Comparaison de la PCR simple et de la PCR nichée pour détecter *Mycoplasma hyopneumoniae* chez le porc vivant

Corinne MAROIS (1), Laëtitia LE DEVENDEC (1), Christelle FABLET (2), Virginie DORENLOR (2), Florent EONO (2), Eric EVENO (2), Jean-Pierre JOLLY (2), François MADEC (2), Marylène KOBISCH (1)

(1) AFSSA site de Ploufragan, Unité de Mycoplasmologie Bactériologie, BP53, 22440 Ploufragan
(2) AFSSA site de Ploufragan, Unité d'Epidémiologie et Bien-Etre du Porc, BP53, 22440 Ploufragan

c.marois@ploufragan.afssa.fr

INTRODUCTION

Mycoplasma hyopneumoniae (Mhp) est l'agent étiologique primaire du Complexe Respiratoire Porcin. Ce complexe concerne les élevages industriels du monde entier et engendre des pertes économiques considérables (Thacker, 2006). La culture de Mhp est lente et difficile, et d'autres espèces bactériennes présentes dans les prélèvements, réduisent les chances d'isoler le mycoplasme (Thacker, 2006). Afin d'améliorer la spécificité et la sensibilité des méthodes de détection, des tests PCR « simple » et « nichée » ont été développés (Blanchard et al. 1996 ; Verdin et al. 2000 ; Calsamiglia et al. 1999 ; Kurth et al. 2002).

L'objet de la présente étude est de comparer les résultats d'analyses obtenus par deux tests PCR, simple vs nichée. L'investigation a été réalisée dans cinq élevages naisseurs-engraisseurs en Bretagne dont les animaux étaient atteints de pneumopathies à des degrés divers.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. Protocole d'échantillonnage en élevage

Cinq élevages « naisseurs-engraisseurs », dont les profils diffèrent au regard de la pathologie respiratoire, ont fait l'objet de cette étude (élevages 0 à 4). Dans chaque élevage, 60 porcs ont été suivis, depuis le post-sevrage jusqu'à l'abattoir. Des écouvillonnages nasaux, amygdaliens et oropharyngés ont été effectués chez les porcs de 4, 10, 16 et 22 semaines d'âge.

A l'abattoir, l'étendue des lésions observées au niveau des poumons a été estimée selon le score défini par Madec et Derrien (1981). Des lobes pulmonaires (cardiaques droits, avec ou sans lésion macroscopique) ont été prélevés et soumis à l'analyse.

1.2. Analyses par PCR simple et PCR nichée

Tous les prélèvements ont été analysés par PCR simple et PCR nichée. Les ADNs ont été préparés par lyse chimique et thermique (Marois et al. 2004). Le test PCR simple a été réalisé uniquement avec les amorces internes (Hp4/Hp6) de la méthode décrite par Verdin et al. (2000). La PCR nichée a été décrite par Calsamiglia et al. (1999). Les résultats obtenus dans chaque élevage ont été comparés à l'aide du test du χ_2 ($n > 5$) et du test exact de Fisher ($n \leq 5$). Les différences ont été estimées significatives lorsque $p < 0,05$.

2. RESULTATS

Les tableaux 1 et 2 résument les résultats d'analyse obtenus par les deux tests PCR à l'élevage et à l'abattoir. A l'élevage, les porcs ayant au moins l'un des trois prélèvements positifs par PCR ont été considérés positifs vis à vis de Mhp. Les analyses statistiques, ont montré que la différence entre les résultats obtenus par PCR simple et PCR nichée, à partir des prélèvements réalisés à l'élevage (indépendamment de l'âge des porcs) et à l'abattoir, était significative ($p < 0,05$). Ces résultats montrent également que le nombre de porcs positifs augmente avec l'âge (4 sem vs 22 sem) et ceci quelle que soit la sévérité de la pathologie respiratoire. D'autre part, il faut noter que le nombre d'animaux positifs (PCR nichée) dans l'élevage 0 (le moins atteint) et dans l'élevage 4 (le plus atteint) est analogue. Mhp est l'un des seuls contaminants respiratoires de l'élevage 0 alors que de nombreux agents infectieux, dont Mhp, sont présents dans l'élevage 4. Mhp est également présent dans les trois autres élevages, en association avec d'autres bactéries ou des virus.

