

ETUDE EXPERIMENTALE DE LA TRANSMISSION INDIRECTE DES MYCOPLASMOSES AVIAIRES*

Corinne Marois¹, JP. Picault² et Isabelle Kempf¹

RESUME : Une méthode PCR multiplexe et une méthode de RT-PCR multiplexe sont développées pour la détection des genres *Mycoplasma*, *Acholeplasma* et *Spiroplasma* et de l'espèce *Mycoplasma synoviae*. La deuxième technique permet la mise en évidence dans l'environnement des cellules mycoplasmiques viables ou très récemment mortes (depuis moins de 20 minutes). Ces tests sont appliqués lors de trois essais pour démontrer que les cellules de *M. synoviae* présentes dans l'environnement peuvent infecter les jeunes poulets. La stabilité de *M. synoviae* dans l'environnement après élimination des oiseaux infectés est évaluée à 4 à 6 jours par culture et RT-PCR. Dans le troisième essai, des échantillons de poussière, de plumes et d'aliment prélevés dans un élevage de poules pondeuses infectées par *M. synoviae* se sont avérés pouvoir contaminer des poussins. Les mesures de prophylaxie sanitaire doivent donc être très rigoureusement appliquées pour limiter les risques de diffusion d'une infection ou éliminer *M. synoviae* d'un élevage.

SUMMARY : The study describes a multiplex polymerase chain reaction (PCR) and a multiplex reverse transcription (RT) - PCR for the detection of *Mycoplasma*, *Spiroplasma* and *Acholeplasma* genera and *Mycoplasma synoviae* species. The latter technique enabled detection of viable or recently (less than 20 minutes) dead mycoplasmas in environment. The tests were applied during three experimental assays to demonstrate that *M. synoviae* can be transmitted to young chickens via the environment. The stability of *M. synoviae* in environment after the elimination of infected chickens was evaluated between 4 and 6 days by culture and RT-PCR. In the third assay, fomites collected in a farm containing laying hens infected by *M. synoviae* could infect chickens. Therefore, biosecurity measures (cleaning, disinfection and emptiness) must be rigorously applied to avoid *M. synoviae* indirect transmission. Mycoplasmas culture, multiplex PCR and multiplex RT-PCR can be used for epidemiology studies and control of decontamination before introduction of new birds.



I - INTRODUCTION

Les mycoplasmoses aviaires figurent parmi les maladies infectieuses les plus fréquentes dans les troupeaux de production de poules ou de dindes. Ainsi *Mycoplasma synoviae* (MS) est responsable de la synovite infectieuse chez la poule et chez la dinde, entraînant des pertes économiques en raison de baisses de production d'œufs, de retards de croissance et de saisies des carcasses du fait de lésions d'aérosacculite ou d'arthrite [Kleven, 1997].

La transmission des mycoplasmes est soit verticale par l'intermédiaire des œufs à couvrir, soit horizontale, principalement par voie respiratoire. La transmission horizontale résulte soit de contacts directs entre oiseaux malades ou porteurs et oiseaux sensibles, soit de contacts indirects par l'intermédiaire de l'homme, des oiseaux sauvages ou du matériel d'élevage.

* Texte de l'exposé présenté lors de la Journée AEEMA, 18 mai 2001

¹ Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), site de Ploufragan, ¹Unité de Mycoplasmiologie Bactériologie, BP53, F 22440 Ploufragan, France

² Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), Unité de Virologie Immunologie Parasitologie Aviaires et Cunicoles, BP53, F 22440 Ploufragan, France

Cette transmission indirecte est relativement surprenante pour des bactéries sans paroi, réputées fragiles vis-à-vis de chocs osmotiques, de la chaleur, des détergents et des désinfectants. Cependant, Christensen *et al.*, [1994] ont montré que MS peut persister 2 ou 3 jours sur des plumes et nous avons précédemment mis en évidence, à l'aide de techniques d'amplification génique, la diffusion et la présence de MS dans des prélèvements environnementaux [Marois *et al.*, 2000].

