MISE AU POINT ET EVALUATION D'UNE TECHNIQUE PCR POUR LE DEPISTAGE DE *MYCOPLASMA MELEAGRIDIS.*

Moalic Pierre-Yves, Gesbert Fabienne et Kempf Isabelle.

CNEVA-PLOUFRAGAN. U.R. Mycoplasmologie-Bactériologie. B.P. 53. ZOOPOLE. 22440 PLOUFRAGAN.

Résumé

Mycoplasma meleagridis (MM) infecte uniquement la dinde et est responsable d'infections transmises par l'oeuf qui entraînent principalement des retards de croissance, des aérosacculites et des ostéodystrophies. Actuellement, le diagnostic des infections à MM repose principalement sur l'isolement du germe en culture ou sur les tests sérologiques (Agglutination rapide sur lame et ELISA). Du fait des difficultés inhérentes à la culture des mycoplasmes, nous avons envisagé la mise au point d'un test de mise en évidence de MM par amplification en chaîne par la polymérase (Polymerase Chain Reaction = PCR). Nous avons comparé les résultats obtenus à l'aide des techniques sérologiques et de détection de MM par culture ou par PCR lors du suivi de troupeaux de dindes. Les résultats ont montré que la PCR appliquée au dépistage de MM est une technique rapide, aussi spécifique et plus sensible que la culture. L'utilisation du contrôle interne durant l'amplification permet de garantir la valeur du résultat.

Abstract

Development and Evaluation of Polymerase Chain Reaction for Detection of *Mycoplasma meleagridis* Infection in Turkeys.

Mycoplasma meleagridis (MM) is characterized for its pathogenicity in commercial turkeys. As culture is time consuming and expensive and serology lacks sensitivity and specificity, a polymerase chain reaction (PCR) based-test for MM detection was evaluated and compared, under field conditions, to conventionnal methods including mycoplasma culture and serology, to check the mycoplasma status of turkey flocks.

Introduction

La France est le premier pays exportateur mondial de viande de dinde. Or, les infections à *Mycoplasma meleagridis* (MM) entraînent de graves pertes économiques pour cette production en raison des retards de croissance et des saisies en abattoirs. L'éradication de ces infections à transmission verticale nécessite de disposer de méthodes de dépistage très fiables permettant de contrôler le statut mycoplasmique des troupeaux de reproducteurs. Du fait de la qualité insuffisante des techniques sérologiques actuelles et de la lenteur et des difficultés inhérentes à la culture des mycoplasmes, nous nous sommes intéressés à la mise au point d'un test de mise en évidence de MM par amplification en chaîne par la polymérase (Polymerase Chain Reaction = PCR). Les résultats obtenus avec chacune des techniques ont ensuite été comparés lors du dépistage de l'infection mycoplasmique dans un troupeau de dindes du terrain.

Matériel et méthodes

1. Souches bactériennes et prélèvements du terrain

Mycoplama meleagridis

Les souches de référence : ATCC n°25294 et 8M92, sont utilisées ainsi que 3 souches "terrain" isolées en France : 7754, JLC et 94601B.

Autres mycoplasmes

Les espèces et souches suivantes sont utilisées : *M. synoviae* WVU 1853, 86122, K870; *M. iowae* : 3 souches de référence et 16 souches terrain; *M. gallinarum* PG16, *M. imitans* 4229, *M. colombinum* MMP1, *M. lipofaciens* R171, *M. iners* ATCC 15969, *M. glycophilum* 486, *M. gallopavonis* WR1, *Acholeplasma laidlawii* PG8, *A. axanthum* 5743.

Prélèvements du terrain

Une série de prélèvements a été réalisée sur un troupeau de dindes exempt d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) : 40 écouvillons trachéaux et 40 prises de sang ont été récoltés.

Deux séries de prélèvements ont été réalisées dans un élevage où les animaux présentaient des signes évocateurs d'une infection à MM. La première série a été réalisée sur les oiseaux alors âgés de 62 jours et la seconde sur les oiseaux du même lot âgés de 85 jours soit environ 3 semaines après. Lors de chaque série, nous avons prélevé 40 oiseaux et sur chacun de ces oiseaux, nous avons réalisé un écouvillonnage trachéal et une prise de sang.

