

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) – UESEP (2), BP 53, 22440 Ploufragan, France

sarah.fourour@anses.fr

Development of a multiplex qPCR test for the quantification of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* and *M. flocculare*

Mycoplasma hyopneumoniae, involved in the porcine respiratory disease complex (PRDC), is the etiologic agent of porcine enzootic pneumonia. Two other mycoplasmas are also involved in PRDC: *M. hyorhinis* and *M. flocculare*. The impact of the association of these three mycoplasma species on respiratory diseases is unknown. However, this disease frequently observed on pig farms, is particularly scrutinized in term of veterinary and public health because of the use of antibiotics. The aim of this study was to develop and validate a quantitative PCR (qPCR) multiplex *Taqman* for the simultaneous quantification of *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* and *M. flocculare* in porcine samples. The targeted genes encode respectively the P102 adhesin, the P37 membrane lipoprotein and a component of fructose carrier FruA. The sensitivity, specificity (analytics and diagnostics) and repeatability were assessed with (i) collection strains of these three mycoplasma species, (ii) other collection bacterial strains of species included in PRDC, (iii) tracheal, tonsillar and nasal samples collected from specific pathogen-free pigs, (iv) mucus tracheal samples collected from farrow-to-finish pig herds and (v) samples of lung collected at the slaughterhouse. Results showed that our qPCR multiplex can be used for the quantification of the three mycoplasma species. It is a useful tool to perform epidemiological studies in order to improve the understanding of lung diseases.

INTRODUCTION

M. hyopneumoniae est l'agent étiologique de la pneumonie enzootique porcine et l'agent primaire du complexe respiratoire porcin (Marois *et al.*, 2010). Son association avec certains pathogènes (virus du syndrome dysgénésique et respiratoire du porc, virus influenza porcins, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*...) aggrave les pathologies associées. Deux autres espèces mycoplasmiques sont souvent présentes au côté de *M. hyopneumoniae* dans les lésions pulmonaires : *M. hyorhinis* décrit comme étant responsable de polysérites et d'arthrites (Tocqueville *et al.*, 2014) et *M. flocculare* décrit comme non pathogène. L'objet de la présente étude était de mettre au point et valider un test qPCR multiplex permettant de quantifier simultanément ces trois espèces mycoplasmiques. Les spécificités et sensibilités, analytiques et diagnostiques, ont été évaluées à partir de souches bactériennes, mycoplasmiques ou non, et de prélèvements porcins collectés en élevage ou à l'abattoir.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Gènes cibles

La qPCR multiplex développée cible le gène *p102* codant une adhésine pour *M. hyopneumoniae* [gb|AE017332.1|], le gène *p37* codant une lipoprotéine de membrane pour *M. hyorhinis* [gb|CP003914.1|] et le gène *fruA* codant un composant du

transporteur du fructose pour *M. flocculare* [gb|CP007585.1|. Les séquences cibles ont été définies à l'aide du logiciel Beacon-Designer™ version 6.00 qui applique le multiplexage, et leur spécificité a été vérifiée sur BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) et *in silico* (<http://insilico.ehu.es/>).

1.2. Culture des souches, préparation des ADN et qPCR

La culture des souches a été réalisée à 37°C dans du milieu liquide de Friis (mycoplasmes porcins), FM4 ou Arginine (autres espèces mycoplasmiques) et milieu gélosé PLO complété (bactéries autres que mycoplasmes) (Marois *et al.*, 2010). Des lysats cellulaires ont été préparés selon la méthode décrite par Kellog et Kowk (1990), excepté pour les tests réalisés sur des ADN pour lesquels l'extraction et la purification ont été effectuées à l'aide du kit « DNA mini kit » (Qiagen, Les Ulis, France). Chaque réaction PCR a été réalisée à partir de 5 µL de matrice et 20 µL de mélange réactionnel (1X iQ Supermix (Bio-Rad®, Marnes-la-Coquette, France), 40 µM d'amorces (Eurobio®, Les Ulis, France), 40 µM de sondes *TaqMan* (Sigma-Aldrich®, Saint-Quentin Fallavier, France), 0,25X *TaqMan*® *Exogenous internal Positive Control Reagents* (Life technologies®, Saint-Aubin, France). Le thermocycleur utilisé était le « CFX96™ Real-Time PCR Detection System » (Bio-Rad®, Marnes-la-Coquette, France) qui permet la lecture des fluorescences CY5 (cible *p102*), TXR (cible *p37*), FAM (cible *fruA*) et VIC (contrôle interne). Le programme PCR était le suivant : 3 min à 95°C suivi de 40 cycles de 15 sec à 95°C et 1 min à 60°C.

