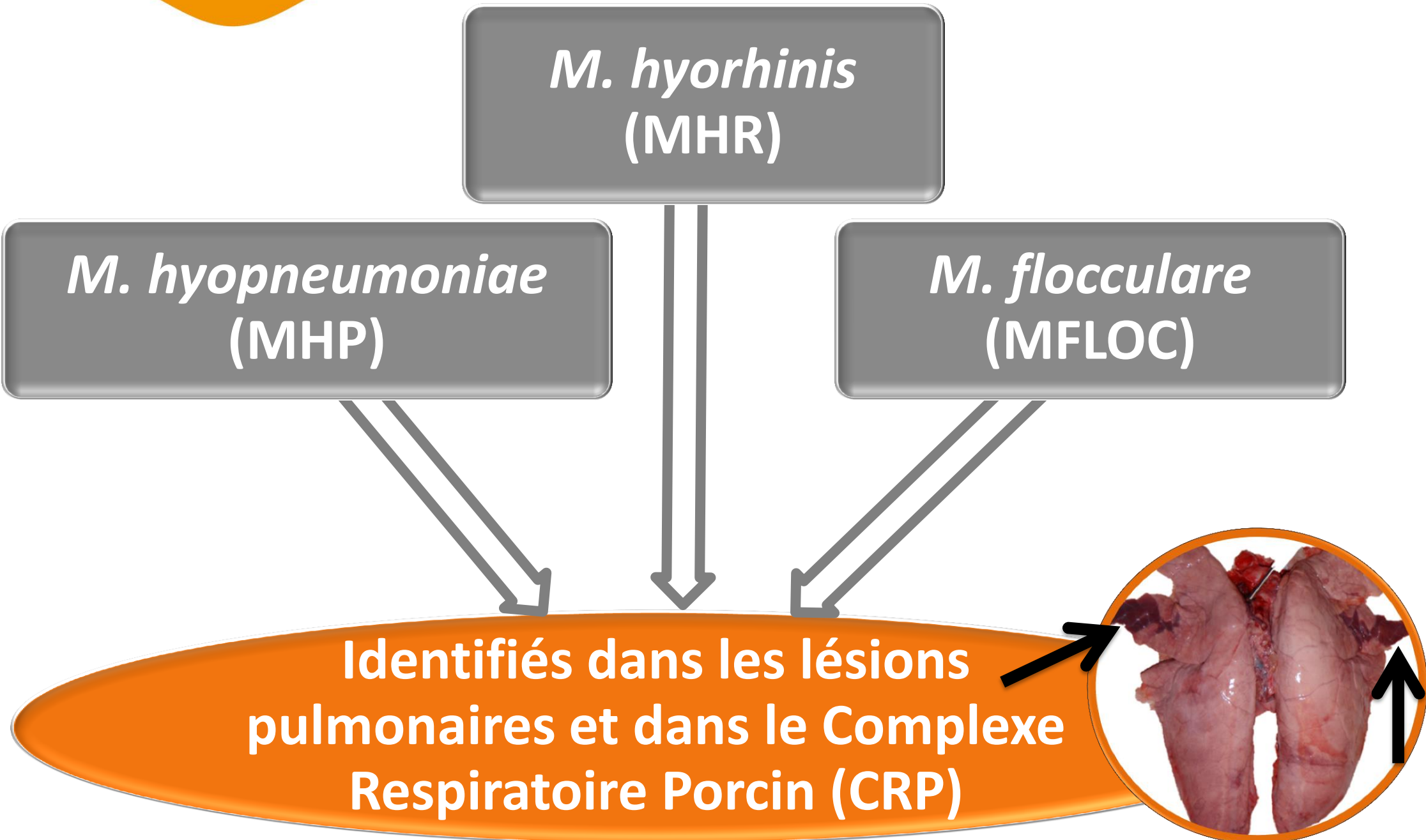


Développement d'une qPCR multiplex Taqman pour la quantification de *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* et *M. flocculare*

Sarah FOUROUR (1), Véronique TOCQUEVILLE (1), Christelle FABLET (2), Isabelle KEMPF (1), Corinne MAROIS-CREHAN (1)
Anses – Laboratoire de Ploufragan-Plouzané – UMB (1) – UEPEP (2), BP 53, 22 440 Ploufragan, France
sarah.fourour@anses.fr



Introduction



- ✓ L'impact de l'association entre MHP, MHR et MFLOC dans les pathologies respiratoires n'est pas connu → besoin de réaliser des études épidémiologiques
- ✓ Absence de méthode de quantification simultanée de MHP, MHR et MFLOC dans les prélèvements d'origine porcine

