des levures. Pour résoudre ce problème, une augmentation ou une modification de la concentration des inhibiteurs de bactéries, autres que mycoplasmes, dans le milieu de culture pourrait être testée. Les nombres de résultats positifs obtenus à l'aide des 2 techniques de PCR ne diffèrent pas significativement, que ce soit en condition expérimentale ou naturelle ($p > 0,05$; Test exact de Fisher). Cependant, van Kuppeveld et collaborateurs (1992) utilisant les amorces GPO1 et MGSO sur l'ADN chromosomique de *Mycoplasma pneumoniae* ont rapporté une limite de détection de 1 pg (10^{-12} g) après

électrophorèse (correspondant approximativement à 1000 cellules seules ou 1-10 UFC), alors que la PCR-MS, utilisant les amorces MS1 et MS2, montre une sensibilité d'environ 100 UFC (Lauerman et al., 1993). D'autres études semblent nécessaires pour comparer la sensibilité de ces deux PCR pour détecter MS dans des prélèvements environnementaux. Cependant, compte tenu de la plus grande spécificité de la PCR-MS, les deux méthodes nous semblent complémentaires.

Le principal inconvénient de la PCR est sa capacité à amplifier de l'ADN provenant de mycoplasmes viables et non viables alors que seuls les mycoplasmes viables sont une source potentielle d'infection. Une solution serait d'extraire et d'analyser l'ARN des mycoplasmes par transcription inverse associée à une PCR (Reverse transcription-PCR : RT-PCR) car, l'ARN étant peu stable, sa présence indique que la cellule est viable ou était viable très récemment. Ainsi, Gérard et al. (1998) et Kurabachew et al. (1998) ont développé des RT-PCR à partir de l'ARN ribosomal afin de détecter, respectivement, des cellules viables de *Chlamydia trachomatis* et de *Mycobacterium lepreae*.

L'utilisation de la PCR a permis de mettre en évidence la présence d'ADN de mycoplasmes dans différents prélèvements environnementaux. Six jours après le début de l'infection expérimentale, le nombre de mycoplasmes a probablement été inférieur au seuil de détection des tests PCR. Ceci pourrait être dû au faible nombre d'animaux colonisés 6 jours PI. Par ailleurs, parmi les divers types de prélèvements testés, de J13 à J41 PI, seuls les prélèvements d'aliment de dinde sont toujours restés négatifs, peut-être en raison d'infections respiratoires moins importantes chez les dindes comparées aux poulets.

Plusieurs prélèvements de fientes ont été positifs par culture et par PCR. Afin d'essayer de déterminer l'origine de la présence de MS dans les fientes, nous avons recherché ce mycoplasme par

culture et par PCR dans des écouvillons cloacaux prélevés sur 10 poulets et 10 dindes. Les résultats négatifs indiquent que le cloaque ou le tractus digestif ne semble pas colonisé par MS, ou que l'excrétion cloacale de MS est peut-être irrégulière ou intermittente. Il semble donc raisonnable de penser que les fientes ont été contaminées par voie aérienne comme les prélèvements de poussière, de plumes, d'aliment et d'eau. La transmission aérienne d'autres mycoplasmes, comme *Mycoplasma hyopneumoniae* chez le porc a déjà été mise en évidence par Stärk et al. (1998). Afin de limiter la transmission horizontale de MS il convient donc de contrôler tous les vecteurs potentiels d'air ou de poussière et notamment les supports inertes (eau, fientes, aliment, plumes, camions, œufs...) ainsi que les supports vivants tels que éleveurs, visiteurs, rongeurs et les insectes (mouches, ténébrions...).

La capacité de transmission aérienne des mycoplasmoses aviaires dépend de la persistance de MS, ou d'autres mycoplasmes pathogènes, dans l'environnement des bâtiments d'élevage. La durée de survie de quelques mollicutes pathogènes sur différents supports environnementaux a été étudiée par Christensen et al. (1994). Dans cette étude, la survie de MS a été évaluée à 8 h à 2 jours sur le coton, moins de 8 h sur le caoutchouc, 4 h dans les copeaux, 8 à 12 h sur le bois, et plus de 2 à 3 jours sur les plumes. Shimizu et al. (1990) ont montré que MS peut survivre jusqu'à 2 jours dans l'eau de puits supplémentée avec du sérum de cheval, ou dans un extrait de terre (50 %), et 51 à 77 jours à l'état sec à 4°C. Les résultats de notre étude nous laissent penser que la recherche par PCR de MS dans des prélèvements environnementaux pourrait permettre de confirmer l'efficacité des mesures de biosécurité (lavage, désinfection et vide sanitaire). Ainsi, avant l'introduction des nouveaux oiseaux, une investigation pourrait être envisagée pour confirmer l'absence de mycoplasme dans l'environnement.

