Evaluation de quatre techniques de prélèvement pour détecter *Mycoplasma hyopneumoniae* chez le porc vivant

Christelle FABLET, Corinne MAROIS, Virginie DORENLOR, Florent EONO, Eric EVENO, Typhaine POEZEVARA, Marylène KOBISCH, François MADEC, Nicolas ROSE

ANSES-Site de Ploufragan, B.P. 53, F-22440 Ploufragan

christelle.fablet@anses.fr

Assessment of four sampling methods to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* in live pigs

Four sampling techniques for *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp) detection, namely nasal swabbing, oral-pharyngeal brushing, tracheo-bronchial swabbing and tracheo-bronchial washing, were compared in naturally infected live pigs. Sixty (60) finishing pigs were randomly selected from a batch of contemporaries on a farm chronically affected with respiratory problems. Each pig was subjected to nasal swabbing, oral-pharyngeal brushing, tracheo-bronchial swabbing and tracheo-bronchial washing. Nested-PCR assays were performed on all samples. A Bayesian approach was used to analyze the nested-PCR results of the four sampling methods (*i.e.* positive or negative) and estimate the sensitivity and specificity of each method. Mhp was detected by nested-PCR in at least one sample from 70% of the pigs. The most sensitive sampling methods to detect Mhp in live, naturally infected, pigs were tracheo-bronchial swabbing and tracheo-bronchial washing, as compared to oral-pharyngeal brushing and nasal swabbing. Swabbing the nasal cavities appeared to be the least sensitive method. Our study indicated that tracheo-bronchial swabbing associated with Real-Time PCR could be an accurate diagnostic tool for assessing infection dynamics in pig herds.

INTRODUCTION

Mycoplasma hyopneumoniae (Mhp) étant l'agent central du complexe respiratoire porcin (Thacker, 2006), la détection de ce micro-organisme constitue un point crucial pour la compréhension des phénomènes influençant le développement des maladies respiratoires enzootiques chez le porc. Des méthodes rapides, faciles à mettre en œuvre en élevage et fiables sont donc indispensables pour les chercheurs et les vétérinaires praticiens en vue de prévenir ces maladies. En élevage, la contamination des porcs vivants est généralement évaluée au travers de tests PCR à partir d'écouvillonnage nasal.

Toutefois, des travaux expérimentaux indiquent que les sites de prélèvements optimaux pour détecter Mhp sont situés dans les parties profondes des voies respiratoires, *i.e.* la trachée et les bronches (Kurth *et al.*, 2002 ; Marois *et al.*, 2007).

L'objectif de cette étude est d'évaluer les capacités de quatre techniques de prélèvement pour détecter, par PCR-nichée, Mhp chez des porcs en élevage.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Echantillonnage et analyses de laboratoire

L'étude a été réalisée dans un élevage naisseur-engraisseur chroniquement atteint de maladies respiratoires.

Les prélèvements ont été effectués sur un échantillon de 60 porcs sélectionnés par tirage au sort au sein d'une bande en fin d'engraissement. Chaque porc a été soumis à quatre prélèvements : un écouvillonnage oro-pharyngé, un sondage trachéo-bronchique, un lavage trachéo-bronchique et un écouvillonnage nasal. Les échantillons oro-pharyngés ont été obtenus avec un écouvillon dont l'extrémité est de type

«brosse» muni d'un cathéter de protection (Ori Endometrial Brush™, Orifice Medical AB, Ystad, Sweden). Le sondage trachéo-bronchique a été effectué à l'aide d'un cathéter (Euromedis, Neuilly-sous-Clermont, France). La sonde a été introduite par voie buccale puis dans la trachée lors de l'inspiration du porc. Le lavage trachéo-bronchique a été réalisé par aspiration trans-trachéale de 10 mL d'une solution de 0,1 M de PBS, NaCl 0,15 M. Pour l'écouvillonnage nasal, les deux cavités nasales ont été prélevées à l'aide d'un écouvillon (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France).