1.3. Tests de validation de la qPCR multiplex

1.3.1. Linéarité et efficacité

Ces paramètres ont été définis à partir de 10 gammes de quantification, réalisées en duplicata, de 10^7 fg/ μ l à 1 fg/ μ l par dilution de raison dix de l'ADN de *M. hyopneumoniae* ATCC 25095, *M. hyorhinis* ATCC 25021 ou *M. flocculare* ATCC 27399. Les Ct ont permis de déterminer les coefficients de régression R^2 et les efficacités Eff (Eff (%) = $(E-1)*100$ avec $E = 10^{(-1/\text{pente})}$).

1.3.2. Spécificité et sensibilité analytiques

La spécificité analytique a été évaluée avec des lysats cellulaires : 24 issus des espèces mycoplasmales cibles (10 *M. hyopneumoniae*, 10 *M. hyorhinis* et 4 *M. flocculare*) et 36 issus d'autres espèces (26 autres mycoplasmes et 10 bactéries « classiques ») dont sept potentiellement présentes dans l'appareil respiratoire porcin. La sensibilité analytique a été déterminée par dilution de raison dix de 10^7 fg/ μ l d'ADN de *M. hyopneumoniae* ATCC 25095, *M. hyorhinis* ATCC 25021 ou *M. flocculare* ATCC 27399, elle correspond à la plus grande dilution pour laquelle les analyses en duplicata sont positives.

1.3.3. Spécificité et sensibilité diagnostiques

La spécificité et la sensibilité diagnostiques ont été définies à partir de 116 prélèvements de mucus trachéal, nasal, amygdalien ou de lésions pulmonaires. Parmi ceux-ci, 45 étaient positifs vis-à-vis de *M. hyopneumoniae* (qPCR de Marois *et al.*, 2010, Ct < 33), 30 étaient positifs vis-à-vis de *M. hyorhinis* (qPCR de Tocqueville *et al.*, 2014, Ct < 30) et cinq étaient positifs vis-à-vis de *M. flocculare* (PCR conventionnelle de Stakenborg *et al.*, 2006, sensibilité à 1 pg). De plus, 36 prélèvements, provenant de porcs exempts de pathogènes spécifiés de l'Anses de Ploufragan, étaient négatifs en *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* et *M. flocculare* avec les trois méthodes précédentes. La spécificité diagnostique est la proportion d'échantillons négatifs, qui donnent un résultat négatif avec la qPCR multiplex. La sensibilité diagnostique est la proportion d'échantillons positifs, qui donnent un résultat positif avec la qPCR multiplex.

1.3.4. Répétabilité et contrôle interne

La répétabilité a été testée à partir de lysats cellulaires issus de 24 prélèvements de poumons lésés. Les analyses ont été réalisées en triplicata et à partir de trois PCR indépendantes. Le coefficient de variation (CV) a été calculé à partir des Ct des neuf répétitions : CV (%) = $(\text{écart-type/moyenne}) * 100$.

2. RESULTATS

2.1. Linéarité et efficacité

La linéarité et l'efficacité sont rapportées dans le tableau 1.