2. Traitement des échantillons

2-1 Analyses sérologiques

Les sérums sont récoltés après centrifugation à 2000 g pendant 15mn puis sont testés d'une part par agglutination rapide sur lame (ARL), non dilués ou dilués au 1/5ème, avec un antigène MM (Sanofi, France). Seuls les sérums positifs après dilution au 1/5ème sont considérés réellement positifs.
D'autre part, les sérums sont testés à l'aide d'un test immunoenzymatique ELISA (Kit KPL ProFLOCK^R *Mycoplasma meleagridis* Turkeys, LSI, Savigny, France) selon les recommandations du fournisseur et l'interprétation (positif, douteux, négatif) est réalisée selon les indications fournies par le fabricant.

2-2 Préparation des lysats cellulaires

Dix microlitres du milieu de transport des écouvillons sont mis en culture sur milieu gélosé FM4 (Frey et al., 1968) à 37°C. Les colonies isolées sont identifiées par leurs caractères biochimiques et antigéniques.
Des lysats cellulaires sont préparés à partir de 1 ml de culture des souches listées précédemment et à partir du milieu de transport des écouvillons selon la méthode de Kellog et al. (1990). Après centrifugation des cultures ou du milieu de transport à 10000g pendant 20 minutes, le culot est repris dans 500 µl de tampon de lyse contenant de la proteinase K et du Nonidet P 40. L'ensemble est mis en incubation 1 heure à 60 °C, puis 5 mn à 95°C. Les lysats ainsi obtenus sont ensuite conservés à -20°C jusqu'à la PCR.

3. Contrôle interne

Un contrôle interne est construit de manière à être amplifié avec le même couple d'amorces que celles utilisées pour MM. Brièvement, le produit amplifié de MM est cloné et sa taille est modifiée par insertion d'un fragment d'ADN du phage lambda d'environ 500 paires de bases. L'amplification du mélange matrice plus contrôle interne produit donc deux fragments de taille différentes, visibles sur gel d'agarose (Moalic, non publié).

4. Conditions d'amplification

Les amorces retenues, MM90f et MM469r, sont choisies après alignement des séquences des gènes d'ARN ribosomiques 16S de MM et des principaux mycoplasmes de volailles (Boyle et al., 1995).
La réaction de PCR est réalisée dans un volume de 50µl contenant : 3 µl de lysat cellulaire, dNTP : 0.2mM, amorces : 0.8 µM, tampon enzymatique, 1 unité de Taq Polymérase (Boehringer Manheim) et 1000U de contrôle interne.
Les conditions d'amplification retenues sont : dénaturation : 15s à 95°C, annelage : 20s à 58°C, extension 15s à 75°C, pendant 40 cycles. La réaction est achevée par un annelage de 45s et une élongation de 5mn.
De l'eau distillée stérile est utilisée comme témoin négatif et de l'ADN purifié de MM ATCC n°25294 préparé selon Razin et al. (1983), comme témoin positif.
Le thermocycleur Perkin Elmer 9600 est utilisé pour la réaction d'amplification.
Les ADNs amplifiés sont visualisés, après électrophorèse de 10 µl du mélange PCR sur un gel d'agarose à 1%, sous lumière U.V. après coloration par le bromure d'éthidium (BET).

Résultats

1. Optimisation des conditions de PCR.

1-1 Spécificité.
La spécificité de la réaction PCR est évaluée vis-à-vis des souches de mycoplasmes précédemment citées. Seul l'ADN des souches de MM testées est amplifié.

1-2 Sensibilité.
La sensibilité de la PCR est d'abord évaluée sur ADN purifié; la limite de détection est atteinte pour 500fg d'ADN de MM ajouté par échantillon.
La sensibilité est ensuite évaluée sur des lysats cellulaires réalisés sur des dilutions décimales successives de culture de MM. Le seuil de détection est atteint pour 1 unité changeant couleur (UCC) ajoutée par échantillon.

1-3 Contrôle interne (CI)
La sensibilité et la spécificité de la PCR avec CI ainsi que la quantité de CI à ajouter dans chaque tube ont été évaluées. Une diminution de la sensibilité (environ 1 Log) sans modification de spécificité est observée lorsqu'on ajoute environ 1000 copies de CI par tube. Nous avons décidé d'ajouter 1000 copies de CI par tube pour la suite des amplifications.