Chaque prélèvement, à l'exception du liquide de lavage trachéo-bronchique, a été placé dans un tube contenant 2 ml d'eau peptonée tamponnée, identifié et transporté au laboratoire. Tous les prélèvements ont été analysés par PCR nichée (Calsamiglia *et al.*, 1999b). Les échantillons ont été classés en résultat de PCR-nichée positif ou négatif.

1.2. Analyses statistiques

Le statut infectieux des animaux étant inconnu et aucun test parfait (« gold standard ») n'étant disponible, la sensibilité des techniques de prélèvement a été évaluée en utilisant une approche Bayésienne (Berkvens *et al.*, 2006).

Ce type d'analyse permet d'évaluer les caractéristiques de tests de diagnostic en fonction des résultats de l'étude et des données antérieures à l'expérience (appelés *a priori*) sans avoir recours à un gold standard. Par rapport à l'approche classique par les fréquences, dans l'analyse Bayésienne, les paramètres d'intérêt sont des variables aléatoires et non des constantes. Ces paramètres possèdent une distribution de probabilité fonction d'informations disponibles avant l'expérience (appelés *a priori*) et par le théorème de Bayes il est possible d'en déduire une distribution de probabilité *a posteriori* qui tient compte des informations antérieures à

l'expérience et des informations apportées par l'expérience. Les distributions des paramètres ont été déterminées sur la base de données externes antérieures à l'étude (Calsamiglia *et al.*, 1999a; Kurth *et al.*, 2002; Marois *et al.*, 2007; Otagiri *et al.*, 2005; Verdin *et al.*, 2000). Des échantillons issus de porcs EOPS fournissant 100% de résultat négatif quelle que soit la méthode de prélèvement, la spécificité de chaque méthode a été fixée à 1 (Marois *et al.*, 2010; Marois *et al.*, 2007). L'influence du choix des distributions *a priori* sur les résultats a été évaluée en comparant trois modèles, allant d'un modèle avec des *a priori* peu informatifs (M1) à un modèle comportant des *a priori* plus informatifs (M3).

La convergence des modèles a été évaluée par les tests de Raftery et Lewis et la technique de diagnostic de Gelman-Rubin.

Les modèles ont été comparés sur la base du critère d'information sur la déviance, le nombre de paramètres estimés dans le modèle et la valeur du p-Bayésien.

Les analyses ont été conduites avec le logiciel WinBUGS.

2. RESULTATS

Mhp est respectivement détecté chez 13,3%, 40%, 53,3% et 60% des porcs par écouvillonnage nasal, oro-pharyngé, lavage trachéo-bronchique et sondage trachéo-bronchique.

Au total, 70% des porcs échantillonnés étaient positifs par au moins une technique de prélèvement. Quel que soit le modèle, l'écouvillonnage nasal présente la plus faible sensibilité et le sondage trachéo-bronchique la plus élevée avec respectivement 19 et 74% de sensibilité (Tableau 1).

Tableau 1 - Sensibilité moyenne et intervalle de crédibilité à 95% des quatre techniques de prélèvement pour détection de Mhp selon trois modèles utilisant différents *a priori* (60 porcs, spécificité=1 pour tous les modèles et les techniques)

Modèle*	Ecouvillonnage nasal	Ecouvillonnage oro-pharyngé	Lavage trachéo-bronchique	Sondage trachéo-bronchique
M1	0,19 (0,09-0,31)	0,51 (0,35-0,67)	0,66 (0,49-0,81)	0,72 (0,55-0,86)
M2	0,19 (0,09-0,32)	0,53 (0,38-0,68)	0,68 (0,53-0,82)	0,74 (0,59-0,86)
M3	0,25 (0,14-0,37)	0,53 (0,39-0,65)	0,62 (0,51-0,73)	0,73 (0,59-0,84)