L'objectif de cette étude était de démontrer, à l'aide de trois expérimentations, que les cellules de ce mycoplasme présentes dans l'environnement sont

capables d'infecter des oiseaux. Afin de mettre en évidence la présence de MS dans la trachée des poulets ou dans l'environnement, une technique de PCR multiplexe et une technique de RT-PCR multiplexe ont été développées et évaluées. Ces tests permettent la détection de l'ADN, de l'ARN messager (ARNm) ou de l'ARN ribosomal (ARNr) de *M. synoviae* ou des genres *Mycoplasma*, *Acholeplasma* ou *Spiroplasma*. La stabilité *in vitro* de l'ARNm et de l'ARNr après la mort par choc osmotique de cellules de MS a été évaluée, de même que la stabilité de ce mycoplasme dans l'environnement de poulets contaminés, après élimination de ces derniers.

II - MATERIEL ET METHODES

1. SOUCHES BACTERIENNES

La spécificité de la PCR a été testée vis-à-vis de 56 souches appartenant soit à l'espèce MS (1 souche de référence et 17 souches isolées du terrain) soit à 38 espèces autres que MS (tableau I).

1.1. PREMIERE EXPERIMENTATION

Quinze poussins d'un jour, exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS), fournis par le Service d'expérimentation avicole et cunicole de l'AFSSA site de Ploufragan, ont été disposés dans un isolateur. Afin de contrôler l'absence de mycoplasme dans l'environnement, des prélèvements (aliment, eau de boisson et poussière de l'isolateur) ont été effectués et analysés par culture, PCR multiplexe et RT-PCR multiplexe. L'environnement de l'isolateur a ensuite été immédiatement contaminé par une culture de la souche MS 86122 ($1,3 \times 10^9$ unités formant colonies (UFC) par m^3). Pendant toute la durée de l'essai, l'isolateur n'a pas été nettoyé. Dans un délai de 13, 27 et 34 jours après le jour de contamination de ce premier essai (PJ13, PJ27 et PJ34), des écouillons de trachée ont été effectués sur tous les oiseaux et la présence de mycoplasmes a été recherchée par culture et PCR-multiplexe.

1.2. DEUXIEME EXPERIMENTATION

La deuxième expérimentation a consisté à placer 14 poussins EOPS d'un jour dans l'isolateur précédemment occupé pendant 34 jours par les poussins du premier essai. Les poussins ont été introduits dans l'isolateur juste après l'élimination des oiseaux du premier essai colonisés par MS (voir ci-dessous). Quand les poussins du deuxième essai ont

atteint l'âge de 22 jours (DJ21), ils ont été inoculés par voie intra-nasale à l'aide d'un coronavirus de la bronchite infectieuse aviaire souche, Mass 41 (10^3 doses infectieuses pour l'embryon (DIE₅₀) par oiseau). Des écouillons trachéaux ont été collectés à DJ11, DJ18 et DJ27 sur tous les sujets et analysés par culture et PCR multiplexe. A DJ33, les oiseaux ont été sacrifiés et autopsiés. Les trachées ont été analysées par culture et PCR multiplexe.

Pour évaluer la stabilité de MS dans l'environnement, pendant les sept premiers jours suivant l'élimination des oiseaux du premier essai, des prélèvements de poussière, plumes, eau de boisson et aliment ont été effectués et analysés par culture, PCR multiplexe et RT-PCR multiplexe.