2. Résultats obtenus sur les prélèvements du troupeau EOPS

Tous les écouvillons trachéaux réalisés sur les oiseaux EOPS sont négatifs en culture et en PCR. Tous les sérums, testés en ARL et en ELISA vis-à-vis de MM sont négatifs.

3. Résultats obtenus sur les prélèvements du troupeau infecté

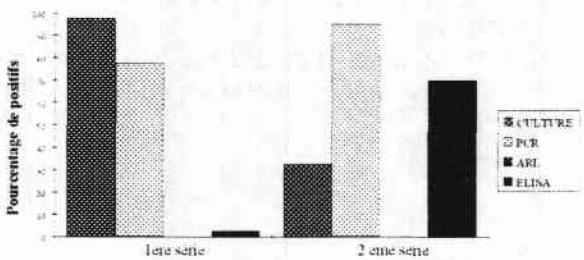
Trente neuf écouvillons trachéaux sur 40 (97%) sont positifs en culture lors de la première série de prélèvements. Seulement 32.5% (13/40) des écouvillons sont positifs en culture lors de la deuxième série.

Les lysats réalisés sur le milieu de transport de ces écouvillons sont positifs en PCR pour 77.5% et 95% d'entre eux respectivement pour la première et la deuxième série de prélèvements. L'utilisation du CI permet de contrôler l'absence d'inhibiteurs dans les échantillons négatifs : ceux-ci sont donc considérés comme des «vrais-négatifs».

Les agglutinations rapides sur lame sont négatives pour les deux séries de prélèvement. Le test ELISA est positif à J62 et à J85 avec un nombre de positifs plus important à J85 (1/40 à J62 et 28/40 à J85).

La figure 3 représente l'évolution des pourcentages d'échantillons positifs obtenus avec chacune des techniques lors des deux séries de prélèvements.

FIGURE 3 : Histogramme montrant l'évolution du pourcentage de positifs en fonction de la méthode utilisée.



Discussion

1. Optimisation du test PCR

Les tests de spécificité de la réaction PCR utilisée vis-à-vis des cultures ont montré que l'utilisation des amorces MM90f et MM469r permettait la détection spécifique de MM. Le seuil de détection de la PCR, 1 UCC par échantillon, avoisine la sensibilité théorique de la culture.

2. Evaluation de la PCR dans les conditions du terrain

Lorsque la PCR est utilisée en diagnostic, il est nécessaire de distinguer les échantillons réellement négatifs de ceux pouvant être inhibés. Pour détecter les «faux-négatifs», un contrôle interne a été mis au point et est ajouté dans chaque échantillon avant amplification. En absence d'amplification du CI, l'échantillon est dilué au 1/100ème avant d'être réamplifié. Dans notre étude, les échantillons négatifs en PCR sont de «vrais-négatifs». L'existence d'écouvillons positifs en culture et négatifs en PCR peut être due à une perte ou à une dégradation de l'ADN par les nucléases lors de la préparation de l'échantillon. Il semble donc nécessaire d'incorporer des contrôles dans chaque échantillon pour s'assurer de la bonne préparation des lysats cellulaires.

Pour évaluer la sensibilité et la spécificité du test PCR appliqué à des prélèvements réalisés sur animaux du terrain, nous avons défini comme réellement infecté un oiseau positif en culture, ou en ARL et/ou en ELISA.

Dans un premier temps, nous comparons les résultats obtenus en culture et en PCR.

Selon notre définition, le nombre d'oiseaux positifs en MM est de 39/40 (97.5%) lors de la première série de prélèvements et de 31/40 (77.5%) lors de la deuxième. La sensibilité, la spécificité, les valeurs prédictives positives (VPP) et négatives (VPN) de la culture et de la PCR ont donc été calculées et sont présentées dans le tableau 1.

TABLEAU 1 : Sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive (VPP) et valeur prédictive négative (VPN) de la culture et de la PCR réalisées sur les écouvillons trachéaux lors de la première et deuxième séries de prélèvements.