*: M1: *a priori* vague sur Sensibilité, M2: *a priori* légèrement informatif sur la prévalence, M3: *a priori* légèrement informatif sur la prévalence et les paramètres à estimer

DISCUSSION - CONCLUSION

Les résultats suggèrent une augmentation graduelle de la capacité à identifier Mhp le long des voies respiratoires, la probabilité de détecter le micro-organisme chez des porcs infectés augmenterait avec la profondeur de prélèvement. Ces résultats concordent avec ceux obtenus lors d'infections expérimentales ou naturelles en élevage (Kurth *et al.*, 2002; Marois *et al.*, 2010 ; Marois *et al.*, 2007; Verdin *et al.*, 2000).

La meilleure capacité à identifier Mhp à partir du site trachéo-bronchique peut s'expliquer par les sites d'adhésion et de multiplication du micro-organisme que sont les cellules épithéliales de la trachée et des bronches (Blanchard *et al.*, 1992 ; Kurth *et al.*, 2002 ; Marois *et al.*, 2007).

Concernant les techniques de prélèvement au niveau trachéo-bronchique, Marois *et al.*, (2007) ont indiqué que la réalisation de lavages trachéo-bronchiques successifs sur le même porc pouvait avoir des conséquences sur la sévérité des lésions pulmonaires. Ainsi, afin de limiter les effets de la technique de prélèvement sur l'appréciation des lésions pulmonaires à l'abattoir, le prélèvement par sondage au moyen d'un cathéter stérile doit être privilégié.

Au regard des considérations pratiques, le sondage trachéo-bronchique se révèle être aussi facile à mettre en œuvre que l'écouvillonnage nasal et nécessite seulement un pas d'âne comme équipement supplémentaire. En étant 3,5 fois plus sensible que l'écouvillonnage nasal fréquemment utilisé en élevage, le sondage trachéo-bronchique permet d'améliorer la précision du diagnostic.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Berkvens D., Speybroeck N., Praet N., Adel A., Lesaffre E., 2006. Estimating disease prevalence in a Bayesian framework using probabilistic constraints. *Epidemiology*, 17, 145-153.
- Blanchard B., Vena M.M., Cavalier A., Le Lannic J., Gouranton J., Kobisch M., 1992. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.*, 30, 329-341.
- Calsamiglia M., Pijoan C., Bosch G.J., 1999a. Profiling *Mycoplasma hyopneumoniae* in farms using serology and a nested PCR technique. *J. Swine Health Prod.* 7, 263-268.
- Calsamiglia M., Pijoan C., Trigo A., 1999b. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11, 246-251.
- Kurth K., Hsu T., Snook E., Thacker, E., Thacker, B., Minion, F., 2002. Use of a *Mycoplasma hyopneumoniae* nested polymerase chain reaction test to determine the optimal sampling sites in swine. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 14, 463-469.
- Marois C., Le Carrou J., Kobisch M., Gautier-Bouchardon, A.V., 2007. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. *Vet. Microbiol.*, 120, 96-104.
- Marois C., Dory D., Fablet C., Madec F., Kobisch M., 2010. Development of a quantitative Real-Time TaqMan PCR assay for determination of the minimal dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 116 required to induce pneumonia in SPF pigs. *J. Appl. Microbiol.*, 108, 1523-1533.
- Otagiri Y., Asai T., Okada M., Uto T., Yazawa S., Hirai H., Shibata I., Sato S., 2005. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lung and nasal swab samples from pigs by nested PCR and culture methods. *J. Vet. Med. Sci.*, 67, 801-805.
- Thacker E., 2006. Mycoplasmal Disease, In: Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.) *Diseases of Swine*, 701-717, Iowa State University Press, Ames, USA.
- Verdin E., Saillard C., Labbé A., Bové J.M., Kobisch, M., 2000. A nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tracheobronchial washings from pigs. *Vet. Microbiol.*, 76, 31-40.