1.3. TROISIEME EXPERIMENTATION

Quinze poussins EOPS d'un jour ont été placés dans un isolateur contaminé par de la poussière, des plumes et de l'aliment (672 g/m^3) prélevés moins d'une heure avant dans un élevage de poules pondeuses infectées par MS. Ces prélèvements environnementaux ont été analysés par culture, PCR multiplexe et RT-PCR multiplexe afin de contrôler la présence de MS. Au 57^{ème} jour (TJ57), les oiseaux ont été inoculés par voie intra-nasale à l'aide d'un coronavirus de la bronchite infectieuse aviaire, souche Mass 41 (10^3 DIE₅₀ par oiseau). Des écouillons trachéaux ont été prélevés sur tous les oiseaux à TJ12, TJ26, TJ33, TJ40, TJ47, TJ54 et TJ63 et analysés par culture et PCR multiplexe. A TJ69, les poulets ont été sacrifiés et autopsiés ; les trachées ont été analysées par culture et PCR multiplexe.

TABLEAU I
Souches bactériennes utilisées

Espèce bactérienne	Hôte principal	Source	Nombre	Résultats PCR multiplexe	
				<i>M. synoviae</i>	<i>Myco, Achole, Spiro</i> ^c
<i>M. synoviae</i>	Volaille	R ^a - ATCC25204 ^b	1	+	+
	Volaille	Terrain	17	+	+
<i>M. gallisepticum</i>	Volaille	R - ATCC19610	1	-	+
<i>M. meleagridis</i>	Volaille	R - ATCC25294	1	-	+
<i>M. iowae</i>	Volaille	R - ATCC33552	1	-	+
<i>M. lipofaciens</i>	Volaille	R - ATCC35105	1	-	+
<i>M. gallopavonis</i>	Volaille	R - ATCC33551	1	-	+
<i>M. gallinarum</i>	Volaille	R - ATCC19708	1	-	+
<i>M. glycyphilum</i>	Volaille	R - ATCC35277	1	-	+
<i>M. gallinaceum</i>	Volaille	R - ATCC33550	1	-	+
<i>M. columbinasale</i>	Volaille	R - ATCC33549	1	-	+
<i>M. columborale</i>	Volaille	R - ATCC29258	1	-	+
<i>M. columbinum</i>	Volaille	R - ATCC29257	1	-	+
<i>M. iners</i>	Volaille	R - ATCC15969	1	-	+
<i>M. anseris</i>	Volaille	R - ATCC49234	1	-	+
<i>M. anatis</i>	Volaille	R - ATCC25524	1	-	+
<i>M. cloacale</i>	Volaille	R - ATCC35276	1	-	+
<i>M. pullorum</i>	Volaille	R - ATCC33553	1	-	+
<i>M. hyopneumoniae</i>	Porc	R - ATCC25934	1	-	+
<i>M. flocculare</i>	Porc	R - ATCC27399	1	-	+
<i>M. hyorhinis</i>	Porc	R - ATCC17981	1	-	+
<i>M. hyosynoviae</i>	Porc	R - ATCC25591	1	-	+
<i>M. bovis</i>	Bovin	R - ATCC25523	1	-	+
<i>M. arginini</i>	Mouton	R - ATCC23838	1	-	+
<i>M. orale</i>	Humain	R - ATCC23714	1	-	+
<i>M. pneumoniae</i>	Humain	R - ATCC15531	1	-	+
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	Volaille	R - ATCC23206	1	-	+
<i>Acholeplasma axanthum</i>	Divers	R - ATCC25176	1	-	+
<i>Spiroplasma citri</i>	Plante	R - ATCC27556	1	-	+
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Humain	R - ATCC27618	1	-	-
<i>Campylobacter coli</i>	Volaille	Terrain	1	-	-
<i>Pasteurella haemolytica</i>	Volaille	Terrain	1	-	-
<i>Haemophilus paragallinarum</i>	Volaille	R - ATCC29545	1	-	-
<i>Streptococcus suis</i>	Porc	R - ATCC43765	1	-	-
<i>Pasteurella multocida</i>	Porc	Terrain	1	-	-
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Porc	R - ATCC27088	1	-	-
<i>Clostridium innocuum</i>	Divers	R - ATCC14501	1	-	-
<i>Clostridium ramosum</i>	Divers	R - ATCC25582	1	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Divers	R - ATCC25902	1	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	Divers	R - ATCC167	1	-	-