Tableau 1 - Résultats de linéarité (R^2) et d'efficacité (Eff)

R^2	<i>M. hyopneumoniae</i>	<i>M. hyorhinis</i>	<i>M. flocculare</i>
Eff (%)	0,999 99,9 ± 2,4	0,996 100,8 ± 2,9	0,983 103,6 ± 11,4

2.2. Spécificité et sensibilité analytiques

La spécificité analytique a été validée puisque les lysats cellulaires positifs ont été amplifiés avec le fluorophore CY5 pour *M. hyopneumoniae*, TXR pour *M. hyorhinis* et FAM pour *M. flocculare*. Des seuils de positivité de fluorescence ont été déterminés : CY5 = 200 ; TXR = 300 et FAM = 100. Les Ct éventuellement obtenus à partir des lysats cellulaires négatifs ont permis d'ajuster une fenêtre de lecture des Ct : $5 < Ct_{CY5} < 40$; $5 < Ct_{TXR} < 30$ et $5 < Ct_{FAM} < 35$. La sensibilité analytique est de 12,5 fg/ μ l pour *M. hyopneumoniae* et *M. flocculare*, et 125 fg/ μ l pour *M. hyorhinis*.

2.3. Spécificité et sensibilité diagnostiques

La spécificité diagnostique est de 100% pour les trois espèces mycoplasmales cibles. La sensibilité diagnostique est de 96% pour *M. hyopneumoniae*, 97% pour *M. hyorhinis* et 100% pour *M. flocculare*.

2.4. Répétabilité

Les résultats de répétabilité inter et intra-essai révèlent des CV maximum de 8,9% pour *M. hyopneumoniae*, 4,4% pour *M. hyorhinis* et 8,2% pour *M. flocculare*.

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'avantage de la qPCR multiplex mise au point ici est la rapidité de mise en œuvre, une bonne sensibilité et son application sur des prélèvements de terrain. Les résultats des tests de validation montrent que cette méthode est spécifique puisqu'elle ne cible que les espèces mycoplasmales définies (même en présence d'autres mycoplasmes ou d'autres bactéries présentes chez le porc) et qu'il n'y a pas de réactions croisées entre les trois espèces cibles. De plus, les corrects linéarités ($R^2 > 0,98$) et efficacité d'amplification ($90 < \text{Eff} < 115$) des cibles permettent la quantification des trois espèces dans un même prélèvement à partir de 12,5 fg/ μ l pour *M. hyopneumoniae* et *M. flocculare*, et 125 fg/ μ l pour *M. hyorhinis*. Cette méthode présente une bonne concordance entre les résultats inter et intra-essai. Enfin, l'amplification simultanée d'un contrôle interne permet de garantir l'absence d'inhibiteurs de PCR dans les prélèvements, ce qui évite des résultats faussement négatifs et ajoute donc une confiance supplémentaire vis-à-vis des résultats obtenus.

La qPCR multiplex développée peut être utilisée pour la détection et la quantification simultanée de trois espèces mycoplasmales, sur des prélèvements trachéaux, nasaux, amygdaliens ou pulmonaires. Elle représente un outil prometteur pour des études épidémiologiques visant à approfondir les connaissances sur les associations mycoplasmales impliquées dans les maladies pulmonaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 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, 1523-33.
- Kellogg D.E., Kwok S., 1990. Detection of human immunodeficiency virus. In : M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White (Eds.), Academic Press, pp. 339-343., San Diego.
- Stakenborg T., Vicca J., Butaye P., Imberechts H., Peeters J., De Kruijff A., Haesebrouck F., Maes D., 2006. A Multiplex PCR to Identify Porcine Mycoplasmas Present in Both Cultures. Vet. Res. Commun., 30, 239-247.
- Tocqueville V., Ferré S., Nguyen N.H.P., Kempf I., Marois-Créhan C., 2014. Multilocus Sequence Typing of Mycoplasma hyorhinis Strains Identified by a Real-Time TaqMan PCR Assay. J. Clin. Microbiol., 52, 1664-1671.