	CULTURE		PCR	
	1ère série	2ème série	1ère série	2ème série
Sensibilité(%)	100	42	79.4	100
Spécificité (%)	100	100	100	100
VPP (%)	100	100	100	100
VPN (%)	100	69	83	100

La spécificité de ces deux techniques appliquées lors de chaque série de prélèvements atteint 100%. Les écouvillons trachéaux mis en culture se révèlent positifs à J62 et J85. Cependant, une diminution du pourcentage d'écouvillons positifs lors de la deuxième série de prélèvements est constatée alors que le nombre d'écouvillons positifs en PCR ne diffère pas significativement entre les deux séries de prélèvements (Chi 2 =3.7, p = 0.04). Si la sensibilité de la culture passe de 100% lors de la première série de prélèvements à 42% lors de la

deuxième, la sensibilité de la PCR augmente de 80 à 100%. De nombreux facteurs peuvent gêner l'isolement des mycoplasmes : prélèvements conservés dans de mauvaises conditions, contamination par d'autres bactéries, traitement antibiotique récent des animaux..(Romero et al., 1995). La diminution du nombre de cultures positives lors de la deuxième série de prélèvements peut être due au traitement antibiotique administré aux animaux entre les deux séries de prélèvements ou à d'autres facteurs (présence d'anticorps, d'autres bactéries...) différant entre les deux séries de prélèvements et susceptibles d'exercer un effet négatif sur l'aptitude des mycoplasmes à être isolés en culture.
Certains inhibiteurs de la PCR (mucus, hémoglobine, phénol, SDS...) peuvent entrainer des résultats faussement négatifs après amplification (Roux, 1995, Ursi et al., 1994). Nos résultats montrent que le traitement antibiotique administré aux oiseaux n'influence pas le nombre d'échantillons positifs en PCR et les résultats obtenus à J85 montrent la grande sensibilité de la méthode PCR.
La VPP calculée pour les deux tests atteint 100% et indique qu'un résultat positif correspond à un oiseau infecté. La VPN de la culture, calculée lors de la première série de prélèvements est égale à 100% alors qu'elle n'est que de 70% lors de la deuxième série montrant ainsi l'incertitude existant sur un résultat négatif. La VPN de la PCR atteint 100% à J62 et J85, ce qui signifie qu'un résultat négatif en PCR correspond avec certitude à un oiseau non infecté.

Le dépistage sérologique de MM par ARL ne nous a pas permis de mettre en évidence de sérums positifs. Ce résultat est sans doute du à des problèmes de sensibilité de cette méthode pouvant être liés à la qualité de certains lots d'antigènes ou à des problèmes de conservation des sérums.

Les résultats que nous avons obtenus en ELISA montrent une très nette augmentation du nombre de sérums positifs lors de la deuxième série de prélèvements (1 sérum positif lors de la première série et 17 sérums positifs lors de la deuxième série), soit environ 4 à 5 semaines après l'apparition des premiers symptômes. Cette méthode permet donc de mettre en évidence l'apparition d'anticorps, mais de manière assez tardive.

Conclusion

En conclusion, la PCR pour le dépistage de *Mycoplasma meleagridis* est une technique aussi spécifique que la culture mais plus sensible lorsqu'elle est appliquée sur les écouvillons provenant du terrain. Si les cultures doivent être gardées au moins 3 semaines pour s'assurer d'un résultat négatif, la PCR donne un résultat négatif ou positif en quelques heures.
L'avantage de la PCR sur l'ELISA est la possibilité de mettre en évidence MM dès le premier jour de l'infection.
La décentralisation de cette technique vers les laboratoires de diagnostic sera rendue possible après automatisation de certaines étapes du protocole de traitement des échantillons et de révélation des produits amplifiés.

Références bibliographiques

Boyle, J. S., R. Good, and C. J. Morrow. 1995. J. Clin. Microbiol. 33:1335-1338.
Frey M. L., Hanson R. P., Anderson D. P., 1968. AM. J. Vet. Res., 29. 2163-2171.
Kellog, D. E., and S. Kwok. 1990. p. 339-343. In Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and T. J. White (ed.). PCR protocols : a guide to methods and applications. Academic Press, Inc., San Diego, CA.
Razin, S., R. Harasawa, and M. F. Barile. 1983. Int. J. Syst. Bact. 33:201-206.
Romero, C., M. Pardo, M. J. Grillo, R. Diaz, J. M. Blasco, and I. Lopez-Goni. 1995. J. Clin. Microbiol. 33:3198-3200
Roux, K. H. 1995. PCR Methods and Applications. 4:185-194.
Ursi, D., M. Ieven, H. Van Bever, W. Quint, H. G. M. Niesters, and H. Goossens. 1994. J. Clin. Microbiol. 32:2873-2875.