^a R: souche de référence

^b ATCC : American Type Culture Collection, Rockville, USA

^c Myco, Achole, Spiro : genre *Mycoplasma*, *Acholeplasma* ou *Spiroplasma*

2. TECHNIQUES UTILISEES

La culture de mycoplasmes, la préparation des matrices amplifiables, la construction du contrôle interne d'amplification, les tests PCR multiplexe et RT-PCR multiplexe ont été effectués tel que précédemment décrit [Marois *et al.*, 2000 ; Marois *et al.*, soumis]. Brièvement, afin de détecter la présence d'inhibiteurs de la PCR, un contrôle interne positif est construit par PCR à l'aide d'amorces dont les extrémités 5' sont identiques aux amorces utilisées pour amplifier le produit spécifique de MS, et les extrémités 3' sont complémentaires d'un fragment de 645 paires de bases (pb) du gène d'ARNr 16S de *M. synoviae* souche de référence WVU 1853. Le produit obtenu est purifié et conservé à -20°C.

La PCR multiplexe développée dans cette étude permet de détecter simultanément d'une part, à l'aide des amorces mspcl5 et mspcl4, un fragment de 422 pb du gène pcl42-56 (U66315) qui code pour une protéine membranaire spécifique de MS et d'autre part, à l'aide des amorces GPO3 et MGSO définies par van Kuppeveld *et al.* [1992], un fragment de 270 pb du gène d'ARNr des espèces *Mycoplasma Acholeplasma* ou *Spiroplasma*.

La RT-PCR multiplexe permet la détection dans l'environnement de cellules de MS et des genres *Mycoplasma*, *Acholeplasma* ou *Spiroplasma*, viables ou très récemment mortes. L'ARN total est extrait à l'aide du kit RNaxel (Eurobio, les Ulis, France)

directement à partir des prélèvements environnementaux. Les ARN sont conservés à 4°C et contrôlés par PCR afin de confirmer l'absence d'ADN. Le fragment d'ARNr 16S des genres *Mycoplasma*, *Acholeplasma* ou *Spiroplasma* est transcrit en cDNA avec l'amorce MGSO et le fragment d'ARNm de MS est transcrit avec l'amorce mspcl4. Les produits de la transcription inverse sont amplifiés par PCR. Après amplification, les produits sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

3. SENSIBILITE DES TESTS PCR ET RT-PCR MULTIPLEXES

La sensibilité de la méthode PCR a été évaluée à l'aide de dilutions décimales de cultures titrées de MS.

4. STABILITE DE L'ARNm ET DE L'ARNr

Une suspension de cellules de MS a été soumise à un choc osmotique. La suspension de cellules mortes a été maintenue à température ambiante et dans un délai de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 16, 18, 20, 25, 30 minutes puis 1, 2, 3, 4, 5, 6, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 45 et 69 heures après le choc osmotique, des échantillons de 50 µl ont été prélevés et l'ADN et l'ARN total ont été extraits et analysés par PCR multiplexe et RT-PCR multiplexe.

III - RESULTATS

1. SPECIFICITE DE LA PCR MULTIPLEXE

La PCR multiplexe a permis l'amplification du fragment de 645 pb correspondant au contrôle interne positif, d'un fragment de 422 pb du gène de protéine de membrane à partir des 18 souches de MS testées, et non des souches des autres espèces testées, et d'un fragment de 270 pb à partir de toutes les souches testées appartenant aux genres *Mycoplasma*, *Acholeplasma* et *Spiroplasma*.

2. SENSIBILITE DE LA PCR MULTIPLEXE ET DE LA RT-PCR MULTIPLEXE

Dans nos conditions, la limite de détection de la PCR a été de 1,65 UFC pour le produit spécifique de MS et de 0,165 UFC pour le produit commun aux genres *Mycoplasma*, *Acholeplasma* et *Spiroplasma*. La RT-PCR a permis de détecter 6,6 UFC de MS par essai et 0,66 UFC par essai pour les genres *Mycoplasma*, *Acholeplasma* et *Spiroplasma*.

