

# 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, 22 440 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.