Un autre point critique de la transmission horizontale de bâtiment à bâtiment, ou d'élevage à élevage, est la distance maximale que peuvent "parcourir" les cellules de mycoplasmes aéroporées. Nos observations ont montré que, en pratique, cette distance peut être très longue puisque MS est présent dans l'air ou les poussières qui peuvent être portés par des vecteurs tels que les insectes, les rongeurs ou le personnel de l'élevage. La transmission aérienne de *M. hyopneumoniae* a été observée entre

2 élevages de porcs distants de 3,2 km (Goodwin, 1985).

En conclusion, MS a pu être détecté par culture et par PCR dans des prélèvements environnementaux provenant d'oiseaux infectés expérimentalement ou naturellement. La variété de prélèvements environnementaux contaminés montre la grande capacité de diffusion de ce mycoplasme. Les techniques de biologie moléculaire décrites dans cette étude, devraient permettre de mieux comprendre et donc de mieux contrôler la transmission de MS.

Références bibliographiques

Christensen, N.H., Yavari, C.A., McBain, A.J., Bradbury, J.M., 1994. Investigations into the survival of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma iowae* on materials found in the poultry house environment. *Avian Pathol.* 23, 127-143.

Gérard, H.C., Branigan, P.J., Balsara, G.R., Heath, C., Minassian, S.S., Hudson, A.P., 1998. Viability of *Chlamydia trachomatis* in fallopian tubes of patients with ectopic pregnancy. *Fertil. Steril.* 70, 945-948.

Goodwin, R.F.W., 1985. Apparent reinfection of enzootic-pneumonia-free pig herds: Search for possible causes. *Vet. Rec.* 29, 690-694.

Kleven, S.H., 1997. *Mycoplasma synoviae* infection. In: Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., McDougald, L.R., Saif, Y.M. (Eds.), *Diseases of Poultry* 10th edition. Iowa State Univ. Press. Ames, IA, pp. 220-228.

Kurabachew, M., Wondimu, A., Ryon, J.J., 1998. Reverse transcription-PCR detection of *Mycobacterium leprae* in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1352-1356.

Lauerman, L.H., Hoerr, F.J., Sharpton, A.R., Shah,

S.M., van Santen, V.L., 1993. Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis.* 37, 829-834.

Marois, C., Dufour-Gesbert, F., Kempf, I., 2000. Detection of *Mycoplasma synoviae* in poultry environment samples by culture and polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 73, 311-318.

Shimizu, T., Nagatomo, H., Nagahama, K., 1990. Survival of several mycoplasma species under various conditions. In: Stanek, G., Cassell, G.H., Tully, J.G., Whitcomb, R.F. (Eds.), *Recent Advances in Mycoplasmaology*. Zbl. Bakt. suppl. 20, 950-952.

Stärk, K.D.C., Nicolet, J., Frey, J., 1998. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with a nested PCR assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 543-548.

van Kuppeveld, F.J., van der Logt, J.T., Angulo, A.F., van Zoest, M.J., Quint, W.G., Niesters, H.G., Galama, J.M., Melchers, W.J., 1992. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2606-2615. (erratum: 1993, *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 655).

MEF

Equipements

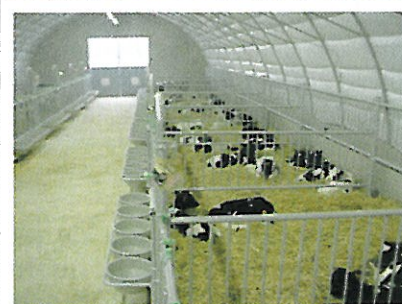
Au service de l'élevage
depuis 1978



Poulaillers ...



Porcheries ...



Tunnels ...

Z.I. Le Chanasson
RN 82- EPERCIEUX SAINT PAUL
Tél. 04 77 27 47 47
Fax 04 77 26 60 50