3. STABILITE DE L'ARNm ET DE L'ARNr APRES LA MORT DES MYCOPLASMES

Les stabilités de l'ARNm et de l'ARNr ont été estimées respectivement à 20 minutes et 23 heures après la mort des mycoplasmes. Tous les échantillons collectés jusqu'à 69 heures après la mort des mycoplasmes (dernier prélèvement) contenaient de l'ADN.

3.1. PREMIERE EXPERIMENTATION

A PJ0, les prélèvements réalisés dans l'isolateur ne contenaient ni MS ni son ADN ni son ARN. A partir de PJ13, MS a été détecté dans un écouvillon trachéal par culture et PCR multiplexe. A PJ27 et PJ34, tous les écouvillons trachéaux étaient positifs par culture et PCR multiplexe.

3.2. DEUXIEME EXPERIMENTATION

La stabilité de MS dans l'environnement après élimination des poulets du premier essai a été évaluée entre 4 et 6 jours par culture et RT-PCR multiplexe. A

DJ18 et à DJ27, les nouveaux poussins n'étaient pas infectés. A DJ33, 12 jours après inoculation virale, la culture et la PCR multiplexe ont permis de détecter 10 et 14 oiseaux positifs respectivement. A l'autopsie, des lésions sévères d'aérosacculite étaient présentes sur tous les oiseaux.

3.3. TROISIEME EXPERIMENTATION

A TJ0, c'est-à-dire avant l'introduction des prélèvements collectés dans la ferme de poules pondeuses contaminées par MS, aucune des trois techniques n'a permis de détecter la présence de MS dans l'isolateur. Les échantillons environnementaux

collectés dans la ferme contaminée se sont avérés positifs par culture (1/9), PCR multiplexe (6/9) et RT-PCR multiplexe (6/9). A TJ12, TJ26, TJ33, TJ40 et TJ47, les écouvillons trachéaux ont été négatifs par culture, mais un, deux et neuf des écouvillons prélevés respectivement à TJ12, TJ26 et TJ33 contenaient de l'ADN de MS. A TJ54, deux poulets étaient infectés par MS et à TJ63, soit six jours après l'inoculation virale, ainsi qu'à TJ69, tous les oiseaux ont été positifs pour les trois tests employés. L'autopsie a permis d'observer de sévères lésions d'aérosacculite sur tous les oiseaux.

IV - DISCUSSION ET CONCLUSION

La PCR multiplexe décrite ici permet de détecter la présence d'un gène de protéine membranaire spécifique de MS et d'un fragment d'ARNr de *Mycoplasma*, *Acholeplasma* ou *Spiroplasma*. La présence du contrôle interne positif, dont la stratégie de construction est particulièrement simple et ne nécessite pas de clonage [Sachadyn et Kur, 1998] permet d'éliminer les résultats faussement négatifs et la spécificité du test autorise son utilisation sur des prélèvements très contaminés, tels que ceux collectés dans l'environnement.

Alors que la PCR permet de détecter des cellules viables ou non viables [Josephson *et al.*, 1993], la RT-PCR développée dans cette étude est basée sur la détection d'un ARNm de MS, témoin de l'activité métabolique de ce mycoplasme, et la stabilité (limitée à quelques minutes) de cet indicateur, en fait un outil particulièrement intéressant. Cette stratégie de détection de bactéries viables ou récemment mortes est également rapportée par d'autres auteurs [Sheridan *et al.*, 1998 ; Bej *et al.*, 1991 ; Klein *et al.*, 1997 ; del Mar Lleo *et al.*, 2000].