Une corrélation a été observée entre la sévérité de la pneumonie à l'abattoir et le pourcentage de porcs détectés positifs par PCR nichée (Tableau 2).

Tableau 1 - Résultats d'analyse des prélèvements réalisés en élevage

	âge des porcs (s)	Résultats d'analyse		
		n	PCR simple	PCR nichée
élevage 0	4	60	0	8
	10	60	0	2
	16	60	1	15
	22	60	0	32
élevage 1	4	60	1	4
	10	59	1	2
	16	58	0	0
	22	56	0	7
élevage 2	4	60	0	1
	10	59	0	1
	16	57	0	6
	22	56	0	8
élevage 3	4	60	0	0
	10	56	0	0
	16	56	0	0
	22	56	12	30
élevage 4	4	60	0	4
	10	58	0	13
	16	57	1	26
	22	57	15	37
Total		1165	31 ^a	196 ^b

^{a,b} : différence significative à $p < 0,05$

n : nombre de porcs

s : semaines d'âge

3. DISCUSSION ET CONCLUSION

La plus grande sensibilité de la PCR nichée est confirmée. Le seuil de détection de la PCR simple est de 100 à 1000 mycoplasmes alors que celui de la PCR nichée est d'environ 10 mycoplasmes (Calsamiglia et al. 1999).

Tableau 2 - Résultats des observations macroscopiques et des analyses réalisées à partir des poumons collectés à l'abattoir

	Pneumonie		Résultats d'analyse		
	% poumons indemnes	Score moyen /28 (σ)	n	PCR simple	PCR nichée
élevage 0	84	0,2 (0,58)	59	0	28
élevage 1	22,2	3,5 (3,8)	55	11	42
élevage 2	36,4	1,8 (2,0)	56	0	15
élevage 3	2,5	11,8 (6,9)	53	50	52
élevage 4	0	10,7 (5,7)	57	16	48
Total	-	-	280	77 ^a	185 ^b

^{a,b} : différence significative à $p < 0,05$

n : nombre de porcs

Cependant, l'utilisation en routine de ce test, réalisé au laboratoire dans deux tubes distincts, doit être effectuée avec beaucoup de précaution : la PCR nichée, correspondant à une succession de deux PCR (une fraction des produits PCR générés par la première réaction sert de matrice pour la deuxième PCR), une contamination peut survenir entre les deux étapes du test. Lors de l'ouverture du tube PCR issu de la première réaction, des aérosols chargés de produits amplifiés peuvent être libérés et contaminer l'environnement.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient la Région Bretagne, le Comité Régional Porcin et les industriels de la pharmacie vétérinaire « Santé Animale » (Boehringer Ingelheim, Fort Dodge, Intervet, Pfizer et Schering-Plough) d'avoir financé l'étude.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Blanchard B., Kobisch M., Bove J.M., Saillard C., 1996. Polymerase chain reaction for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in tracheo-bronchiolar washings from pigs. Mol. Cell. Probes., 10, 15-22.
- Calsamiglia M., Pijoan C., Trigo A., 1999. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. J. Vet. Diagn. Invest., 11, 246-251.
- Kurth K.T., Hsu T., Snook E.R., Thacker E.L., Thacker B.J., Minion F.C., 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.
- Madec F., Derrien H., 1981. Fréquence, intensité et localisation des lésions pulmonaires chez le porc charcutier. Journées Rech. Porcine, 13, 231-236.
- Marois C., Bougeard S., Gottschalk M., Kobisch M., 2004. Multiplex PCR assay for detection of *Streptococcus suis* species and serotypes 2 and 1/2 in tonsils of live and dead pigs. J. Clin. Microbiol., 42, 3169-3175.
- Thacker E.L., 2006. Mycoplasmal diseases. In : B. E. Straw, S. D'allaire, W. L. Mengeling and D.J. Taylor (Eds), Diseases of Swine, 9th ed., 701-717. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Verdin E., Saillard C., Labbe A., Bove J.M., Kobisch M., 2000. A nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tracheo-bronchiolar washings from pigs. Vet. Microbiol., 76, 31-40.