→ **Objectif** : mettre au point et valider un test qPCR multiplex Taqman pour quantifier MHP, MHR et MFLOC simultanément

- ✓ Séquences cibles définies à l'aide du logiciel Beacon-Designer™
- ✓ Spécificité vérifiée sur *in silico* et sur BLAST (<http://insilico.ehu.es/>) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)

MHP Gène cible : <i>p102</i> Fluorochrome : CY5	MHR Gène cible : <i>p37</i> Fluorochrome : TXR
MFLOC Gène cible : <i>fruA</i> Fluorochrome : FAM	CONTRÔLE INTERNE « Taqman® exogenous » Fluorochrome : VIC

Matériel et Méthodes

LINÉARITÉ & EFFICACITÉ	SPÉCIFICITÉ ANALYTIQUE	SENSIBILITÉ ANALYTIQUE	SPÉCIFICITÉ & SENSIBILITÉ DIAGNOSTIQUES	RÉPÉTABILITÉ
Coefficient de régression (R^2) et Efficacité (Eff %). Eff = $(E-1)*100$ avec $E = 10^{(-1/\text{pente})}$ ✓ 20 gammes de quantification de 10^7 à 1 fg/μL d'ADN	Capacité de la méthode à détecter les espèces cibles et non les autres espèces : ✓ Mycoplasmes cibles : 10 souches de MHP, 10 souches de MHR et 4 souches de MFLOC ✓ Autres espèces bactériennes : 26 mycoplasmes et 10 bactéries à paroi (dont 7 potentiellement présentes dans le CRP)	Dilution la plus élevée pour laquelle les analyses en duplicata sont positives : ✓ Dilution à partir de 10^7 fg/μL d'ADN de raison 10 ou demi :	Capacité de la méthode à détecter, ou non, une cible lorsqu'une méthode de référence la détecte, ou ne la détecte pas : ✓ 116 prélèvements (pulmonaires, amygdaliens, nasaux, trachéaux) • 45 positifs MHP^[1] • 30 positifs MHR^[2] • 5 positifs MFLOC^[3] • 36 négatifs^{[1] [2] [3]}	Coefficient de variation (CV %) = $(\text{écart-type} / \text{moyenne}) * 100$ ✓ Répétition inter-essai (x 3) et intra-essai (3 qPCR indépendantes) sur 24 prélèvements pulmonaires positifs en MHP et/ou MHR et/ou MFLOC.

Résultats

MHP $R^2 = 0,9991$ Eff = $99,9 \pm 2,36$ % 100 % (CY5 _{Ct max} : 40) ~ 10 mycoplasmes Spécificité : 100 % Sensibilité : 96 % CV _{max} : 8,9 %	MHR $R^2 = 0,9954$ Eff = $100,8 \pm 2,91$ % 100 % (TXR _{Ct max} : 30) ~ 100 mycoplasmes Spécificité : 100 % Sensibilité : 97 % CV _{max} : 4,4 %	MFLOC $R^2 = 0,9825$ Eff = $103,6 \pm 11,4$ % 100 % (FAM _{Ct max} : 35) ~ 10 mycoplasmes Spécificité : 100 % Sensibilité : 100 % CV _{max} : 8,2 %
--	--	--

Conclusion

- ✓ **Méthode sensible**
Bonnes linéarités et efficacités d'amplification des cibles permettant leur quantification dans un même prélèvement à partir d'une dizaine de cellules de MHP et MFLOC, et une centaine de MHR
- ✓ **Méthode spécifique**
Ne détecte que les espèces mycoplasmaïques cibles, même en présence d'autres mycoplasmes ou bactéries du porc; et absence de réactions croisées entre les trois cibles
- ✓ **Méthode répétable**
Bonne concordance entre les résultats inter- et intra-essai
- ✓ **Contrôle interne**
Garantie l'absence d'inhibiteurs de PCR dans les prélèvements et donc l'absence de résultats faussement négatifs

[1] Marois *et al.*, 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, 1523-33.
[2] Stakenborg *et al.*, 2006. A Multiplex PCR to Identify Porcine Mycoplasmas Present in Both Cultures. Vet. Res. Commun., 30, 239-247.
[3] Tocqueville *et al.*, 2014. Multilocus Sequence Typing of *Mycoplasma hyorhinis* Strains Identified by a Real-Time TaqMan PCR Assay. J. Clin. Microbiol., 52, 1664-1671.