La stabilité de MS dans l'environnement de poulets contaminés a été estimée entre 4 et 6 jours dans notre étude. Selon Christensen *et al.* [1994], MS WVU1853 peut être retrouvé par culture jusqu'à deux ou trois jours sur des plumes mais non dans l'aliment, alors que dans nos conditions MS 86122 peut survivre dans l'aliment jusqu'à trois jours (résultats non montrés).

La PCR multiplexe et la RT-PCR multiplexe sont utilisables pour démontrer la transmission horizontale de MS par contact indirect par l'environnement

(poussières, plumes, aliment et eau de boisson). Les trois expérimentations ont permis en effet de montrer que les cellules de MS présentes dans l'environnement et détectées par les trois méthodes (culture, PCR multiplexe et RT-PCR multiplexe) peuvent infecter les poussins. L'infectiosité et la virulence de MS sont exacerbées par l'inoculation du virus de la bronchite infectieuse aviaire et la co-infection se traduit par de sévères lésions d'aérosacculite qui ne sont d'ordinaire pas observées lors d'infections par MS ou le coronavirus pris isolément (résultats non montrés).

Lors du troisième essai, la mise en évidence à TJ12, TJ26 ou TJ33, d'ADN de MS dans les trachées des oiseaux alors que les cultures restaient négatives pourrait être due à la présence de mycoplasmes viables non cultivables ou de mycoplasmes morts ou encore à la localisation intracellulaire de cellules de MS qui ne pourraient donc pas être détectées par culture mais dont l'ADN serait libéré des cellules de l'épithélium trachéal lors de la lyse cellulaire effectuée pour la préparation des échantillons pour la PCR multiplexe.

La troisième expérimentation a permis de souligner le danger que représentent les poussières, plumes ou aliment provenant d'un élevage infecté par MS. L'application de mesures très strictes de police sanitaire doit donc éviter la dissémination et permettre la décontamination effective des matières virulentes. Le contrôle des surfaces ou des matériaux peut ensuite être effectué par les méthodes décrites ici, culture ou RT-PCR, avant l'introduction de nouveaux oiseaux dans l'élevage.

V - BIBLIOGRAPHIE

- Bej A.K., Mahbubani M.H. and Atlas R.M. ~ Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, **57**, 597-600.
- Christensen N.H., Yavari C.A., McBain A.J. and Bradbury J.M. ~ Investigations into the survival of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma iowae* on materials found in the poultry house environment. *Avian. Path.*, 1994, **23**, 127-143.
- del Mar Lleo M., Pierobon S., Tafi M.C., Signoretto C. and Canepari P. ~ mRNA detection by Reverse Transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**, 4564-4567.
- Josephson K.L., Gerba C.P. and Pepper I.L. ~ Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**, 3513-3515.
- Klein P.G. and Juneja V.K. ~ Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**, 4441-4448.
- Kleven S. H. ~ *Mycoplasma synoviae* infection. In : Diseases of Poultry 10th edition. Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., McDougald L.R., Saif Y.M. (Ed.). Iowa State Univ. Press. Ames, IA., 1997, 220-228.
- Marois C., Dufour-Gesbert F. and Kempf I. ~ Detection of *Mycoplasma synoviae* in poultry environment samples by culture and polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.*, 2000, **73**, 311-318.
- Marois C., Picault J.P., Kobisch M. and Kempf I. ~ Multiplex PCR and multiplex RT-PCR assays to detect *M. synoviae* in poultry environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, soumis.
- Sachadyn P. and Kur J. ~ The construction and use of a PCR internal control. *Mol. Cell. Probes.*, 1998, **12**, 259-262.
- Sheridan G.E.C., Masters C.I., Shallcross J.A. and Mackey B.M. Detection of mRNA by Reverse Transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **64**, 1313-1318.
- 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. and Melchers W.J. ~ Genus and species-specific identification of mycoplasmas by 16S RNA amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, **58**, 2606-2615.



REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Yannick Morin (AFSSA site de Ploufragan) pour son aide efficace lors des expérimentations et le Professeur Y. Richard (Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, France) pour la lecture critique du manuscrit.